

Дудчик Н. В.
Научно-практический центр гигиены,
г. Минск, Беларусь
Ушкова Л. Л.
Научно-практический центр гигиены,
г. Минск, Беларусь

МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ТЕСТ-МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТО- И ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Результаты микробиологических, почвенно-экологических, гидробиологических исследований показали критическое значение микробиоты в поддержании экологического равновесия, обмена веществ в природе, биодegradации химических токсикантов разной природы. Уникальные биохимические, физиологические и генетические свойства про- и эукариотических микроорганизмов позволяют рассматривать их в качестве перспективных альтернативных тест-моделей при разработке системы оценки цито- и генотоксичности потенциально опасных химических веществ или их сложных смесей, а также оценки контаминации объектов окружающей среды. Преимуществами таких методов являются: низкая стоимость, получение быстрого ответа на токсическое воздействие, возможность оценки большого числа проб, простое лабораторное оборудование, работа с небольшими объемами проб, портативность, воспроизводимость результатов, а также возможность большого выбора тест-организмов. Анализ генетических изменений про- и эукариотических тест-моделей широко используется для оценки состояния и характеристики генотоксической активности химических веществ и объектов среды обитания человека и направлен на выявление повреждений ДНК, генных мутаций, хромосомные aberrации и др.

Сформировались и уже достаточно широко используются в литературе термины «микробиотестирование» и «микробиотесты» («микротесты»). По мнению ряда ученых, в дальнейшем развитие микробиотестов будет связано с конструированием генетически модифицированных штаммов микроорганизмов, а также с изолированием из окружающей среды таких штаммов или их ферментов, которые проявляют наибольшую чувствительность к разным классам токсикантов и дают наиболее адекватный ответ на них [1–12].

Целью нашей работы было обоснование требований и разработка методов оценки цито- и генотоксичности химических веществ и их смесей с использованием батарей тест-моделей на основе про- и эукариотических микроорганизмов.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели проведен анализ информации о методах тестирования цито- и генотоксичности и проведения скрининга создана рабочая коллекция тест-моделей. Основываясь на определениях Всемирной организации здравоохранения, что маркер — это любое вещество, молекула, структура или процесс, которые могут быть измерены и коррелируют или связаны закономерными зависимостями с неблагоприятными изменениями

в организме, сформирована база данных маркеров воздействия и маркеров эффекта [5, 9–12].

Выполнен анализ предлагаемых в ЕС критериев оценки токсичности объектов, определены критерии формирования батареи тестов для эффективной оценки цито- и генотоксичности химических веществ и их сложных смесей, проведена классификация методов детекции цитотоксичности и генотоксичности химических веществ, определены особенности стандартизации, интерпретации и оценки результатов краткосрочных тестов. Обоснованы научно-методические подходы для использования популяционных, субпопуляционных и морфологических параметров тест-моделей с целью отбора маркеров воздействия и маркеров эффекта.

В ходе выполнения работы проведено изучение особенностей развития популяции тест-моделей микроорганизмов с целью разработки системы маркеров для выявления реакции клеток на воздействие ксенобиотиков. Были определены кинетические параметры роста тест-культур на разных фазах развития популяции: удельная скорость экспоненциального роста, константа скорости деления, время генерации. Показано, что характерными проявлениями реакции клеток на токсическое воздействие являются нарушения клеточного деления, появление атипичных клеточных форм и колоний.

Экспериментально обосновано, что одним из наиболее информативных методов является оценка продолжительности начальных этапов роста микроорганизмов [6, 10–12]. Протяженность лаг-фазы роста популяции тест-моделей при токсическом воздействии увеличивается, при этом начало лог-фазы задерживается по сравнению с интактными контрольными культурами, что может быть следствием нарушения фаз клеточного цикла. Разработанные методологические подходы и опыт проведения микробиологических исследований с использованием импедансных технологий позволил нам разработать ряд экспресс-методов оценки цито- и генотоксических эффектов химических поллютантов.

Проведены экспериментальные исследования чувствительности тест-моделей к эталонным референс-веществам при тестировании токсичности и определен перечень референс-веществ для оценки релевантности методов биотестирования.

В результате экспериментального изучения популяционных, кинетических, морфологических и биохимических параметров тест-культур отобраны информативные критерии оценки цито- и генотоксичности: скорость роста в периодической системе, частота возврата к прототрофным формам у ауксотрофных мутантов микроорганизмов, изменение подвижности, интенсивность прироста биомассы [11, 12].

Проведена оптимизация параметров проведения тестирования, в т. ч. рабочие параметры тест-культур, состав питательных сред, время и температурные режимы при проведении тестов. Получены новые данные об изменениях тинкториально-морфологических, культуральных, биохимических параметров тест-моделей в результате токсических воздействий.

