

НЕМАТОДА *Caenorhabditis elegans* КАК ОБЪЕКТ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2024 г. С. К. Абилов^{1, *}, Э. М. Мачигов¹, С. В. Смирнова¹, М. В. Марсова¹

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

*e-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 04.03.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

В связи с требованиями международных и национальных организаций к соблюдению принципов гуманизации экспериментов с использованием животных проводится поиск и апробация альтернативных тест-систем для замены животных в эколого-токсикологических и генотоксикологических исследованиях. Одной из таких альтернатив может быть нематода *Caenorhabditis elegans*, которая обладает системой биотрансформации химических соединений, аналогичной системе млекопитающих. Проведено изучение генотоксичности пестицида параквата и антибактериального средства фурацилина на *C. elegans* методом горизонтального гель-электрофореза тотальной ДНК с целью оценки ее целостности. Показано, что паракват в концентрациях 0,01 моль/л и фурацилин в концентрациях 0,0001 и 0,00025 моль/л индуцировали разрывы ДНК в клетках нематоды. Антиоксидант N-ацетилцистеин в концентрации 0,01 моль/л снижал генотоксичность обоих соединений.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, разрывы ДНК, гель-электрофорез, паракват, фурацилин, N-ацетилцистеин.

DOI: 10.31857/S0016675824090027 **EDN:** AFAVQL

В биомедицинских исследованиях основными модельными объектами являются лабораторные животные. С их помощью исследователи изучают функционирование организма как в норме, так и при развитии патологий, разрабатывают эффективные методы лечения и лекарственные препараты, моделируя болезни человека на релевантных животных тест-системах. Такое использование животных вызывает беспокойство в обществе, обращая внимание на этичность проводимых исследований из-за потенциальной возможности причинения боли и дистресса вовлеченным животным. В этой связи в 1959 г. была предложена концепция гуманного использования лабораторных животных в экспериментах, получившая название **3Rs**: Replacement (замена), Reduction (сокращение), Refinement (усовершенствование) [1].

«Замена» включает методы, позволяющие заменить использование животных тест-системами *in silico*, *invitro*, *ex vivo*, *in ovo* или *in vivo*, но с использованием животных более низкого филогенетического уровня и социальной значимости, например, беспозвоночных. «Сокращение» предполагает применение методов, позволяющих получить максимальный результат при использовании минимального (но достаточного) количества животных, например, совершенствованный дизайн

экспериментов, применение современных методов визуализации, обмен данными и ресурсами. «Усовершенствование» относится к процедурам, которые сводят к минимуму боль, страдание, дистресс или причинение длительного вреда животным путем обучения персонала, мониторинга состояния животных, применения анестезии и др.

Растет обеспокоенность по поводу ненадлежащего качества дизайна экспериментов и отсутствия прозрачной отчетности, которые способствуют частым неудачам доклинических исследований на животных в разработке методов лечения заболеваний человека. В 2010 г. были введены руководящие принципы «Исследования на животных: отчетность об экспериментах *in vivo*» (ARRIVE-Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), помогающие улучшить стандарты отчетности в этой области [2].

Для понимания степени внедрения этих принципов гуманизации экспериментов на животных в практику предклинических исследований был проведен анализ 3Rs-отчетности 500 доклинических исследований на животных за период с 2009 по 2018 гг. [3]. Только в двадцати одном исследовании было указано на соответствие руководящим принципам ARRIVE или аналогичным без раскрытия

деталей. Авторы данного анализа утверждают, что принципы **3Rs** в процедуры доклинических исследований внедряются крайне недостаточно и поэтому нужны другие стратегии их внедрения в практику доклинических исследований, например, образование, междисциплинарное сотрудничество и инициативы по финансированию **3Rs**.

В качестве замены животных в эколого-токсикологических и генотоксикологических исследованиях предложено использовать *Caenorhabditis elegans* для выяснения потенциальной токсичности и генотоксичности исследуемого фактора или химического соединения для млекопитающих [4, 5].

