

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭПИХЛОРИДИНА С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРОВ *Escherichia coli* И МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ НА МЫШАХ

© 2021 г. К. Г. Орджоникидзе¹, Е. В. Игонина¹, Б. С. Жошибекова², С. К. Абилев^{1, *}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Казахский национальный женский педагогический университет, Алматы, 090000 Казахстан

*e-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 12.12.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята к публикации 26.01.2021 г.

Проведено сравнительное изучение генотоксических эффектов метилметансульфоната (ММС) и эпихлоргидрина (ЭХГ) с помощью бактериальных биосенсоров *E. coli* и метода ДНК-комет на мышах. Показано, что ЭХГ более слабо индуцирует SOS-ответ и экспрессию гена *alkA* в клетках бактерий, чем ММС. Эксперименты *in vivo* на мышах с использованием метода ДНК-комет показали ДНК-повреждающую активность ЭХГ и ММС в клетках печени, почек и легких при экспозиции 3 ч. Уровни повреждений ДНК, вызываемых ЭХГ в этих органах при экспозиции 3 ч, оказались ниже, чем для ММС. Генотоксический эффект ЭХГ при экспозиции 18 ч оказался статистически значимым только в клетках почек в дозе 20 мг/кг.

Ключевые слова: метилметансульфонат, эпихлоргидрин, генотоксичность, биосенсоры, *E. coli*, SOS-ответ, экспрессия гена *alkA*, ДНК-кометы, мыши.

DOI: 10.31857/S0016675821090083

Эпихлоргидрин (ЭХГ) является основным полупродуктом промышленного синтеза глицерина, красителей и поверхностно-активных веществ и для получения синтетических материалов (главным образом, эпоксидных и ионообменных смол) и полимеров, применяемых в различных областях промышленности, а также в медицине.

ЭХГ является высокореакционноспособным и высокотоксичным веществом, отравление которым приводит к тяжелым и часто смертельным последствиям, связанным с алкилированием сульфгидрильных, аминных, карбоксильных групп белков крови и поражением таких жизненно важных органов, как печень, почки, легкие и мозг [1]. По итогам обширных исследований токсичности, генотоксичности и канцерогенности ЭХГ на грызунах Международное агентство по изучению рака (IARC) в 90-е годы прошлого века включило его в число вероятных канцерогенов для человека — класс 2В [2]. ЭХГ, по данным IARC, вызывает злокачественные лимфомы, гиперплазии, папилломы и карциномы, подкожные фибромы, гипоплазии и легочные опухоли у грызунов, индуцирует повреждения и разрывы ДНК, проявляет мутагенную активность в различных тест-системах, включая бактериальные. Результаты этих исследований легли в основу ряда документов, регу-

лирующих условия его производства и применения, что привело к снижению уровня взаимодействия работников с ЭХГ. В настоящее время ежегодно в мире используется около двух млн тонн ЭХГ в производстве эпоксидных смол и полимеров [3].

Мутагенное действие ЭХГ на людей было показано еще в 70-е и 80-е годы XX в. при изучении хромосомных aberrаций в лимфоцитах работников, занятых на производстве [4–6]. Итоги изучения генотоксического действия ЭХГ на людей в период 1990–2001 гг. обобщены в обзоре [7]. Результаты изучения генотоксичности ЭХГ на лабораторных животных и на клеточных культурах приведены в работах [3, 8, 9].

ЭХГ содержит активную эпоксидную группу, которая реагирует с нуклеофильными сайтами ДНК и белков, а также хлоридную группу, которая может вступать в реакции с ДНК или белками. Эта особенность структуры ЭХГ придает ему свойства бифункционального алкилирующего агента, способного вызывать кросс-сшивки между нуклеофильными участками ДНК и белков, что и обуславливает его токсические и генотоксические эффекты [3, 10, 11]. В результате реакции эпоксидной группы ЭХГ в клетках образуются 3-хлор-2-гидроксипропиловые аддукты с белками и ДНК, что придает ему свойство монофункцио-

нального агента. Формирование стабильных аддуктов 2,3-дигидропропил-гемоглобин показано у крыс и человека после воздействия ЭХГ [12, 13].

В ДНК ЭХГ реагирует преимущественно с гуанином в позиции N-7 так же, как этилметансульфонат (ЭМС) и метилметансульфонат (ММС), которые получили широкое применение в качестве позитивного контроля в генотоксикологических исследованиях как *in vitro*, так *in vivo*. Гуанин, замещенный в позиции N-7, является преобладающим аддуктом ДНК, формирующимся при воздействии большинства алкилирующих агентов, и поэтому он является первым маркером воздействия подобных химических веществ. Другие аддукты, например, аддукты ЭХГ с N-3 аденином, могут быть более значимы биологически, однако из-за низких концентраций труднее их анализировать. Поэтому для определения профессионального воздействия ЭХГ на работников используется метод количественного определения 7-(3-хлор-2-гидроксипропил)-гуанина в лейкоцитах человека [13].

