

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ДИОКСИДИНА НА CAENORHABDITIS ELEGANS МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

STUDY OF GENOTOXICITY OF DIOXIDIN ON CAENORHABDITIS ELEGANS BY GEL ELECTROPHORESIS

**E. Machigov
P. Dzhambetova
S. Abilev**

Summary. Objective: to study the ability of the antibacterial drug dioxidin to induce DNA breaks in *C. elegans* cells using the method of total gel electrophoresis of nematode genetic material. One of the promising ones for widespread introduction into practice of genotoxicological studies is the nematode *Caenorhabditis elegans*, which is characterized by simplicity of cultivation and is a model object in various genetic studies.

Methods: in the study, a culture of *C. elegans* Bristol N2 nematodes was used as a test system, which was grown at 21°C on a solid agarose NGM medium on a nutrient lawn, a culture of *Escherichia coli* OR50 bacteria was used. Dioxidin was used as a genotoxicant, the genotoxic properties of which have been confirmed in many studies with prokaryotes. Positive controls — betapropiolactone (0.015M) and hydrogen peroxide (0.1M), antioxidant — N-acetyl-cysteine (ACC).

Results: the study of the genotoxicity of dioxidin on *C. elegans* by gel electrophoresis of total DNA showed that dioxidin at concentrations of 0.002M — 0.0045M caused breaks in the DNA molecules of the nematode. In turn, the antioxidant N-acetyl-cysteine at concentrations of 0.01M and 0.001M reduced the level of genotoxicity of dioxidin, which reflects the concentration-dependent protective effect of the antioxidant ACC, which reduces the number of DNA breaks caused by dioxidin.

Conclusions: the study of the genotoxicity of the antibacterial agent dioxidin on the nematode *C. elegans* has shown that it is a sensitive test system, and therefore can be recommended for testing chemical environmental factors for genotoxicity.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, dioxidin, genotoxicity, DNA breaks, oxidative stress, test system, antioxidant acetylcysteine.

Мачигов Эльбек Альбертович

Аспирант, Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова РАН, Москва
elbek_machigov@mail.ru

Джамбетова Петимат Махмудовна

Докт. биол. наук, профессор, ФГБОУ ВО «Чеченский
государственный университет им. А.А. Кадырова»,
г. Грозный
petimat-ig@rambler.ru

Абилев Серикбай Каримович

Докт. биол. наук, профессор, Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
abilev@vigg.ru

Аннотация. Цель: изучение способности антибактериального препарата диоксидина индуцировать разрывы ДНК в клетках *C. elegans* с помощью метода тотального гель-электрофореза генетического материала нематоды. Одним из перспективных для широкого внедрения в практику генотоксикологических исследований является нематода *Caenorhabditis elegans*, которая отличается простотой культивирования и является модельным объектом в различных генетических исследованиях.

Методы: в исследовании в качестве тест-системы использовалась культура нематод *C. elegans* Bristol N2, которая выращивалась при 21°C на твердой агарозной NGM-среде на питательном газоне использовалась культура бактерий *Escherichia coli* OP50. В качестве генотоксиканта использовался диоксидин, генотоксические свойства которого подтверждены во многих работах с прокариотами. Положительные контроли — бетапропиолактон (0.015M) и перекись водорода (0.1M), антиоксидант — N-ацетил-цистеин (АЦЦ).

Результаты: изучение генотоксичности диоксидина на *C. elegans* методом гель-электрофореза тотальной ДНК показал, что диоксидин в концентрациях 0.002M — 0.0045M вызывал разрывы молекул ДНК нематоды. В свою очередь, антиоксидант N-ацетил-цистеин в концентрациях 0.01M и 0.001M снижал уровень генотоксичности диоксидина, что отражает зависимое от концентрации защитное действие антиоксиданта АЦЦ, уменьшающее количество разрывов ДНК, вызываемых диоксидином.