Caenorhabditis elegans — свободноживущая нематода размером около 1 мм в длину, предпочтительно обитающая в почве, богатой бактериями, которыми она питается. В лабораторных условиях она культивируется на плотной питательной среде с *E. coli* в качестве питательного субстрата. Ряд открытий, сделанных при помощи *C. elegans*, были удостоены трех Нобелевских премий: в 2002 г. за работы, посвященные генетической регуляции развития органов и программированной клеточной гибели, в 2006 г. за открытие РНК-интерференции — эффекта гашения активности определенных генов и в 2008 г. за работу по исследованию зеленого флуоресцентного белка (GFP) [5]. Геном нематоды был полностью секвенирован в 1998 г. [6]. Установлено, что 12 из 17 известных сигнальных путей, среди которых тирозинкиназный, серин-треониновый пути и другие, консервативны как у человека, так и у *C. elegans* [4].

Для генотоксикологических исследований “метод Комет” (Comet assay), который широко используется на мышах, был адаптирован для изучения повреждений ДНК в клетках генеративной линии *C. elegans* генотоксичными химическими соединениями [7]. Это связано с тем, что она является многоклеточным эукариотическим организмом и обладает системой биотрансформации химических соединений, аналогичной системе млекопитающих [8, 9]. Ранее нами было показано, что воздействие на *C. elegans* алкилирующим агентом бета-пропиолактоном (БПЛ) в диапазоне концентраций 0,00015–0,015 моль/л в течение 2 ч вызывает разрывы ДНК, начиная с концентрации 0,0015 моль/л. В свою очередь, антиоксидант N-ацетилцистеин (АЦЦ) снижал ДНК-повреждающую активность БПЛ в клетках нематоды [10].

Цель настоящей работы — изучение индукции паракватом и фурацилином разрывов ДНК в клетках *C. elegans* Bristol N2 и влияния антиоксиданта АЦЦ на уровень генотоксических воздействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические препараты. Все использованные химические вещества были аналитической чистоты. Паракват (N,N'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорид) производства компании Sigma Aldrich (США), N-ацетилцистеин (АЦЦ) — компании Serva и фурацилин (семикарбазон 5-нитрофулфурола) фармакопейный — ОАО “Ирбитский химфармзавод”. Все необходимые разведения веществ готовили ex tempore.

Культивирование нематод. В работе использовали нематоду *C. elegans* Bristol N2, которую выращивали при 21 °С на твердой агарозной NGM-среде. В качестве питания использовали штамм *E. coli* OP50 в виде газона по описанному методу [11].

Для синхронизации поколения разросшуюся на чашке Петри популяцию нематод пипетировали в стерильной воде до получения взвеси нематод и яиц. Переносили 3,5 мл взвеси в пробирку и добавляли 1,5 мл свежеприготовленной смеси (0,5 мл 5M NaOH + 1 мл 5% HClO₄). Перемешивали и вортиксовали 10 мин, затем центрифугировали 30 с при 1300g и удаляли супернатант. Затем промывали осадок, добавляя 5 мл воды, центрифугируя и удаляя супернатант, промывку повторяли три раза. Затем 0,1 мл суспензии яиц нематод переносили на чашку с NGM-агаром и газоном бактерий *E. coli* OP50. Выращивание синхронизированных нематод проводили при 21 °С в течение трех суток до достижения стадии L4 (“young adult”).

Проведение эксперимента и выделение ДНК нематод. Для проведения эксперимента червей смывали с чашек стерильной водой в 1,5 мл пробирки, осаждали на вортексе и сливали супернатант. К осадку добавляли паракват или фурацилин в разных концентрациях, пипетировали до образования взвеси и инкубировали 120 мин при 21 °С. Затем взвесь нематод центрифугировали 5 мин при 2300g и удаляли супернатант, добавляли 1 мл стерильной воды и пипетировали до получения взвеси. Далее нематод промывали 10 раз с целью освобождения кишечника червей от бактерий по ранее описанному методу [7, 11]. При последней промывке избыток воды удаляли, оставляя 1 мл смеси вода/нематоды, затем переносили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 12100g в течение 10 мин. Супернатант сливали, а гранулу подвергали заморозке при –20 °С, после чего механически измельчали палочкой с абразивной поверхностью наконечника. Далее выделение ДНК проводили с использованием специального набора реагентов по протоколу Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Все этапы выделения ДНК нематод для электрофореза подробно описаны [10, 11]. Для электрофореза 1%-ный агарозный гель (0,01% бромид этидия) помещали в камеру с 10%-ным ТВЕ-буфером и