Соотношение кросс-сшивок и стабильных аддуктов, образуемых ЭХГ с белками и ДНК, зависит от экспериментальной системы. Так, цитотоксичность ЭХГ преимущественно считается следствием его способности вызывать кросс-сшивки с белками и ДНК, тогда как генотоксические эффекты ЭХГ могут быть следствием образования как аддуктов с ДНК, так и сшивок. В последнее время растет интерес к изучению генотоксичности ЭХГ. С одной стороны, это связано с тем, что несмотря на многочисленные исследования генотоксичности ЭХГ в 90-х годах прошлого века, есть не выясненные вопросы о механизме его генотоксичности. С другой — ежегодный рост производства ЭХГ на 4% с целью промышленного синтеза различных синтетических материалов обращает внимание исследователей на необходимость изучения эколого-генетических последствий загрязнения окружающей среды ЭХГ.

Целью настоящей работы является сравнительное изучение индукции ЭХГ и ММС в клетках *E. coli*, SOS-ответа на повреждение ДНК и алкилтрансферазы в ответ на алкилирование ДНК, а также разрывов ДНК во внутренних органах мышей методом ДНК-комет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения

Метилметансульфонат и эпихлоргидрин производства Sigma- Aldrich (США).

Бактериальные штаммы

В работе использовали два биосенсора на основе штамма *E. coli* K12: MG1655 (pColD-lux) и MG1655 (pAlkA-lux), несущего рекомбинантную

плазмиду с lux-опероном люминесцирующей бактерии *Photorhabdus luminescens* транскрипционно слитыми с промоторами гена колицина *col* (*cda*) и *alkA* соответственно. Биосенсор MG1655 (pColD-lux) люминесцирует в ответ на повреждение или остановку синтеза ДНК, то есть характеризует уровень SOS-ответа бактерий. MG1655 (pAlkA-lux) люминесцирует в результате активации промотора P_{alkA} в ответ на алкилирование ДНК.

Штаммы предоставлены Г.Б. Завильгельским и И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Москва). Генотип штамма и карта рекомбинантной плазмиды приведены в работе [14].

Процедура определения люминесценции биосенсоров

Культуры клеток *E. coli* выращивали на полноценной среде Лурия-Бертани (LB) с добавлением ампициллина в конечной концентрации 100.0 мкг/мл в течение ночи при температуре 37°C. Ночную культуру разбавляли свежей средой в 10 раз (1×10^6 клеток/мл). Измерения проводили на денситометре DEN-1B ("Biosan"). Затем суспензию подрачивали в течение 2 ч при 37°C на шейкере до ранней логарифмической фазы.

Для определения активных концентраций генотоксикантов аликвоты культуры (по 180 мкл) переносили в стерильные ячейки планшета, в них же добавляли индукторы в разных концентрациях в объеме 20 мкл, в качестве контроля использовали дистиллированную воду или соответствующий растворитель. Через 60 и 90 мин инкубации планшетов при 37°C проводили измерения люминесценции на микропланшетном ридере StatFax 4400, Awareness Technology Inc. (США).

Оценка генотоксичности на мышах *in vivo*

Для изучения ДНК-повреждающей активности ЭХГ и ММС в клетках различных органов мышей использовали метод ДНК-комет (Comet Assay). Эксперименты проводили *in vivo* согласно протоколу OECD 489 [15] и рекомендациям по *in vivo* Comet assay [16]. Метод основан на электрофоретической подвижности ДНК заранее лизированных и помещенных в агарозный гель клеток. Под влиянием электрического поля ДНК мигрирует к аноду в виде отдельных фрагментов или петель и формирует электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от количества разрывов в ДНК. Нами был использован щелочной вариант метода, позволяющий выявлять, помимо двухнитевых разрывов ДНК, одностранные разрывы и щелочно-лабильные сайты [17].

ЭХГ и ММС вводили мышам внутрибрюшинно в дозах 20 и 60 мг/кг. В качестве отрицательного контроля использовали воду. В каждой группе было

пять половозрелых самцов мышей линии BALB/c массой тела 25 г с экспозицией 3 и 18 ч.

Для получения гель-слайдов использовали предметные стекла, предварительно покрытые 1%-ным агарозным гелем (Sigma, тип II, США). Исследуемые клетки заключали в гель легкоплавкой агарозы (Sigma, тип VIIa, США), приготовленной на фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) при 37°C и наносили на подготовленные гель-слайды. После этого иммобилизованные клетки подвергали лизису (10 мМ Трис-HCl (pH 10), 2.5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА-Na, 1%-ный Тритон-X100 и 10%-ный диметилсульфоксид) при температуре 4°C в темноте в течение 1 ч.

