ГЕНЕТИКА, 2009, том 45, № 3, с. 349–353

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.224.46:535-31:579.842.11

МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК СУПРЕССОР ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 300–400 нм

© 2009 г. В. А. Чистяков[1], М. А. Сазыкина[1], М. А. Коленко[1], Г. Г. Червяков[2], А. В. Усатов[1]

[1]*Научно-исследовательский институт биологии при Южном Федеральном университете, Ростов-на-Дону 344090;*

e-mail: vladimirchi@yandex.ru

[2]*Таганрогский технологический институт при Южном Федеральном университете, Таганрог 347928*

Поступила в редакцию 20.12.2007г.

Ультрафиолетовое излучение длиной волны 300–400 нм, характерное для солнечного света у земной поверхности, вызывает повреждение ДНК, опосредованное переносом энергии на O_2 с переходом последнего в синглетное состояние. В связи с этим перехватчики активных форм кислорода (АФК) являются потенциальными протекторами от генотоксического действия этого вида излучения. Исследования показали, что краситель метиленовый синий в дозах, на несколько порядков отличающихся от токсичных для человека, способен полностью подавлять SOS-ответ, вызванный УФ длиной волны 300–400 нм у *E. coli*.

Генотоксические эффекты разных частей спектра ультрафиолетового света (УФ) опосредованы действием различных механизмов. Главными продуктами повреждения ДНК светом с длиной волны 200–280 нм (ультрафиолет С) являются пиримидиновые димеры, образующие при поглощении квантов света ДНК [1]. Ультрафиолет А (320–400 нм) и В (280–320 нм), не поглощающийся нуклеиновыми кислотами, способен индуцировать в клетках каскад фотореакций, сопровождающихся генерацией активных форм кислорода (**АФК**). При этом, если пиримидиновые димеры эффективно репарируются системами безошибочной эксцизионной репарации, то продукты свободно-радикальной атаки ДНК, особенно такие, как сшивки с белками и поперечные сшивки, репарируются гораздо слабее с широким участием систем ошибочной репарации. Поэтому ближний ультрафиолет, несмотря на меньшую энергию его квантов, является серьезным индуктором рака кожи у человека [2–5]. Большая часть солнечного ультрафиолета, достигающего земной поверхности, представлена излучением длиной волны 300–400 нм [5]. Этот диапазон, по-видимому, является оптимальным для подбора защитных веществ. На практике для защиты от канцерогенного действия солнечной радиации используются в основном “sunscreen” продукты – вещества, экранирующие кожу от света [6]. Их эффективность ограничена целым рядом факторов – в основном невозможностью создать стабильную пленку необходимой толщины. Решение проблемы защиты от негативных эффектов солнечной радиации должно быть основано на комплексном подходе, интегрирующем работу самых разных механизмов. Последнее определяет актуальность поиска соединений, способных защищать клетку от генотоксических эффектов ультрафиолета А и В. Очевидно, что чем более широким будет перечень таких веществ, тем больше появится возможностей для создания высокоэффективных комплексных препаратов.

В ряде публикаций описан антиоксидантный эффект широко применяемого в биологии и медицине красителя – метиленового синего (N,N,N',N'-тетраметилтионина хлорид), относящегося к группе тиазинов. Это вещество способно хорошо проникать в живые клетки и эффективно “перехватывать” активные формы кислорода в концентрациях, на несколько порядков отличающихся от токсических [7]. В то же время описана фотосенсибилизирующая активность метиленового синего [8]. Таким образом, исследование способности этого соединения модифицировать деструктивные эффекты, вызываемые фотоиндукцией активных форм кислорода, представляет несомненный интерес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве системы для оценки генотоксичности исследуемого воздействия был применен вариант SOS-lux-теста, использованный ранее для изучения антимутагенных эффектов ряда природных соединений [9–11]. Репортером SOS-ответа служил lux-оперон. Использовали штамм PT-1

Таблица 1. Динамика индукции SOS-ответа штамма *E. coli* PT-1 после облучения дозой УФ (300–400 нм) 390 Дж/м^2

Время после облучения, мин	Интенсивность биолюминесценции штамма PT-1, ед. прибора*	Фактор индукции, I^s
До облучения	0.60 ± 0.05	0
30	1.62 ± 0.09	0.7**
60	4.83 ± 0.28	4.2**
90	6.05 ± 0.73	8.4**
120	7.52 ± 0.78	9.8**
150	5.69 ± 0.36	7.5**

* Среднее из четырех значений.