переносили в лунки геля по 20 мкл выделенной ДНК нематоды. Электрофорез проводили при 100 мА, 120 В, 80 Вт. Визуализацию результатов электрофореза ДНК нематоды осуществляли с помощью трансиллюминатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Паракват, четвертичный азотный гербицид, является высокотоксичным соединением для людей и животных, за последние несколько десятилетий было зарегистрировано много случаев острого отравления им и смерти. Основной причиной смерти при отравлении паракватом является дыхательная недостаточность из-за окислительного повреждения альвеолярного эпителия с последующим облитерирующим фиброзом [12]. При накоплении в клетках паракват подвергается NADPH-зависимому одноэлектронному восстановлению с образованием свободного радикала, который почти мгновенно вступает в реакцию с молекулярным кислородом, преобразуя катион и одновременно образуя супероксид-анион радикал. Дальнейшее восстановление супероксида в конечном итоге приводит к образованию наиболее реакционноспособного гидроксильного радикала, способного повреждать жизненно важные клеточные компоненты [13, 14].

В наших экспериментах (рис. 1) паракват индуцировал разрывы ДНК в клетках *C. elegans* при 90 мин воздействия в концентрациях 0,01, 0,025 и 0,05 моль/л (дорожки 7–9). В качестве позитивного контроля была использована перекись водорода (дорожка 10), вызывающая однонитевые разрывы в ДНК.

Паракват при низких концентрациях 0,0005, 0,001, 0,0025 и 0,005 моль/л не показал заметного влияния на целостность генетического материала нематоды, тогда как увеличение его концентрации от 0,01 до 0,05 моль/л последовательно усиливало картину фрагментации ДНК, что проявлялось в увеличении пути, пройденного фрагментированным генетическим материалом. Перекись водорода, использованная в качестве позитивного контроля в концентрации 0,1 моль/л, вызывала разрывы ДНК в наибольшей степени. Токсичность и генотоксичность параквата связана с генерацией им активных форм кислорода в клетках в результате циклического окисления и восстановления [14, 15]. В настоящее время не существует фармакологических антагонистов параквата и хелатирующих агентов, способных связывать его в крови или в других тканях. Поэтому лечение отравления паракватом до сих пор остается в основном поддерживающим и направлено на ослабление его токсических эффектов с помощью антиоксидантов [12]. В нашей работе антиоксидант АЦЦ снижал количество разрывов ДНК нематоды, вызываемых паракватом в концентрации 0,05 моль/л (рис. 2).

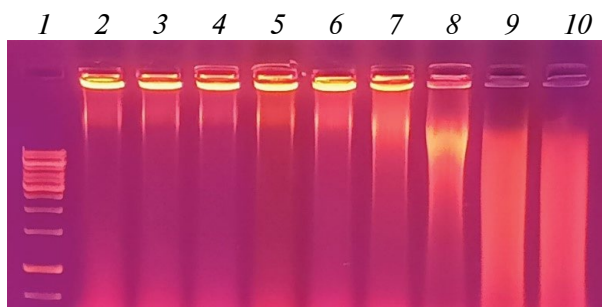


Рис. 1. Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию параквата в разных концентрациях (моль/л). 1 – маркер, 2 – вода (контроль), 3 – 0,0005, 4 – 0,001, 5 – 0,0025, 6 – 0,005, 7 – 0,01, 8 – 0,025, 9 – 0,05, 10 – перекись водорода 0,1 моль/л (положительный контроль).