Денатурацию ДНК в течение 20 мин и электрофорез проводили в щелочных условиях (0.3 М NaOH, 1 мМ ЭДТА-Na, pH 13; 25 В, 300 мА, 20 мин). После электрофореза препараты подвергали нейтрализации в течение 15 мин (0.4 М Tris-HCl pH 7.5), фиксировали и окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I. Анализ микропрепаратов проводили на флуоресцентном микроскопе "Axioplan 2 Imaging" (Carl Zeiss, Germany) с использованием высокочувствительной камеры CV-M4+CL (JAI, Japan) и программного обеспечения Comet Imager 2.0. В качестве показателя поврежденности ДНК, в соответствии с рекомендациями OECD [15–17], использовали процентное содержание ДНК в хвосте кометы, отражающее относительное количество фрагментов ДНК, мигрирующих к аноду при электрофорезе. От каждого животного анализировали не менее 100 клеток печени, почек и легких на процент ДНК в хвосте кометы и подсчитывали среднее значение медианы по группе. Согласно рекомендациям OECD 489 Guideline (2016), медиана процентного содержания ДНК в хвосте комет определялась для каждого животного (не менее 100 клеток на животное, полученных с двух слайдов), после чего подсчитывалось среднее значение медианы по группе.

Статистическая обработка

Все данные, полученные с использованием биосенсоров, подвергали статистической обработке с вычислением среднего значения и его ошибки. Значимость различий средних значений оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Для статистической обработки данных, полученных методом ДНК-комет, использовали непараметрический тест Манна-Уитни и программу SPSS Statistics v.25.

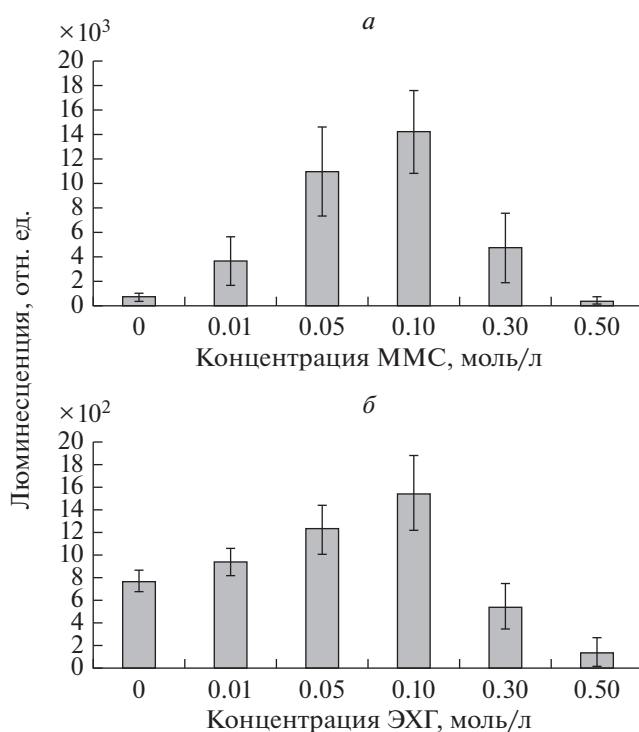


Рис. 1. Индукция MMC (a) и ЭХГ (б) SOS-ответа у биосенсора MG1655 (pColD-lux).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение генотоксичности на *E. coli*

Известно, что алкилирующие химические соединения обладают генотоксическими свойствами и индуцирует SOS-ответ в клетках *E. coli* [18, 19]. В индукции SOS-ответа важную роль играют продукты генов *lexA* и *recA*, а также наличие однонитевых разрывов в ДНК, которые возникают как при прямой индукции разрывов, так и при блокировании синтеза повреждающими ДНК агентами [20]. Из наших результатов, представленных на рис. 1, следует, что MMC и ЭХГ индуцируют SOS-ответ у биосенсора MG1655 (pColD-lux), и это свидетельствует об их способности повреждать ДНК. Однако уровень отклика у биосенсора MG1655 (pColD-lux) на воздействие MMC был на порядок выше, чем у ЭХГ. Например при концентрации в 0.1 моль/л люминесценция при действии ЭХГ составила 1500 отн. ед., тогда как при действии MMC — 14000 отн. ед.

Для изучения способности MMC и ЭХГ алкилировать ДНК был использован биосенсор MG1655 (pAlkA-lux), который люминесцирует при индукции гена *adaA* в ответ на алкилирование ДНК [21]. Из рис. 2 видно, что MMC активно индуцирует экспрессию гена *adaA*, тогда как ЭХГ является слабым индуктором этого гена. Сравнение количественных показателей индукции люминесценции, характеризующих уровень экспрессии гена *adaA*,

