Журавлева Л. Л., Иванов Д. Е. ФГУ ГосНИИЭНП, Саратов

В настоящее время для биотестирования природной воды и почвы в районах расположения заводов по уничтожению химического оружия используется система тест-объектов, включающая в себя представителей различных систематических групп живых организмов (микроорганизмы, низшие и высшие растения, беспозвоночные животные) [1].

Количество биотестов должно быть достаточным для достоверного и быстрого обнаружения экотоксикантов. Для совершенствования этой системы целесообразно применять также методы биотестирования с использованием культур клеток человека и животных.

Можно предположить, что некоторые загрязняющие вещества не оказывают выраженного токсического влияния на микроорганизмы и растения, но вызывают нарушения в клетках человека.

Высокой чувствительностью к различным токсическим веществам обладают эмбриональные клетки человека и животных. Поэтому для целей биотестирования перспективно использовать культуру диплоидных эмбриональных клеток человека, например, штаммы диплоидных эмбриональных клеток фибробластов человека и различные линии мышиных эмбриональных фибробластов. Кроме этого, возможно использование культур лейкоцитов и клеток опухолей человека (IM-9, HepG2 и др.). Отдельным направлением исследований является поиск наиболее чувствительных к загрязняющим веществам культур клеток человека и животных. В СССР проводились исследования токсичности промышленных загрязнителей на культурах эмбриональных фибробластов и лейкоцитов человека [2,3]. Имеются методические указания по использованию культуры диплоидных эмбриональных клеток человека, рекомендуемых для токсиколого-гигиенических исследований [4,5]. После постановки и аттестации методик биотестирования на клетках человека и позвоночных животных в Региональных центрах системы государственного контроля и мониторинга возможен переход к отработке методик биотестирования на клетках рыб, беспозвоночных животных и растений.

Другим направлением развития системы биомониторинга объектов хранения и уничтожения химического оружия (ОУХО) является внедрение методов оценки генотоксичности. В настоящее время серьезный генетический мониторинг зон влияния ОУХО практически не проводится, и сделать достоверное заключение о наличии генетического груза и возможных отдаленных негативных генетических последствий влияния загрязняющих веществ пока невозможно. Система биотестов для генетических исследований должна включать тест-объекты, относящиеся к различным систематическим группам живых организмов, и обнаруживать генные, хромосомные и геномные мутации.

Оптимальными тест-системами для первого этапа генетического мониторинга загрязнения окружающей среды являются такие растительные тест-системы, как Crepis capillaris L., Tradeskantia клонов 02 и 4430 и мутантная по одному из генов синтеза хлорофилла линия сои (Glycine max. (L.) Merill). Удобными тест-объектами являются также семена дикорастущих растений Matricaria recutita L., Rumex confertus Willd., Taraxacum officinale Wigg.s.l. и Plantago major L.

Генные мутации легко можно обнаружить с помощью теста Эймса, который характеризуется низкой стоимостью и быстротой проведения анализа (3 суток). В качестве тест-объектов в тесте Эймса используются микроорганизмы (S. Typhimurium). Проведение биотестирования на клетках млекопитающих занимает более продолжительное время и требует больших финансовых затрат. Для обнаружения генных и хромосомных мутаций применяются различные культуры клеток грызунов (крысиные гепатоциты, клетки яичника и легких хомяка) [6]. Методы цитогенетики также являются составной частью генетического мониторинга [7]. Для оценки мутагенных факторов окружающей среды часто применяют цитогенетические тесты на растениях [8]. Метафазный метод рекомендуется как универсальный во всех тех случаях, когда возможно получение метафазных пластинок высокого качества. Анафазный метод необходимо использовать лишь для тех видов, у которых по тем или иным причинам метафазный анализ невозможен. На выбор видов растений в качестве объектов цитогенетического мониторинга определенные ограничения накладывает структура кариотипа. Непригодны для этих целей виды с диффузной локализацией центромеры и виды, имеющие добавочные хромосомы.

Сотрудниками лаборатории биомониторинга и биотестирования ФГУ ГосНИИЭНП (Саратов) аттестованы две цитогенетические методики для анализа изменений микроядрышек и хромосомных аберраций в корешках проростков семян и луковиц растений [9, 10]. Микроядрышковый тест основан на подсчете клеток с микроядрами, которые представляют собой автономно существующие ацентрические фрагменты хромосом, возникающие в результате влияния генотоксических веществ на геном.