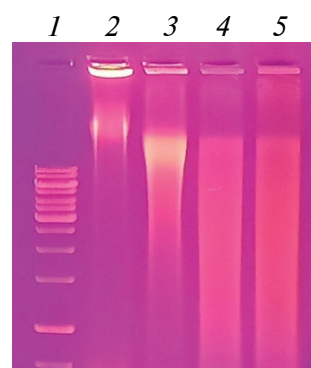


Рис. 2. Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию параквата в концентрации 0,05 и АЦЦ в концентрациях 0,01 и 0,001 моль/л: 1 – маркер, 2 – вода (отрицательный контроль), 3 – паракват 0,05 + АЦЦ 0,01, 4 – паракват 0,05 + АЦЦ 0,001, 5 – паракват 0,05 моль/л.

Фурацилин – антисептическое средство, действующим веществом которого является нитрофура-
л, относящийся к группе нитрофуранов. Проти-
вомикробными свойствами обладают только сое-
динения, содержащие нитрогруппу (NO_2) строго
в пятом положении фуранового цикла. Активный
фрагмент представляет собой 5-нитро-2-фурил,
который восстанавливается бактериальными ни-
троредуктазами с образованием гидроксиламинового
соединения [16]. Последнее в результате ряда фер-
ментативных реакций образует супероксид-анион
радикал, являющийся начальным звеном образо-
вания в клетке других свободных радикалов, спо-
собных легко реагировать с клеточными макромо-
лекулами. В результате нарушается процесс клеточ-
ного дыхания бактерий и биосинтез нуклеиновых
кислот. Нитрофурановые соединения проявляют

мутагенную активность на бактериях в тесте Эймса *Salmonella*/микросомы и в клеточных культурах млекопитающих и человека *in vitro* [17].

Процесс биотрансформации нитрофуранов в клетках млекопитающих начинается с восстановления нитрогруппы различными ферментными системами, включающими нитроредуктазы, ксантиноксидазу, НАДФН-цитохром 450-редуктазу и другие. В процессе биотрансформации нитрофуранов образуется широкий спектр высокореакционно-способных соединений: супероксид-анион, нитрильный и гидроксильный радикалы, а также электрофильные соединения, способные образовывать аддукты с ДНК [18]. Это означает, что нитрофураны могут проявлять генотоксичность как путем генерации свободных радикалов, способных вызывать разрывы нитей ДНК, так и образованием аддуктов с ДНК, приводящих к блокировке репликации ДНК.

В наших экспериментах фурацилин индуцировал разрывы ДНК в клетках *C. elegans* в концентрациях 0,0001 и 0,00025 моль/л (рис. 3). При проведении экспериментов в качестве позитивного контроля использовали два вещества: бета-пропиолактон (БПЛ) и перекись водорода в концентрациях 0,015 и 0,1 моль/л соответственно. Выбор двух веществ для позитивного контроля был обусловлен тем, что фурацилин после восстановления нитроредуктазой образует гидроксиламиновое производное, которое впоследствии образует аддукт с ДНК [16], что может привести к образованию крупных фрагментов ДНК. С другой стороны, при многоступенчатой биотрансформации фурацилина образуются такие окислительные соединения, как супероксид-анион радикал и пероксид водорода, которые могут индуцировать разрывы ДНК. В случае перекиси водорода в ДНК образуются одонитевые разрывы, приводящие к мелким фрагментам.

Антиоксидант АЦЦ в концентрациях 0,001 и 0,01 моль/л снижал уровень разрывов ДНК нематоды, вызванных фурацилином в концентрации 0,00025 моль/л. Наиболее эффективная защита от генотоксического воздействия фурацилина показана в концентрации АЦЦ 0,01 моль/л (рис. 4).