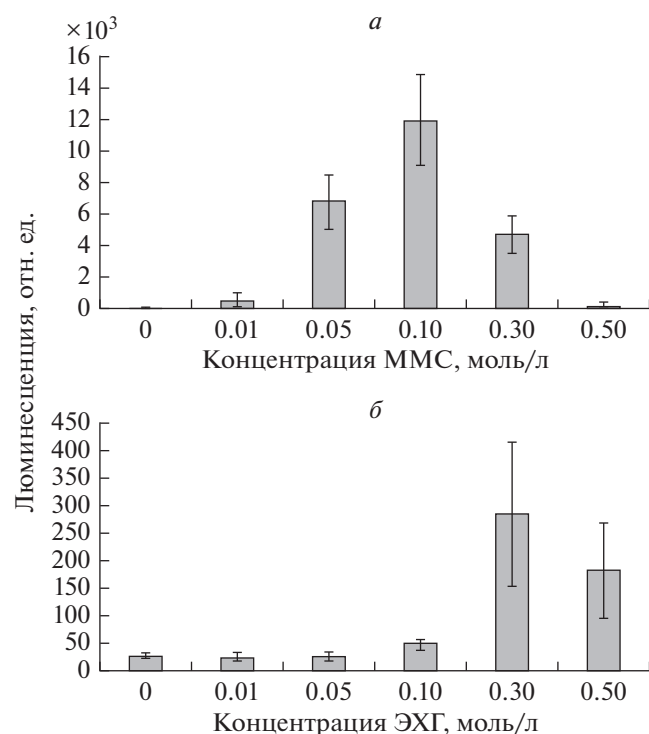


Рис. 2. Индукция ММС (а) и ЭХГ (б) алкилтрансферазы у биосенсора MG1655 (pAlkA-lux).

показало, что при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л интенсивность люминесценции составляет 12000 отн. ед., тогда как при действии ЭХГ статистически значимая индукция люминесценции происходит в концентрациях 0.3 и 0.5 моль/л. При этом максимальная интенсивность люминесценции при действии ЭХГ и концентрации 0.3 моль/л составляет 285 отн. ед., что в 42 раза меньше люминесценции MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л.

lux) при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л.

Важным показателем индукции люминесценции является амплитуда ответа биосенсора, то есть отношение показателя люминесценции при действии изучаемого фактора к показателю спонтанного уровня люминесценции биосенсора в контроле. Амплитуда ответа биосенсора MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС составила 480 отн. ед., при действии ЭХГ — 10.

Определение генотоксичности в клетках внутренних органов мышей

В работе анализировали уровень поврежденности ДНК в клетках печени, почек и легких мышей, получавших ММС и ЭХГ в дозах 20 и 60 мг/кг и 3 и 18 ч экспозиции. В качестве показателя уровня поврежденности ДНК определяли процентное содержание (%) ДНК в хвосте «кометы». Этот показатель характеризует количество ДНК, высвободившееся из ядра при электрофорезе и мигрирующего в сторону анода (хвост кометы). Такое поведение ДНК является результатом как спонтанных и индуцированных разрывов в цепи ДНК, так и щелочелabileных апуриновых и апиримидиновых сайтов, которые при щелочном электрофорезе реализуются в разрывы. Полученные результаты приведены в табл. 1. ММС и ЭХГ в дозах 20 и 60 мг/кг при 3 ч экспозиции достоверно повышали показатель содержания (%) ДНК в хвосте кометы в клетках печени, почек и легких мышей по сравнению с контролем. ММС проявил генотоксичность и при 18 ч экспозиции в обеих дозах. ЭХГ, в отличие от ММС, при 18 ч экспозиции проявил активность только в клетках почек мышей в дозе 20 мг/кг.

Более детальный анализ полученных данных приведен на диаграммах «ящик с усами» (Box

Таблица 1. ДНК-повреждающее действие ММС и ЭХГ в клетках печени, почек и легких мышей

Экспозиция	Вариант	Печень, % ДНК в хвосте	Почки, % ДНК в хвосте	Легкие, % ДНК в хвосте
3 часа	Контроль, вода	7.98 ± 0.66	5.39 ± 1.13	4.19 ± 0.36
	ММС, 20 мг/кг	28.83 ± 6.61**	38.77 ± 6.48**	39.61 ± 6.12**
	ММС, 60 мг/кг	36.68 ± 8.26**	51.58 ± 11.45**	62.88 ± 3.37**
	ЭХГ, 20 мг/кг	17.17 ± 0.93**	12.28 ± 1.46**	7.70 ± 0.53**
	ЭХГ, 60 мг/кг	19.08 ± 1.01**	14.43 ± 1.21**	10.60 ± 1.40*
18 часов	Контроль, вода	14.83 ± 1.54	8.75 ± 0.33	7.06 ± 0.75
	ММС, 20 мг/кг	27.23 ± 1.40**	28.37 ± 0.91**	25.17 ± 2.51**
	ММС, 60 мг/кг	37.72 ± 1.58**	36.32 ± 2.00**	36.99 ± 2.36**
	ЭХГ, 20 мг/кг	13.71 ± 0.89	17.74 ± 5.15*	10.16 ± 2.26
	ЭХГ, 60 мг/кг	11.94 ± 1.03	10.48 ± 1.18	7.89 ± 0.29