** Отличия от контроля статистически достоверны, $t < 0.05$.

(*E. coli* C600(pPLS-1)), несущий плазмиду pPLS-1, в которой оперон биолюминесценции находится под контролем SOS-промотора [12]. Для контроля эффектов, не связанных с SOS-индукцией, использовали штамм PT-5 (C600(pPLS-5)), lux-оперон которого находится под контролем конститутивного промотора [13].

Штаммы *E. coli* выращивали на среде LB. В 50 мл среды вносили 0.1 мл ночной культуры *E. coli* и инкубировали в термостате в течение 1 ч при 37°C. 1 мл культуры помещали в пластмассовую чашку Петри без крышки диаметром 40 мм, которую облучали ультафиолетовым светом с длиной волны 300–400 нм на установке, использующей в качестве излучателя ртутную лампу низкого давления (HG-125). Лампа помещена в фокусе параболического отражающего зеркала, и УФ-поток, с целью снижения угла рассеяния, передавался к облучаемому объекту через алюминиевую направляющую систему. Это позволило сформировать осесимметричный и равномерный поток излучения на расстояниях от 20 см до 2 м, в котором минимальная площадь облучаемой поверхности составляет 80 × 80 мм, а неравномерность (при отклонении от оси на 50 мм) не превышала 20%.

Раствор метиленового синего (ч.д.а., “Диа-м, Россия”) в дистиллированной воде добавляли до необходимой конечной концентрации за 30 мин до облучения.

После облучения суспензии микроорганизмов выдерживали в течение необходимого времени (см. табл. 1) при температуре 25°C, затем измеряли люминесценцию при помощи люминометра ЛТ-01 (Россия).

Фактор индукции SOS ответа (I^s) вычисляли по формуле:

$$I^s = \frac{L_e}{L_k} - 1, \qquad (1)$$

где L_k – интенсивность люминесценции контрольной пробы; L_e – интенсивность люминесценции опытной пробы.

Признаком достоверности эффекта SOS-индукции считали статистически достоверное превышение L_e над L_k, оцениваемое по *t*-критерию.

Показатель антимутагенного потенциала (A, %) вычисляли по формуле:

$$A = \left(1 - \frac{I_a}{I_p}\right)100\%, \qquad (2)$$

где I_a – фактор индукции SOS-ответа исследуемым воздействием в присутствии протектора; I_p – фактор индукции SOS-ответа исследуемым воздействием.

Все эксперименты проводили в трех независимых повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты по развитию SOS-ответа, вызванного у *E.coli* ультрафиолетовым излучением с длиной волны 300–400 нм во времени, приведены в табл. 1. Максимальный эффект развивается через 120 мин после облучения. Фактор индукции достигает при этом величины 9.8, затем начинает снижаться. Утверждать, что наблюдаемое увеличение интенсивности свечения опосредовано именно SOS-индукцией, позволяет отсутствие достоверных изменений этого параметра у штамма PT-5, lux-оперон которого находится под контролем конститутивного промотора (данные не приводятся). Таким образом, экспозиция в течение 120 мин после облучения является оптимальной для изучения протекторов.

Как видно из табл. 2, увеличение дозы ультрафиолетового излучения исследуемого диапазона ведет к увеличению эффекта до достижения максимального показателя фактора индукции, равного 9.7 (390 Дж/м^2). Дальнейший рост дозы ведет к постепенному уменьшению эффекта. Дозы, превышающие 3120 Дж/м^2, не дают достоверного роста биолюминесценции штамма PT-1. Достоверного изменения свечения штамма PT-5 для доз от 65 до 7800 Дж/м^2 зарегистрировано не было, что позволяет утверждать, что полученные эффекты обусловлены индукцией SOS-ответа, а не общей активацией биоэнергетики бактериальных клеток.