Таким образом, в настоящей работе впервые проведено изучение генотоксичности пестицида параквата и антибактериального средства фурацилина на нематоде *C. elegans*. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что *C. elegans* может быть с успехом использована для первичной оценки генотоксичности химических соединений вместо мышей. Данный метод позволяет также изучать влияние антиоксидантов на генотоксичность исследуемого соединения. Для более эффективной работы в области генетической токсикологии необходимы тест-системы, которые бы сочетали в себе простоту в применении, дешевизну

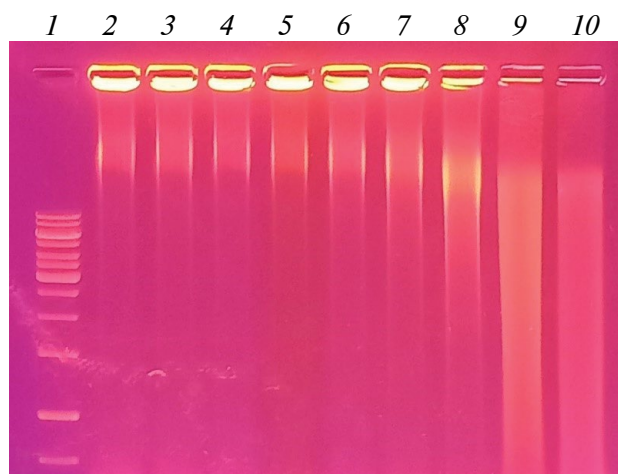


Рис. 3. Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию фурацилина в разных концентрациях (моль/л): 1 – маркер, 2 – вода (контроль), 3 – 0,000005, 4 – 0,00001, 5 – 0,00002, 6 – 0,00005, 7 – 0,0001, 8 – 0,00025; положительные контроли: 9 – БПЛ 0,015 моль/л и 10 – перекись водорода 0,1 моль/л.

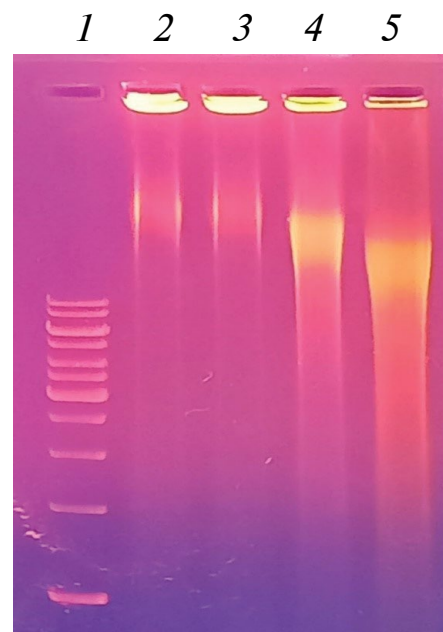


Рис. 4. Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию фурацилина в концентрации 0,00025 и АЦЦ в концентрациях 0,01 и 0,001 моль/л: 1 – маркер, 2 – вода (контроль), 3 – фурацилин 0,00025 + АЦЦ 0,01, 4 – фурацилин 0,00025 + АЦЦ 0,001, 5 – фурацилин 0,00025 моль/л.