Примечание. Значимость отличия между вариантами эксперимента: контроль (вода) и ММС или ЭХГ: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Plot) (рис. 3), которые позволяют проводить сравнение результатов, полученных при различных сроках экспозиции ММС и ЭХГ для различных органов мышей по таким показателям, как медиана, минимальное и максимальное значение выборки и выбросы, и распределение по квартилям. На рис. 3 представлено распределение числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы” клеток печени мыши. Для ММС, в отличие от ЭХГ, наблюдается разброс числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы” от 17 до 40 в случае дозы 20 мг/кг и от 27 до 50 в случае дозы 60 мг/кг. ЭХГ в обеих дозах при экспозиции 18 ч не проявил активности. ММС при экспозиции 18 ч был менее активен, чем при трехчасовой экспозиции, однако в дозе 60 мг/кг был более активен, чем в дозе 20 мг/кг.

В почках наблюдается такая же картина. Однако при трехчасовой экспозиции ММС в дозе 60 мг/кг показал высокую активность с большим разбросом числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы”. ЭХГ при экспозиции 3 ч был менее активен, чем ММС, но значимо отличался от контроля. ЭХГ не проявил активности в дозе 60 мг/кг при 18 ч экспозиции, однако ММС проявил высокую активность. Отмечены выбросы как ММС, так и у ЭХГ, при обеих сроках экспозиции. В легких ММС в дозе при экспозиции 3 ч проявил высокую активность с небольшим разбросом числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы”. ЭХГ повторил картину, полученную на почках. При 18-часовой экспозиции оба соединения показали такую же картину, как на почках. Зафиксированы выбросы как в большую, так и меньшую сторону.

ОБСУЖДЕНИЕ

Алкилирующие вещества по кинетике реакций с биологическими молекулами делятся на два типа: SN1 и SN2. ММС относится к типу SN2 и преимущественно реагирует с одонитевой ДНК, приводя к образованию N1-метиладенина и N3-метилцитозина, а при воздействии на двунитевую ДНК, как правило, в 70–80% случаев метилирует N7-позицию гуанина [22, 23]. N³-метиладенин, который является вторым по распространенности продуктом алкилирования двунитевой ДНК, удаляется из нее 3-метиладенин-ДНК-гликозилазой, продуктом гена *adaA*, экспрессия которого контролируется сенсорным белком Ada. Поэтому уровень экспрессии гена *adaA*, регистрируемый по люминесценции биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux), отражает уровень индукции белка Ada в ответ на алкилирование. У *E. coli* белку Ada присущи две функции – репарационная (репарация O6-алкилгуанина и O4-метилтимина) и регуляторная (усиление транскрипции) четырех генов *ada*-регулона – *ada*, *alkA*, *alkB*