Для оценки токсичности химических веществ целесообразно использование «батарея тестов», дополняющих друг друга по метрологическим показателям (чувствительность, воспроизводимость, диапазон оценки токсичности и др.), а также по степени эволюционной степени организации тест-модели, различным

критериям оценки токсичности, основанным на параметрах жизнедеятельности тест-модели. С целью обоснования батареи тестов проведено сопоставление результатов проведенных ранее экспериментов по оценке токсичности водных растворов модельных веществ, объектов окружающей среды естественно загрязненных и искусственно загрязненных модельными токсикантами.

Были разработаны принципы формирования батареи краткосрочных тестов, определена минимальная батарея краткосрочных тестов для оценки цито- и генотоксичности химических токсикантов, в т. ч. необходимый и достаточный состав тест-моделей, референс-вещества для оценки релевантности, баланс негативного и позитивного контроля, критерии оценки полученных результатов тестирования с полной и неполной метаболической активацией, без метаболической активации. Проведено сравнение прогностической эффективности различных батарей краткосрочных тестов. Выполнена верификация краткосрочных тестов на соединениях с известной токсической и мутагенной активностью.

Установлена последовательности этапного тестирования цито- и генотоксичности. В батарею тестов для оценки цитотоксичности входят: ростовой тест на *Pseudomonas spp.* с импедиметрической детекцией, флуориметрический краткосрочный тест на цианобактериях, ростовой тест на почвенных микроорганизмах с оптической детекцией, дегидрогеназный тест на культуре почвенных микроорганизмов, бактериальный люминесцентный тест, тест оценки энзиматического профиля, содержания малонового диальдегида в тест-культуре микроорганизмов, оценка токсического воздействия по изменению экспрессии и ферментативной активности цитохрома P450 в культуре *Phanaerochaete chrysosporum*.

Батарею тестов для оценки генотоксичности составили: тесты на выявление генных мутаций в тесте Salmonella/микросомы; тесты на повреждения ДНК (репарационный тест на *Escherichia coli*, фиксирующий мутации типа сдвига рамки считывания), комет-тест с использованием ДНК фага λ для регистрации прямого ДНК-повреждающего действия.

Проведены экспериментальные исследования для апробации разработанных методик оценки токсических воздействий для их адаптации к различным объектам исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еськов, А. П. Токсикологические испытания. Альтернативные методы/ А. П. Еськов, Р. И. Каюмов, А. Е. Соколов // Токсикол. вестн. 2003. № 5. С. 25–28.
2. Alexander, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants/ M. Alexander // Env. Sci & Technol. 2000. № 34. P. 4259–4265.
3. Virta, M. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil / M. Virta, A. Kahru // Soil Biology & Biochemistry. 2002. Vol. 34, № 10. P. 1439–1447.
4. Ulitzur, S. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity / S. Ulitzur, T. Lahav, N. Ulitzur // Environmental Toxicology Journal. 2002. Vol. 17, № 3. P. 291–296.
5. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ: Совместное издание Программы ООН по окружающей среде, Международной организации труда и ВОЗ; Женева. Москва : Медицина, 1989. 212 с.

6. *Разработка* биотехнологических методов ликвидации нефтяных загрязнений окружающей среды / В. П. Холоденко [и др.] // Рос. хим. журн. 2001. Т. XLV, № 5–6. С. 135–141.

7. *Obaseiki-Ebor, E. E. Quinine induced Escherichia coli DNA base-pair substitution mutation* / E. Obaseiki-Ebor // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2005. Vol. 38, № 3. P. 422–425.

8. *Liu, Z. R. Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: Arabidopsis UVH1 DNA repair gene is a homolog of Saccharomyces cerevisiae Rad1* / Z. R. Liu // Plant Journal. 2000. Vol. 21, № 6. P. 519–528.

9. *Дудчик, Н. В. Определение генотоксичности химических веществ в краткосрочных тестах с использованием бактериальных систем* / Н. В. Дудчик // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии : сб. науч. тр. / Институт микробиологии НАН Беларуси ; гл. ред. Э. И. Коломиец. Минск, 2008. С. 25–27.

10. *Дудчик, Н. В. Изучение маркеров прокариотического микроорганизма Rhodococcus spp. для оценки токсических воздействий* / Н. В. Дудчик // Донозология. 2013. № 1. С. 41–45.

11. *Альтернативное тестирование токсичности: применение методов импедансной технологии в токсиколого-гигиенической практике* / Н. В. Дудчик [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2008. Ч. 1. С. 148–149.

12. *Дудчик, Н. В. Использование микробиотестирования при оценке токсичности химических веществ в окружающей среде* / Н. В. Дудчик // Гигиена и санитария. 2009. № 1. С. 84–87.