Выводы: изучение генотоксичности антибактериального агента диоксидина на нематоде *C. elegans* показало, что она является чувствительной тест-системой, в связи с чем может быть рекомендована для тестирования химических факторов окружающей среды на генотоксичность.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, диоксидин, генотоксичность, разрывы ДНК, окислительный стресс, тест-система, антиоксидант ацетилцистеин.

Введение

Генотоксичность — это способность соединений генерировать повреждения генетического материала, что зачастую приводит к мутагенезу и канцерогенезу. Основой генотоксического действия некоторых соединений, наряду прямого воздействия на ДНК, является вызываемый ими оксидативный стресс [1].

Наиболее распространенными методами генетической токсикологии являются: учет обратных генных мутаций у бактерий (тест Эймса), микроядерный тест в эритроцитах млекопитающих *in vivo*, тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*, тест на индукцию доминантных летальных мутаций у грызунов. Используются и относительно новые тест-системы, такие как тест на индукцию мутаций в соматических и половых клетках трансгенных животных, тест ДНКкомет в клетках млекопитающих *in vivo*, тест на индукцию мутаций в гене тимидинкиназы в клетках млекопитающих *in vitro*. Разные тест-системы имеют свои как положительные, так и отрицательные характеристики [2].

В качестве перспективного объекта для использования в генотоксикологических исследованиях можно рассматривать нематоду *C. elegans*, представляющей собой наиболее изученный организм в природе. Свободноживущая нематода *C. elegans* размером 1 мм является типовым видом рода *Caenorhabditis*. [3,4]. Тело червя не имеет кровеносной системы и дыхательной системы, по строению билатерально симметрично, образовано несегментированным псевдоцеломом и покрыто кутикулой. Взрослые особи содержат около 1000 соматических клеток, но при этом имеют множество типов тканей, таких как мышцы, нервы и клетки кишечника. Небольшая часть *C. elegans* (приблизительно одна особь из тысячи) являются самцами, а большинство, — гермафродитами. Одна взрослая особь может иметь от 300 до 1000 потомков [5]. С 1974 года *C. elegans* активно используется в молекулярно-биологических исследованиях, в том числе и в роли модельного организма [6].

C. elegans стал первым среди многоклеточных организмов, чей геном был полностью секвенирован, а также это первый организм с полностью расшифрованным коннектомом [7, 8, 9].

Цель

Целью данной работы является изучение способности антибактериального препарата диоксидина индуцировать разрывы ДНК в клетках *C. elegans* с помощью

метода тотального гель-электрофореза генетического материала нематоды.

Материалы и методы

Химические вещества. В качестве генотоксиканта использовался диоксидин в разных концентрациях, чьи генотоксические свойства уже подтверждены в работах с прокариотами [10]. В качестве положительных контролей были использованы бетапропиолактон (0.015M) и перекись водорода (0.1M). В качестве антиоксиданта использовался N-ацетил-цистеин (АЦЦ) в концентрациях 0.01M и 0.001M.

Биологические культуры. В качестве тест-системы использовалась культура нематод *Caenorhabditis elegans* Bristol N2, которая выращивалась при 21°C на твердой агарозной NGM-среде. В качестве питательного газона использовалась культура бактерий *Escherichia coli* OP50.

Поколения нематод синхронизировали по следующему протоколу (Solis/Petrascheck). Разросшуюся на чашке Петри популяцию нематод пипетировали стерильной водой до получения взвеси нематод и яиц. Переносили 3.5 мл взвеси в пробирку и добавляли 1.5 мл специальной смеси (0.5 мл 5M NaOH + 1 мл 5% HClO₄). Перемешивали и вортексировали 10 мин, а затем центрифугировали 30 с при 1300g и удаляли супернатант. Затем промывали осадок, растворяя в 5 мл воды, центрифугируя и удаляя супернатант. Промывку повторяли 3 раза. Затем 0.1 мл суспензии нематод переносили на чашку с NGM-агаром с газоном бактерий. Выращивание синхронизированных нематод проводили при 20°C в течение 3 суток до достижения стадии L4 («young adult»).