Методика основана на определении увеличения количества микроядрышек в проростках семян и луковицах растений при действии генотоксических веществ, присутствующих в исследуемой пробе. Основным критерием генотоксичности является увеличение количества микроядрышек в корешках проростков семян и луковиц растений по сравнению с контролем. Определение генотоксического влияния проводят также с использованием анафазно-телофазного метода. Этот метод основан на регистрации хромосомных аберраций, на стадии анафазы и телофазы. Аномальные анафазы имеют «мосты» и ацентрические фрагменты, возникающие в результате структурных аберраций хромосом типа асимметричных транслокаций и делеций. Повреждения хромосом в области центромеры приводят к отставанию целых хромосом или их фрагментов при движении их в метакинезе и при расхождении к полюсам. Следствием фрагментации хромосом является возникновение фрагментов. При воссоединении фрагментов, содержащих центромеру, образуется дицентрическая хромосома, которая испытывает воздействие обоих митотических центров и, растягиваясь между дочерними группами анафазных или телофазных хромосом, образует «мост». В зависимости от характера повреждения хромосом возникают «мосты» разного типа. При воссоединении двух разорванных хромосом возникает хромосомный (обычно двойной) «мост», а при боковом воссоединении двух разорванных сестринских хроматид – хроматидный «мост» (обычно одиночный). Методика основана на определении увеличения количества хромосомных аберраций в апикальной меристеме проростков семян растений при действии генотоксических веществ, присутствующих в исследуемой пробе, по сравнению с контролем.

Для определения генотоксичности в зоне влияния ОУХО можно применять и зарубежные тесты Mutatox assay и GreenScreen EM. Степень генотоксичности оценивается на основании изменения флюоресценции клеток дрожжей и бактерий, которые используются в этих методиках в качестве тест-объектов. В настоящее время эти тесты часто применяются в экотоксикологических исследованиях. Кроме этого, весьма перспективным направлением в последние годы является исследование экспрессии различных генов под влиянием экотоксикантов. Повреждения ДНК клеток в результате воздействия различных факторов окружающей среды можно оценить также с помощью метода ДНК-комет [11, 12]. Главное преимущество метода ДНК-комет перед другими методами регистрации повреждений ДНК заключается в возможности обнаружения повреждений на уровне одиночных клеток эукариот практически любого происхождения. Исследования генотоксичности могут проводиться как на культуре клеток, так и на клетках, взятых от животных, обитающих в зоне влияния ОУХО. Метод сопоставим по чувствительности с традиционными цитогенетическими тестами и в ряде случаев превосходит их.

Таким образом, основными направлениями развития системы биотестирования качества

природных сред в районах расположения ОУХО в ближайшие годы являются: 1) постановка и внедрение методов оценки генотоксичности; 2) применение в биотестировании культур клеток человека и животных, обладающих высокой чувствительностью к действию загрязняющих веществ.

Литература

1. Чупис В.Н., Лущай Е.А., Ларин И.Н., Загреков А.А., Ильина Е.В., Иванов Д.Е. Система биотестов для экологического мониторинга // Экология и промышленность России. 2008, № 1, январь, с. 44-45.

2. Бигалиев А.Б., Туребаев М.Н., Елемесова М.Ш., Бигалиева Р.К. Культура клеток как тест-система для исследования потенциальной мутагенной активности промышленных загрязнителей // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып. 2. М., Изд-во «Мысль», 1977, с. 74-84.

3. Дубинина Л.Г. Культура лейкоцитов человека как тест-система при анализе мутагенности факторов среды // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып. 1. М., Изд-во «Наука», 1977, с. 89-95.

4. Методические указания по использованию культуры диплоидных клеток человека, рекомендуемых для токсикологогигиенических исследований. Утверждены МЗ СССР 18.03.1991, № 15-6/21. М., 1991. 20 с.

5. Альтернативные методы исследований (экспресс-методы)
для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды: Методическое пособие. М., 1999, с. 79-89.

6. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических соединений. Гигиенические критерии окружающей среды. № 51. Женева, ВОЗ, 1982, 212 с.

7. Иванов Д.Е. Цитогенетические тесты в экологическом мониторинге опасных промышленных объектов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития», Киров, 2008, с. 422-423.

8. Федорова А.И., Калаев В.Н., Плахотина А.Ю. Биоиндикация мутагенного эффекта радона с использованием ядрышкового теста в клетках корней традесканции // Вестник ВГУ, Серия «Химия, биология, фармация», 2004, № 2, с. 151-156.

9. Методика определения токсичности питьевых, природных, сточных вод, донных отложений, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов с использованием микроядрышкового теста на проростках семян и луковицах растений. Свидетельство об аттестации МВИ № 224.01.17.066/2009.

10. Методика определения токсичности питьевых, природных, сточных вод, донных отложений, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению уровня хромосомных аберраций в апикальной меристеме проростков семян и луковицах растений. Свидетельство об аттестации МВИ № 224.01.17.067/2009.

11. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. 2008, т. 10, № 3, с. 303-309.

12. Marie Z. Vasquez. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation // Mutagenesis. 2010. V. 25(2). P.187-199.