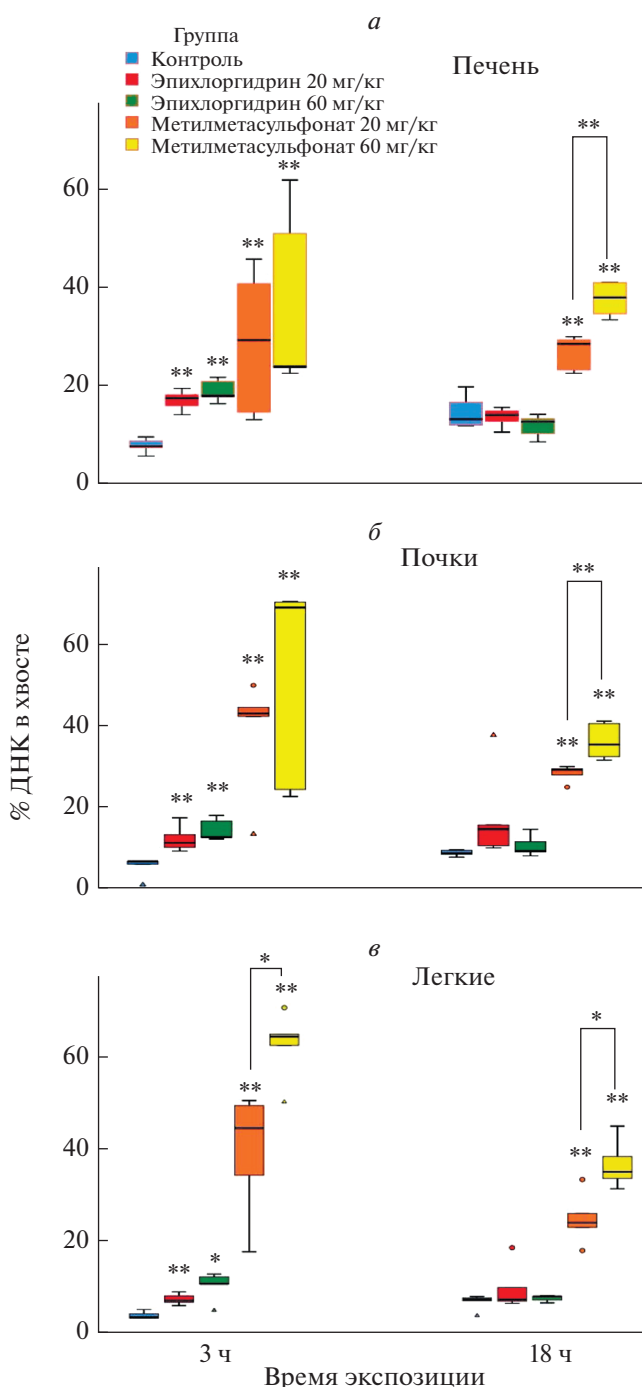


Рис. 3. Результаты анализа индукции ММС и ЭХГ ДНК-комет в клетках печени (а), почек (б) и легких (в) мышей.

и *aid*. Активация белка Ada, как регулятора транскрипции, происходит в результате его алкилирования. Метилирование N-Ada домена приводит к повышению аффинности этого белка к промоторным участкам Ada-регулона и превращает его в сильный транскрипционный активатор [23–25]. Данное свойство белка Ada может быть при-

чиной большой разницы между ММС и ЭХГ в индукции люминесценции у *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux). В наших экспериментах ММС в концентрации 0.1 моль/л вызвала интенсивность люминесценции *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux), что составило 14 000 отн. ед., тогда как при действии ЭХГ в концентрации 0.3 моль/л — 285 отн. ед., что в 42 раза меньше люминесценции MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л.

Если сравнивать отношение показателя люминесценции при действии изучаемых соединений к показателю спонтанного уровня люминесценции биосенсора в контроле, то ответ биосенсора MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС составил 480, а при действии ЭХГ — 10. ММС может алкилировать как ДНК, так и белки путем прямого переноса метильной группы на сайты алкилирования, тогда как ЭХГ образует как аддукты, так и сшивки. Последнее обстоятельство может резко снизить аффинность белка Ada к промоторным участкам Ada-регулона, что приводит к резкому снижению экспрессии гена *alkA*.

В наших экспериментах *in vivo* методом ДНК-комет на мышах ММС и ЭХГ статистически значимо повышали уровень содержания ДНК в хвосте кометы по сравнению с контролем в клетках печени, почек и легких при экспозиции 3 ч в дозах 20 и 60 мг/кг. Однако генотоксический эффект ЭХГ при экспозиции 18 ч оказался статистически значимым только в клетках почек в дозе 20 мг/кг. ММС при экспозиции 18 ч, в отличие от ЭХГ, проявил генотоксичность во всех органах и в обеих дозах (табл. 1). Уровень повреждений ДНК, вызываемый ЭХГ в клетках печени при экспозиции 3 ч, оказался ниже, чем для ММС, что может быть следствием биотрансформации ЭХГ в печени.

Результаты изучения органной специфичности ММС согласуются с результатами ранее опубликованного исследования методом ДНК-комет [26]. В этой работе было показано, что ММС вызывает повреждения ДНК в клетках печени, почек и костного мозга при экспозиции 4 и 24 ч. При этом при экспозиции 4 ч генотоксичность ММС была выше, чем при экспозиции 24 ч, что может быть следствием процессов детоксикации и репарации, которые приводят к снижению общего количества поврежденных клеток.

Исследование генотоксичности методом ДНК-комет на восьми органах мышей 22 монофункциональных алкилирующих агентов и десяти кросс-сшивателей показали, что все тестированные химические агенты показали генотоксичность по крайней мере в одном органе. Кросс-сшиватели, включая ЭХГ, показали более высокую активность в клетках органов желудочно-кишечного тракта по сравнению с печенью и легкими [27]. Сравнительное исследование цитотоксичности противоопу-

холевого препарата метхлорамина (МХА) диэпоксибутана (ДЭБ) и ЭХГ на культуре человеческих лейкемических клеток HL-60 методом ДНК-комет показало, что цитотоксичность их зависит от концентрации и продолжительности воздействия. По цитотоксичности они располагались в следующем порядке: МХА > ДЭБ > ЭХГ, который коррелировал с уровнем кросс-сшивков ДНК–ДНК и ДНК–белок в клетках. ЭХГ вызывал меньше сшивков, чем ДЭБ, однако они отличались стабильностью, что может привести к блокировке клеточного цикла и последующего запуска апоптоза. Проведенные количественные эксперименты с использованием ПЦР в реальном времени показали, что обработка клеток HL-60 ДЭБ и ЭХГ приводит к усилению экспрессии ряда генов, участвующих во внутреннем (митохондриальном) пути апоптоза [10].