Подготовка нематод к электрофорезу тотальной ДНК проводилась по следующему протоколу [11]. Червей смывали с чашек стерильной водой в девять 1.5 мл пробирок, осаждали на вортексе и сливали супернатант. Добавляли дистиллированную воду в отрицательный контроль, добавляли в исследуемые образцы диоксидин в концентрациях 0.0001M, 0.0002M, 0.0005M, 0.001M, 0.002M, 0.0045M, бетапропиолактон в концентрации 0.015M и перекись водорода в концентрации 0.1M. Для опыта с антиоксидантом (4 пробирки) добавляли дистиллированную воду в отрицательный контроль, добавляли в исследуемые образцы диоксидин в концентрации 0.0045M и в них же добавляли АЦЦ в двух разных концентрациях 0.01M и 0.001M. В пробирку с положительным контролем добавляли только диоксидин.

Затем пипетировали до образования взвеси и инкубировали 120 мин при 21°C. Затем взвесь нематод

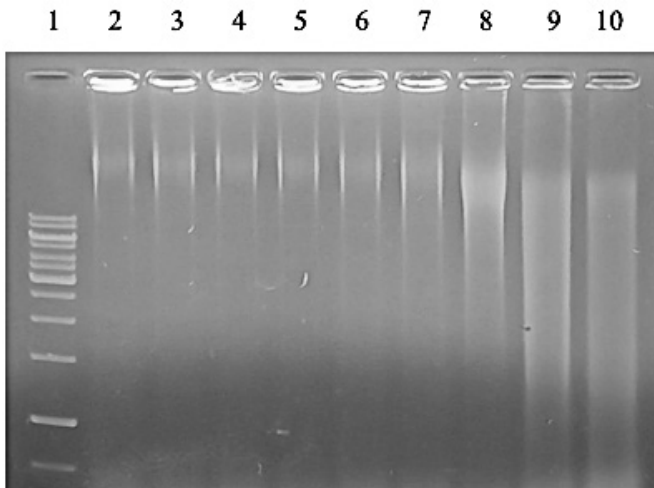


Рис. 1. Визуализация результата гель-электрофореза генетического материала нематоды *Caenorhabditis elegans*, подвергнутой воздействию диоксида водорода в разных концентрациях (диокс.) и контрольных веществ:
 1 — маркер, 2 — вода (отрицательный контроль), 3 — диокс. 0.0001M, 4 — диокс. 0.0002M, 5 — диокс. 0.0005M, 6 — диокс. 0.001M, 7 — диокс. 0.002M, 8 — диокс. 0.0045M, 9 — бетапропиолактон 0.015M (положительный контроль), 10 — перекись 0.1M (положительный контроль).

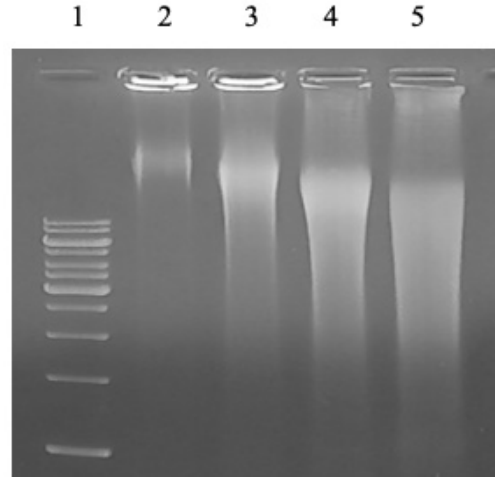


Рис. 2. Визуализация результата гель-электрофореза генетического материала нематоды *Caenorhabditis elegans*, подвергнутой воздействию диоксида водорода (диокс.) и (отрицательный контроль), 3 — диокс.0.0045M + АЦЦ 0.01M, 4 — диокс.0.0045M + АЦЦ 0.001M, 5 — диокс.0.0045M (положительный контроль).