Дальнейшее увеличение дозы ведет к подавлению свечения обоих штаммов.

Таким образом, зависимость фактора SOS-индукции от дозы ультрафиолетового излучения с длиной волны от 300 до 400 нм в полулогарифмическом масштабе имеет вид колоколообразной кривой, представленной на рисунке, с максимумом в

районе 390 Дж/м^2. Эта доза является оптимальной для изучения эффектов защиты от изучаемого воздействия. Данные по модификации метиленовым синим SOS-индукции, вызываемой УФ (300–400 нм), представлены в табл. 3. Концентрации 0.01–1 нМ не оказывают статистически достоверного влияния на уровень фактора индукции. Для бóльших концентраций регистрируется протекторный эффект. Эффективность защиты метиленового синего увеличивается с увеличением его дозы, достигая максимума (подавление SOS-индукции до уровня, статистически неотличимого от фонового) в концентрации 1000 нМ. Дальнейшее десятикратное увеличение концентрации не ведет к снижению эффекта.

ОБСУЖДЕНИЕ

SOS-lux-тест создавался как метод количественной оценки генотоксических эффектов [11]. Нами была предложена модификация, позволяющая вычислять истинные значения SOS-индукции в присутствии веществ, подавляющих активность бактериальной люциферазы [13]. Способность теста регистрировать линейный рост интенсивности SOS-ответа при увеличении дозы воздействий и веществ, непосредственно взаимодействующих с ДНК, подтверждена экспериментально [12, 14]. Нелинейный характер дозовой зависимости, полученной в рамках данного исследования, по-видимому, обусловлен сложностью свободнорадикальных процессов, ведущих к повреждению ДНК при действии УФ на бактериальные клетки. Отметим, что нелинейный характер зависимостей доза/эффект отмечается и для ряда других мутагенов, в основе действия которых лежит генерация АФК, в частности, для кислорода под давлением [15, 16]. Тем не менее регистрируемая в наших экспериментах десятикратная индукция SOS-ответа позволяет использовать этот параметр для количественного учета протекторной активности.

Метиленовый синий относится к группе тиазиновых красителей. История клинического применения этого соединения насчитывает более 100 лет. Первоначально его использовали для лечения метгемоглобинемии как врожденного, так и токсикологического происхождения. В конце XX столетия было обнаружено, что метиленовый синий обладает широким адаптогенным потенциалом, в частности, защищает клетки от деструктивных последствий ишемии-реперфузии [17], увеличивает продолжительность жизни мышей [18], восстанавливает когнитивные функции после окислительного стресса [19, 20] и т.д.

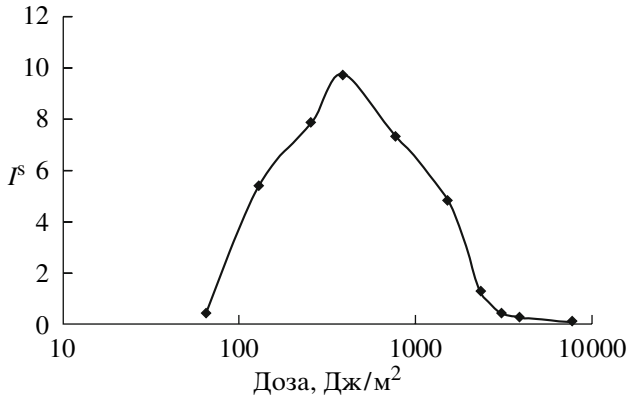
По мнению авторов работы [7], описавших ряд эффектов метиленового синего, позволяющих отнести его к геропротекторам, адаптогенные свойства этого вещества обусловлены его антиоксидантной активностью. Согласно универсальному механизму, открытому В.П. Скулачевым, гидрофобные катионы способны многократно аккумулироваться в мембранных структурах, несущих положительный заряд, например, в митохондриях и клетках бактерий [21]. Молекулы метиленового синего обладают всеми необходимыми для такой аккумуляции особенностями [7]. Кроме того, сравнительно низкий редокс-потенциал этого вещества (11 мВ) облегчает циклические превращения между восстановленной и окисленной формами [22], что позволяет этому веществу “использовать” энергию электронно-транспортной цепи для “дезактивации” генерируемых в клетке АФК [7]. По-видимому, этими особенностями и объясняется то, что антиоксидантные свойства метиленового синего в эксперимен-