ресурсов и быстроту в выполнении. *C. elegans*, как и все эукариоты, имеет в геноме большую группу генов системы детоксикации ксенобиотиков цитохром-Р450, исследование особенностей функционирования которых у *C. elegans* позволяет с некоторой степенью уверенности экстраполировать на человека результаты опытов по генотоксичности на данном организме.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках исследований по Государственному заданию 122022600163-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Russell, W.M.S., Burch, R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, 1959. London: Reprinted by UFAW, 1002: 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England. ISBN 0 900767 78 2.
2. Kilkenny C., Browne W.J., Cuthill I.C. et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research // PLoS Biol. 2010. V. 8. DOI:10.1371/journal.pbio.1000412
3. Kousholt B.S., Præstegaard K.F., Stone J.C. et al. Reporting of 3Rs approaches in preclinical animal experimental studies. A nationwide study // Animals (Basel). 2023. V13(19). DOI: 10.3390/ani13193005
4. Leung M.C.K., Williams F.L., Benedetto A. et al. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology // Toxicol. Sci. 2008. V. 106. P. 5–28. DOI:10.1093/toxsci/kfn121
5. Мишулина Р.Т., Фахруллин Р.Ф., Ишмухаметова Д.Г. *Caenorhabditis elegans* в токсикологии и нанотоксикологии // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация. 2012. № 2. С. 172–282.
6. Consortium (The *C. elegans* Sequencing Consortium) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology // Science. 1998. V. 282. P. 2012–2018.
7. Imanikia S., Galea F., Nagy E. et al. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2016. V. 7(45) P. 356–361. DOI:10.1016/j.etap
8. Hartman J.H., Widmayer S.J., Christina M. et al. Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans* // J. Toxicol. Envir. Health. 2021. Part B. V. 24(2). P. 51–94. DOI:10.1080/10937404.2021.1884921
9. Harlow P.H., Perry S.J., Alexander J. et al. Comparative metabolism of xenobiotic chemicals by cytochrome P450s in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Nat. Sci. Reports. 2018. V. 8. P. 13333. DOI: 10.1038/s41598-018-31215-w
10. Мачигов Э.А., Абилов С.К., Игоница Е.В., Марсова М.В. Изучение генотоксичности бета-пропиолактона с помощью Lux-биосенсоров *E. coli* и нематоды *Caenorhabditis elegans* // Генетика. 2023. Т. 59. № 5. С. 507–516. DOI: 10.31857/S0016675823040070
11. Meneely P.M., Dahlberg C.L., Rose J.K. Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism // Curr. Prot. Ess. Lab. Techn. 2019. V. 19. DOI: 10.1002/cpet.35
12. Iyyadurai R., Mohan J., Jose A. et al. Paraquat poisoning management // Curr. Med. Issues. 2019. V. 17. P. 34–37. DOI: 10.4103/cmi.cmi_29_19
13. Bus J.S., Aust S.D., Gibson J.E. Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 58. P. 749–755.
14. Fukushima T., Tanaka K., Lim H. et al. Mechanism of cytotoxicity of paraquat // Environ. Health and Preven. Med. 2002. V. 7. P. 89–94.
15. Onur B., Çavuşoğlu K., Yalçın E. et al. Paraquat toxicity in different cell types of Swiss albino mice // Nat. Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 4818. DOI:10.1038/s41598-022-08961-z
16. Roldan M.D., Perez-Reinado E., Castillo F. et al. Reduction of polynitroaromatic compounds: The bacterial nitroreductases // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 38. P. 474–500. DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x
17. McCalla D.R. Mutagenicity of nitrofurans derivatives: Review // Environ. Mutagenes. 1983. V.5. P. 745–765.
18. Anderson D. & Philips B.J. Nitrofurazone-genotoxicity studies in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* // Food. Chem. Toxicol. 1985. V. 23. P. 1091–1098.

Nematode *Caenorhabditis elegans* as an Object for Testing the Genotoxicity of Chemical Compounds

S. K. Abilev^{1,*}, E. M. Machigov¹, S. V. Smirnova¹, M. V. Marsova¹

Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: abilev@vigg.ru*

In connection with the requirements of International and national organizations to comply with the principles of humanization of experiments using animals, alternative test systems are being searched and tested to replace animals in ecological, toxicological and genotoxicological studies. One such alternative may be the nematode *Caenorhabditis elegans*, which has a biotransformation system of chemical compounds similar to the mammalian system. The genotoxicity of the pesticides paraquat and the antibacterial agent furacilin was studied on *C. elegans* by horizontal gel electrophoresis of total DNA in order to assess its integrity. It has been shown that paraquat in concentrations of 0.01 to 0.05 mol/l and furacilin f in concentrations of 0.0001 and 0.00025 mol/l, caused DNA breaks in nematode cells. The antioxidant N-acetylcysteine at a concentration of 0.01 mol/l reduced the genotoxicity of both compounds.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, DNA breaks, gelelectrophoresis, paraquat, furacilin, N-acetylcysteine.