Исследование скорости репарации разрывов ДНК, индуцированных ЭХГ, в культуре фибробластов человека выявило, что в течение 2 ч после воздействия низкой концентрации (0.1 мМ) восстанавливается до 50%, а при высокой концентрации (0.2 мМ) — 26% двунитевых разрывов. Однако через 18 ч после воздействия ЭХГ в низкой концентрации восстановление разрывов ДНК было незначительным, при более высокой концентрации наблюдалось быстрое накопление двунитевых разрывов, что, вероятно, является результатом апоптоза клеток и деградации ДНК [28].

В конечном генотоксическом эффекте ЭХГ, особенно в экспериментах *in vivo* с грызунами, большую роль играет его биотрансформация, спектр и уровень которой разнятся по органам, а также скорость репарации разрывов ДНК. Например эпоксидгиролаза способна инактивировать ЭХГ [29, 30]. Низкий уровень показателя “% ДНК в хвосте кометы” при экспозиции 18 ч ЭХГ в высокой дозе может быть следствием большого количества сшивков, приведших как к апоптозу клеток, так и инактивацией его эпоксидгидролазой.

Таким образом, сравнительное изучение генотоксических эффектов ММС и ЭХГ с помощью бактериальных биосенсоров *E. coli* показало, что ЭХГ более слабо индуцирует SOS-ответ и экспрессию гена *alkA* в клетках бактерий, чем ММС. В экспериментах *in vivo* на мышах с использованием метода ДНК-комет ЭХГ показал ДНК-повреждающую активность в клетках печени, почек и легких при экспозиции 3 ч, так же, как и ММС. При этом ДНК-повреждающая активность ЭХГ оказалась ниже, чем активность ММС. ЭХГ при экспозиции 18 ч проявил ДНК-повреждающую активность только в дозе 20 мг/кг и в клетках почек. Отсутствие генотоксического эффекта ЭХГ в дозе 60 мг/кг в печени и легких мышей может быть следствием процессов биотрансформации его в этих органах или следствием апоптоза и де-

градации ДНК, вызванных большим количеством сшивок.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта людей.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawrence W.H., Malikj M., Autian J. Toxicity profile of epichlorohydrin // *J. Farm. Sci.* 1972. V. 61. № 11. P. 1712–1717.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epichlorohydrin. Lyon, France: IARC, 1999. V. 71. P. 603–628.
3. Passang T., Millard J.T. Epichlorohydrin-induced DNA-protein cross-links in human leukemia cells // *FASEB J.* 2019. V. 33.1. Suppl. 457–517. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1supplement.457.17>
4. Kučerová, M., Zhurkov, V.S., Polívková, Z. et al. Mutagenic effect of epichlorohydrin. II. Analysis of chromosomal aberrations in lymphocytes of persons occupationally exposed to epichlorohydrin // *Mutat. Res.* 1977. V. 48. P. 355–360. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(77\)90178-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(77)90178-6)
5. Šrám R.J., Zudová Z., Kuleshov N.P. Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in workers occupationally exposed to epichlorohydrin // *Mutat. Res.* 1980. V. 70. P. 115–120. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(80\)90064-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(80)90064-0)
6. Šrám R.J., Tomatis L., Clemmesen J., Bridges B.A. An evaluation of the genetic toxicity of epichlorohydrin. A report of an expert group of the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens // *Mutat. Res.* 1981. Nov. V. 87(3). P. 299–319.
7. Kolman A., Chovanec M., Goltar O.S. Genotoxic effects of ethylene oxide, propylene oxide and epichlorohydrin in humans: Update review (1990–2001) // *Mutat. Res./Rev. in Mutat. Res.* 2002. V. 512. P. 173–194.
8. Giri A.K. Genetic toxicology of epichlorohydrin: A review // *Mutat. Res.* 1997. V. 386. № 1. P. 25–38. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(96\)00042-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(96)00042-7)
9. Rossi A.M., Migliore L., Lascialfari D. et al. Genotoxicity, metabolism and blood kinetics of epichlorohydrin in mice // *Mutat. Res.* 1983. V. 118. № 3. P. 213–226. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(83\)90144-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(83)90144-1)
10. Phuong M. Le, Silvestri V.L., Redstone S.C. et al. Cross-linking by epichlorohydrin and diepoxybutane correlates with cytotoxicity and leads to apoptosis in human leukemia (HL-60) cells // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018. V. 352. P. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.020>
11. Romano K.P., Newman A.G., Zahran R.W. et al. DNA interstrand cross-linking by epichlorohydrin // *Chem. Res. Toxicol.* 2007. V. 20. № 5. P. 832–838. <https://doi.org/10.1021/tx700066h>
12. Hindso Landin H., Segerbäck D., Damberg C. et al. Adducts with haemoglobin and with DNA in epichlorohydrin-exposed rats // *Chem. Biol. Interact.* 1999. V. 117. P. 49–64. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(98\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(98)00099-4)
13. Plna K., Osterman-Goltar S., Nogradi E. et al. 32P-post-labeling of 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-guanine in white blood cells of workers occupationally exposed to epichlorohydrin // *Carcinogenesis.* 2000. V. 21. № 2. P. 275–280. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.2.275>
14. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 16–25. <https://doi.org/10.1134/S0003683810080089>
15. OECD. Test № 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2016. 26 p.
16. Tice R.R., Agurell E., Anderson D. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing // *Environ. Mol. Mutagen.* 2000. V. 35. № 3. P. 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<0.CO;2-J)
17. Hartmann A., Agurell E., Beevers C. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay // *Mutagenesis.* 2003. V. 18. № 1. P. 45–51. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>
18. Игоница Е.В., Марсова М.В., Абилов С.К. Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // *Экол. генетика.* 2016. Т. 14. С. 52–62. <https://doi.org/10.17816/ecogen14452-62>
19. Manukhov I.V., Kotova V.Yu., Zavilgelsky G.B. Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // *Mutat. Res.* 2007. V. 634. P. 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.07.012>
20. Завильгельский Г.Б. SOS-репарации 60 лет // *Мол. биология.* 2013. Т. 17. № 5. С. 699–706. <https://doi.org/10.7868/S0026898413050224>
21. Sedgwick B., Bates P.A., Paik J. et al. Repair of alkylated DNA: Recent advances // *DNA Repair.* 2007. V. 6. № 4. P. 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.005>
22. Mielecki D., Grzesiuk E. Ada response – a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 355. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1111/1574-6968>
23. Sakumi K., Igarashi K., Sekiguchi M. et al. The Ada protein is a class I transcription factor of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 2455–2457. <https://doi.org/10.1128/jb.175.8.2455-2457.1993>
24. Landini P., Volkert M.R. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: A simple regulon with complex regulatory features // *J. Bacteriology.* 2000. V. 182. № 23. P. 6543–6549. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6543-6549.2000>
25. Mielecki D., Wrzesiński M., Grzesiuk E. Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms // *Mutat. Res.*