центрифугировали 5 мин при 2300g и удаляли супернатант, добавляли 1 мл стерильной воды, и пипетировали до получения взвеси.

Для вымывания бактерий из кишечника нематод использовали метод промывания с использованием центрифугирования. Взвесь нематод сливали в центрифужные пробирки, добавляли воду до достижения 5 мл и центрифугировали 5 мин при 2300g для образования гранул. Супернатант отбрасывали и заменяли свежей стерильной водой. Пробирки, содержащие нематоды, вортиксовали 3 мин; после этого червей центрифугировали при 2300g в течение 5 мин для удаления бактерий. Промывку повторяли 10 раз чтобы вымыть бактерии из кишечника нематод. При последней промывке избыток воды удаляли, оставляя 1 мл смеси вода/нематоды, а затем переносили в 1,5-мл микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 12000g в течение 10 мин. Супернатант сливали и подвергали гранулу заморозке при -20°C , а затем механически измельчали палочкой с абразивной поверхностью нако-
 нечника.

Выделение ДНК из клеток нематод проводили с использованием специального набора реагентов по протоколу Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) следующим образом поэтапно:

1. Не дожидаясь оттаивания, измельченной гранулы добавляли к ней 200 мкл ТЕ-буфера, 400 мкл лизирующего раствора, и инкубировали при 65°C в течение 10 мин.
2. Затем, добавляли 600 мкл хлороформа, переворачивали 5 раз, и центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин.
3. Верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, переносили в новую пробирку, и добавляли 800 мкл 1% Осаждающего раствора, перемешивали несколькими переворотами в течение 2 мин, и центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин.
4. Удаляли супернатант, и растворяли гранулу в 100 мкл раствора хлорида натрия осторожным встряхиванием.
5. Добавляли 300 мкл холодного концентрированного этанола, осаждали ДНК при -20°C в течение 10 мин, и центрифугировали 4 мин при 10 000 об/мин.

об/мин, удаляли концентрированный этанол, обливали гранулу 70% этанолом, добавляли к ней 200 мкл стерильной деионизированной воды, и растворяли гранулу в воде аккуратным встряхиванием.

Электрофорез тотальной ДНК проводился следующим образом. По 20 мкл лизированной ДНК переносили в лунки 1% агарозной гелевой пластины (0.01% бромида этидия). Пластина помещалась в ванночку с 10% TBE буфером. Электрофорез проводили при 100 мА, 120 В, 80 Вт. Визуализация результата осуществляли с помощью УФ-лампы.

Результаты и обсуждение

Картина, полученная в результате тотального гель-электрофореза представлена на рис. 1 Анализ длин шлейфов из фрагментов ДНК, вышедшие из лунок и получившего название шмер, показал, что в концентрациях диоксида 0.0001М, 0.0002М, 0.0005М, 0.001М (лунки № 3,4,5,6) они не отличались по длине от такового в чистом контроле. В концентрации диоксида 0.002М фрагментированный генетический материал, вышедший из лунки (лунка № 7), продвинулся немного дальше от контроля, длина пути, пройденного фрагментированным генетическим материалом при концентрации диоксида 0.0045М (лунка № 8) уже более протяженная, чем при 0.002М, и его картина совершенно ясно отличается от предыдущих. Длины пути, пройденного фрагментированным генетическим материалом обоих положительных контролей (бетапропиолактон в концентрации 0.015М и перекись водорода в концентрации 0.1М), занимающих лунки № 9 и 10, сопоставимы друг с другом, и гораздо больше длин пути, пройденного фрагментированным генетическим материалом исследуемых образцов.