Таблица 2. Индукция SOS-ответа штамма *E. coli* PT-1 УФ с длиной волны 300–400 нм

Доза излучения, Дж/м^2	Интенсивность биолюминесценции штамма PT-1, ед. прибора*	Фактор индукции, I^s
0	0.315 ± 0.022	0
65	0.451 ± 0.038	0.43
130	2.32 ± 0.245	5.4**
260	3.09 ± 0.281	7.8**
390	3. 37 ± 0.402	9.7**
780	2.91 ± 0.200	7.3**
1560	2.15 ± 0.089	4.8**
2340	0.725 ± 0.056	1.3**
3120	0.460 ± 0.049	0.46
3900	0.410 ± 0.032	0.3
7800	0.347 ± 0.035	0.1

* Среднее из четырех значений.

** Отличия от контроля статистически достоверны, $t < 0.05$.



Зависимость фактора индукции SOS-ответа *E. coli* штамма PT-1 от дозы УФ (300–400 нм).

Таблица 3. Индукция SOS-ответа *E. coli* ультрафиолетовым излучением длиной волны 300–400 нм в дозе 390 Дж/м^2 в присутствии метиленового синего

Концентрация метиленового синего, нМ	*A*, %	Фактор индукции*, I^s
0	0	9.0 ± 1.1
0.01	2	8.8 ± 1.0
0.1	0	9.1 ± 0.9
1	19	7.3 ± 0.8
10	86	1.3 ± 0.1**
100	80	1.8 ± 0.2**
1000	91	0.8 ± 0.1**
10000	90	0.9 ± 0.1**

* Величину и стандартную ошибку фактора индукции рассчитывали по данным трех независимых опытов.