2015. V. 763. P. 294–305. Epub 2014 Dec 19.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.12.001>
26. Oshida K., Iwanaga E., Miyamoto-Kuramitsu K., Miyamoto Y. An *in vivo* comet assay of multiple organs (liver, kidney and bone marrow) in mice treated with methyl methanesulfonate and acetaminophen accompanied by hematology and/or blood chemistry // J. Toxicol. Sci. 2008. V. 33. № 5. P. 515–524.
<https://doi.org/10.2131/jts.33.515>
27. Tsuda S., Matsusaka N., Madarame H. et al. The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs: Results with 22 mono-functional alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers // Mutat. Res. 2000. Apr 13. V. 467(1). P. 83–98.
[https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(00\)00014-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00014-0)
28. Chovanec M., Näslund M., Spivak I. et al. Rejoining of DNA strand breaks induced by propylene oxide and epichlorohydrin in human diploid fibroblasts // Environ. and Mol. Mutagenesis. 1998. V. 32. № 3. P. 223–228.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1998\)32:3<223::aid-em4>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1998)32:3<223::aid-em4>3.0.co;2-9)
29. Rossi A.M., Migliore L., Lascialfari D. et al. Genotoxicity, metabolism and blood kinetics of epichlorohydrin in mice // Mutat. Res. 1983. V. 118. № 3. P. 213–226.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(83\)90144-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(83)90144-1)
30. Rossi A.M., Migliore L., Loprieno N. et al. Valuation of epichlorohydrin (ECH) genotoxicity: Microsomal epoxide hydrolase-dependent deactivation of ECH mutagenicity in *Schizosaccharomyces pombe in vitro* // Mut. Res./Fund. and Mol. Mechanisms of Mutagenesis. 1983. V. 109. Iss. 1. P. 41–52.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(83\)90093-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(83)90093-3)

Comparative Study of the DNA-Damaging Activity of Epichlorohydrin Using *Escherichia coli* Biosensors and the Method of DNA Comets in Mice

K. G. Ordzhonikidze^a, E. V. Igonina^a, B. S. Zhoshibekova^b, and S. K. Abilev^{a,*}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bKazakh National Women's Teacher Training University, Almaty, 090000 Kazakhstan

*e-mail: abilev@vigg.ru

A comparative study of the genotoxic effects of methylmethanesulfonate (MMC) and epichlorohydrin (ECH) was performed using bacterial *E. coli* biosensors and the DNA comet method in mice. ECH has been shown to induce an SOS response and expression of the *alkA* gene in bacterial cells more weakly than MMC. *In vivo* experiments on mice using the DNA comet method showed DNA-damaging activity of ECH in liver, kidney, and lung cells at 3 h exposure, as well as MMC. The levels of DNA damage caused by ECH in these organs at 3 h exposure were lower than for MMC. The genotoxic effect of ECH at 18 h of exposure was statistically significant only at a dose of 20 mg/kg and in kidney cells, which may be a consequence of ECH biotransformation in the liver.

Keywords: methylmethanesulfonate, epichlorohydrin, genotoxicity biosensors, *E. coli*, SOS response, *alkA* gene expression, comet assay, mice.