В опыте с антиоксидантом (рис. 2.) картина положительного и отрицательного контролей (лунки № 2 и 5) была аналогичной таковой в вышеописанном эксперименте с разными концентрациями диоксида. АЦЦ в концентрации 0.001М (лунка № 4) слабо влияла на количество разрывов ДНК, вызываемых диоксидом (лунка 5), однако АЦЦ в концентрации 0.01М (лунка № 3) значительно укорачивала длину пути, пройденного фрагментированным генетическим материалом, то есть заметно снижал уровень фрагментации ДНК.

Таким образом, из электрофореграмм видно, что диоксидин, в концентрациях 0.0001М, 0.0002М, 0.0005М, 0.001М не влиял заметно на целостность генетического материала, тогда как увеличение его концентрации сначала до 0.002М а потом до 0.0045М последовательно усиливало картину фрагментации ДНК, что прояв-

лялось в увеличении пути, пройденного фрагментированным генетическим материалом. Закономерно и ожидаемо положительные контроли (бета-пропиолактон в концентрации 0.015М и перекись водорода в концентрации 0.1М) вызывали разрывы ДНК в наибольшей степени. Надо отметить, что бета-пропиолактон является сильным алкилирующим агентом, вызывающим повреждения в ДНК [12], перекись водорода в высоких концентрациях вызывает нитевые разрывы в ДНК [13] Также показано зависимое от концентрации защитное действие антиоксиданта АЦЦ, уменьшающее количество разрывов ДНК, вызываемых диоксидом.

Ранее нами было показано, что диоксидин в бактериальной клетке *E.coli* генерирует супероксид-радикал и вызывает разрывы ДНК [14]. Это указывает на то, что генотоксичность диоксида обусловлена вызываемым им окислительным стрессом, что было ранее показано на мышах [15, 16, 17]. В этой связи можно утверждать, что *C. elegans* является удобным объектом для изучения генотоксичности химических соединений, вызывающих окислительный стресс в эукариотических клетках. При этом *C. elegans* имеет ряд преимуществ перед тест-системами на грызунах: короткий цикл размножения, за 3 дня при комнатной температуре достигает стадий L1 — L4 [18]; сходство генов *C. elegans* и геномами человека — примерно 40% генов, связанных с заболеванием человека, имеют гомологи в геноме *C. elegans* [19, 20]; области геномного анализа *C. elegans* ведутся работы, направлены на выяснение функций, регуляции, взаимодействия и экспрессии всего набора генов в геноме [21].

В ряде экспериментов показано, что ранжирование токсичности *C. elegans* столь же прогностично, как и ранжирование с помощью крыс или мышей, включая LD50. *C. elegans*, как и все эукариоты, имеет в геноме большую группу генов системы детоксикации ксенобиотиков цитохром P450, исследование особенностей функционирования которых у *C. elegans* позволяет с некоторой степенью уверенности экстраполировать на человека результаты опытов по генотоксичности на данной нематоде [22].

Нематода, в отличие от млекопитающих очень проста в культивации и доступна по ресурсам, опыты с ней гораздо менее трудоемки и затратны по времени. В отличие от прокариот и одноклеточных эукариот, нематода является многоклеточным животным, и обладает теми метаболическими системами, которых прокариоты лишены, что делает опыты с ней более экстраполируемыми на человека. Все это дает основания рассматривать *C. elegans* как организм, прекрасно подходящий на роль модельного в генотоксикологических исследованиях [23].