** Статистически достоверный протекторный эффект, $p < 0.05$.

тах на клетках млекопитающих проявляются в концентрациях 10–1000 нМ, на несколько порядков меньших, чем токсичные концентрации [7]. В этом же диапазоне концентраций регистрируется и обнаруженный нами протекторный эффект в отношении УФ (300–400 нм). По-видимому, он также осуществляется по антиоксидантному механизму, чему способствует сходство метаболизма митохондрий и аэробных бактерий. Полученные нами данные позволяют предположить, что метиленовый синий в концентрациях, безвредность которых подтверждена как испытаниями на животных [18], так и столетним опытом применения этого вещества в медицине, сможет эффективно защищать кожу от генотоксического действия ультрафиолетовой компоненты солнечного света. Проверка этого предположения на более адекватных человеку экспериментальных моделях станет предметом наших дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pfeifer G.P., You Y.H., Besaratinia A.* Mutations induced by ultraviolet light // Mutat Res. 2005. V. 571. № 1–2. P. 19–31.
2. *Cadet J., Berger M., Douki T. et al.* Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage // Biol. Chem. 1997. V. 378. № 11. P. 1275–1286.
3. *Pattison D.I., Davies M.J.* Actions of ultraviolet light on cellular structures // EXS. 2006. V. 96. P. 131–157.
4. *Hiraku Y., Ito K., Hirakawa K., Kawanishi S.* Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism // Photochem. Photobiol. 2007 V. 83. № 1. P. 205–212.
5. *Kligman L.H.* Photoaging. Manifestation, prevention and treatment // Clin. Geriatr. Med. 1989 V. 5. № 1. P. 235–251.
6. *Lautenschlager S., Wulf H.C., Pittelkow M.R.* Photoprotection // Lancet. 2007 V. 370. № 9586. P. 528–537.
7. *Atamna H., Nguyen A., Schultz C. et al.* Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways // FASEB J. 2008. V. 22. Published online October 15, 2007.
8. *Wagner S.J., Cifone M.A., Murli H. et al.* Mammalian genotoxicity assessment of methylene blue in plasma: implications for virus inactivation // Transfusion. 1995. V. 35. P. 407–413.
9. *Гуськов Е.П., Клецкий М.Е., Корниенко И.В. и др.* Аллантоин как тушитель свободных радикалов // Докл. РАН. 2002. Т. 383. № 2. С. 105–107.
10. *Гуськов Е.П., Прокофьев В.Н., Клецкий М.Е. и др.* Аллантоин как витамин // Докл. РАН. 2004. Т. 398. № 6. С. 320–324.
11. *Чистяков В.А.* Хрящевая ткань как источник биологически активных веществ // Вопросы рыболовства. 2004. № 1 (17). С. 174–178.
12. *Ptitsyn L.R., Horneck G., Komova O. et al.* A biosensor for environmental genotoxin screening based on SOS lux assay in recombinant Escherichia coli cells // Appl. Environ. Microbiol. 1997 V. 63. № 11. P. 4377–4384.
13. *Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Войнова Н.В.* Способ определения генотоксичности химических веществ: Патент РФ № 2179581. 2002.
14. *Сазыкина М.А.* Оценка тенденций развития биоресурсов рыбохозяйственных водоемов Азово-Донского басейна на основе анализа генотоксичности их компонентов: Дис. … канд. биол. наук. Ростов-на-Дону: АзНИИРХ, 2003. 161 с.
15. *Гуськов Е.П., Павлов Ю.И., Тер-Аванесян М.Д., Чистяков В.А.* Влияние гипербарической оксигенации на выживаемость, мутагенез и рекомбиногенез одноклеточных организмов // Цитология и генетика. 1987. № 1. С. 10–16.
16. *Чистяков В.А.* Биохимические механизмы кислородного мутагенеза у микроорганизмов // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. 2003. Приложение. № 11(11) С. 57–63.
17. *Salaris S.C., Babbs C.F., Voorhees W.D., 3rd.* Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. A potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury // Biochem. Pharmacol. 1991. V. 42. № 3. P. 499–506
18. *Bristol D.W.* TR-540: Technical report pathology tables and curves // Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methylene Blue Trihydrate in F344 Rats and B6C3F1 Mice. National Institutes of Health, Public Health Ser-

vice, U.S. Department of Health and Human Services. 2006 URL: http://ntp.niehs.nih.gov/go/20955

19. *Callaway N.L., Riha P.D., Wrubel K.M. et al.* Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats // Neurosci. Lett. 2002. V. 332. № 2. P. 83–86
20. *Riha P.D., Bruchey A.K., Echevarria D.J., Gonzalez-Lima F.* Memory facilitation by methylene blue: dose-dependent effect on behavior and brain oxygen consumption // Eur. J. Pharmacol. 2005. V. 511. № 2–3 P. 151–158.
21. *Skulachev V.P.* How to clean the dirtiest place in the cell: Cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers // IUBMB Life. 2005. V. 57. № 4/5. P. 305–310.
22. *Kamat P., Mimitijevic N., Fessenden, R.* Photoelectrochemistry in particulate systems: electron-transfer reactions of small CdS colloids in acetonitrile // J. Phys. Chem. 1987. V. 91. № 4. P. 396–401.

Methylene Blue as a Supressor of the Genotoxic Effect of Ultraviolet Radiation with a Wavelength of 300–400 nm

V. A. Chistyakov[a], M. A. Sazykina[a], M. A. Kolenko[a], G. G. Chervyakov[b], and A. V. Usatov[a]

[a] *Research Institute of Biology, South Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia;*
e-mail: vladimirchi@yandex.ru

[b] *Taganrog State University of Radioengineering,Taganrog, 347928 Russia*

Ultraviolet radiation with a wavelength of 300–400 nm is characteristic of sunlight at the earth surface and causes DNA damage mediated by energy transfer to O_2 with the transformation of the latter in the singlet state. In connection with this, scavengers of reactive oxygen species (ROSs) are potential protectors against the genotoxic effect of this kind of radiation. It was found that the methylene blue dye at doses differing by several orders of magnitude from those that are toxic for humans is able to suppress completely the SOS response induced by UV with a wavelength of 300–400 nm in *Escherichia coli*.