Заключение

Для более эффективной работы в области генетической токсикологии необходимы тест-системы, которые бы сочетали в себе, с одной стороны, простоту в применении, дешевизну ресурсов и быстроту в выпол-

нении. Впервые проведено изучение генотоксичности антибактериального агента диоксида на нематоде *C. elegans* и показано, что она является чувствительной тест-системой, в связи с чем может быть рекомендована для тестирования химических факторов окружающей среды на генотоксичность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абилов С.К., Глазер В.М. Генетическая токсикология: итоги и проблемы. //Генетика. 2013. № 49(1). С. 81–93.
2. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К. Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. //Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2022. № 12(1). С. 90–109.
3. Wood WB. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. //Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988. p. 1.
4. Sudhaus W, Kiontke K. Phylogeny of Rhabditis subgenus *Caenorhabditis* (Rhabditidae, Nematoda). //Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. 2009. № 34(4). P.217–233.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell (5th ed.). //Garland Science. 2007. p. 1321. ISBN978–0–8153–4105–5.
6. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. //Genetics. 1974. № 77 (1). P.71–94.
7. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. //Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 1986. № 314 (1165). P. 1–340. DOI:10.1098/rstb.1986.0056.
8. White JG. Getting into the mind of a worm — a personal view. //WormBook. 2013. P. 1–10.
9. Jabr F. The Connectome Debate: Is Mapping the Mind of a Worm Worth It? //Scientific American. Retrieved. 2014. P. 1–18.
10. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Облапенко Н.Г. О характере мутагенного действия диоксида на бактерии. //Цитология и генетика (Киев). 1980. № 14(1). С. 60–64.
11. Imanikia S, Galea F, Nagy E, Phillips DH, Stürzenbaum SR, Arlt VM. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. //Environ Toxicol Pharmacol. 2016. № 45. P.356–61. DOI: 10.1016/j.etap.2016.06.020.
12. Brusick DJ. The genetic properties of beta-propiolactone. //Mutat Res. 1977. № 39(3–4). P.241–55.
13. Qi L, Wu XC, Zheng DQ. Hydrogen peroxide, a potent inducer of global genomic instability. //Curr Genet. 2019. № 65(4). P.913–917. D
14. Свиридова Д.А., Мачигов Э.А., Игонина Е.В., Жошибекова Б.С., Абилов С.К. Изучение механизма генотоксичности диоксида с помощью lux-биосенсоров *Escherichia coli* //Радиационная биология. Радиозекология. 2020, Т. 60. № 6. С. 595–603.
15. Дурнев А.Д. Середенин С.Б. Мутагены: (Скрининг и фармакол. профилактика воздействий). //М.: Медицина. 1998. 326 с. ISBN5–225–04429–8.
16. Дурнев А.Д., Дубовская О.Ю., Нигарова Э.А. и др. Роль свободных радикалов кислорода в механизме мутагенного действия диоксида // Хим.-фарм. журн. 1989. Т. 23. № 11. С. 1289–1291.
17. Середенин С.Б., Сазонтова Т.Г., Дурнев А.Д., Гусева Н.В. Влияние диоксида и циклофосфана на перекисное окисление липидов и активность супероксиддисмутазы и каталазы у мышей линий C57Bl/6 и BALB/c. // Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1996. Т. 121. № 5. С. 528–
18. Gami MS, Wolkow CA. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. //Aging Cell. 2006. № 5. P.31–7.
19. The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. //Science. 1998. № 282. P.2012–2018.
20. Culetto E, Sattelle DB. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. //Hum Mol Genet. 2000. № 9. P.869–77.
21. Muller HM, Kenny EE, Sternberg PW. Textpresso: an ontology-based information retrieval and extraction system for biological literature. //PLoS Biol. 2004. № 2: e309.
22. Hunt P.R. The *C. elegans* model in toxicity testing. //J. Appl. Toxicol. 2017. № 37. P.50–59.
23. Larigot L, Mansuy D, Borowski I, Coumoul X, Dairou J. Cytochromes P450 of *Caenorhabditis elegans*: Implication in Biological Functions and Metabolism of Xenobiotics Biomolecules. 2022. № 12. P. 342.

© Мачигов Эльбек Альбертович (elbek_machigov@mail.ru),

Джамбетова Петимат Махмудовна (petimat-ig@rambler.ru), Абилов Серикбай Каримович (abilev@vigg.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»