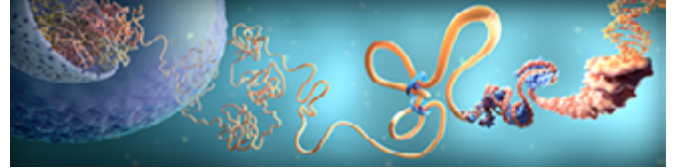


# Наиболее перспективные направления создания систем оценки токсичности объектов окружающей среды

**Т**оксины особо опасных патогенов и родственные по биологическому воздействию субстанции в общем виде нами описаны в предыдущем номере журнала. Здесь мы обратимся к некоторым другим методам оценки токсичности, комбинации которых могут быть использованы для интегральной оценки токсичности воды, воздуха, почвы и пищевых продуктов. К таким методам следует отнести: определение токсичности проб на первичных и перевиваемых культурах клеток, оценку влияния токсинов на процесс дифференцировки промиелоидных клеточных линий, оценку иммуотропного действия проб, возможности комплексного применения методов биотестирования и биоиндикации, биолюминесцентный бактериальный тест, биолюминесцентную АТФ-метрию, биотестирование с использованием ракообразных, микроводорослей и высших растений.



В данном сообщении использован большой массив опубликованных материалов по детекции токсинов, имеющийся в доступе, и сделаны выводы о наиболее рациональных направлениях исследований в данной области для создания систем выявления общей токсичности объектов окружающей среды.

Для определения токсичности проб на первичных и перевиваемых культурах клеток с целью предварительной оценки воздействия проб на живые организмы широкое распространение получили исследования, выполненные на культурах тканей. Эти модельные эксперименты имеют очевидные преимущества: относительная дешевизна по трудозатратам и материалам в отличие от экспериментов на животных, возможность разработки экспресс-методов оценки воздействия исследуемых материалов на живые объекты, проведение скрининговых опытов, достижение условий максимальной стандартизации экспериментов, расширение спектра исследований, так как позволяют на клетках одного и того же животного выполнить эксперименты, сравнивая действие разных препаратов в разных концентрациях, что невозможно в экспериментах на животных. Данные, полученные *in vitro*, относительно упрощают и оптимизируют выбор условий для экспериментов на животных.

Как пример исследования оценки влияния токсинов на процесс дифференцировки промиелоидных клеточных линий приводим схему следующего эксперимента. Человеческие промиелоидные клетки THP-1 и U937 выращивают на питательной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), дополненной 2 мМ L-глутамина, бикарбонатом натрия и 10% фетальной сыворотки теленка (Gibco, США). Дифференцировку в макрофаги индуцируют добавлением форболмиристилацетата (ФМА). Клетки U937 в плотности  $5 \cdot 10^5$  кл/мл вносят в лунки 96-луночного культурального планшета (Costar, США), добавляют «шахматным» титрованием различные дозы ФМА (от 0 до 10 нг/мл) и исследуемые препараты в различных концентрациях, затем инкубируют 48 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Контролем служат лунки, в которые добавляют эквивалентные количества ФМА без исследуемых препаратов. По истечении срока инкубации количество прикрепленных клеток определяют в тесте МТТ.

Оценивая возможности комплексного применения методов биотестирования и биоиндикации, следует высказать несколько соображений.

Подходя к проблеме выявления токсинов с экологических позиций, следует определить термин «биоиндикация» как обнаружение и определение биологически значимых антропогенных нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ, что в полной мере относится и ко всем видам антропогенного загрязнения.

Детекция содержания ксенобиотиков в почве, поверхностных водах, воздухе, пище не позволяет полностью оценить уровень загрязнения окружающей среды, опасный для здоровья человека. Это связано с тем, что содержание того или иного ксенобиотика отличается от того количества, которое попадает в организм человека, из-за различной миграционной способности, биологической активности, усвояемости соединения и различия в формах его нахождения в организме и в разных средах.

Биологические системы, применение которых возможно для выявления вредных антропогенных веществ, весьма разнообразны. В настоящее время их подразделяют на шесть подгрупп в соответствии с основными биологическими дисциплинами: микроорганизмы, растения, простейшие организмы, клеточные и субклеточные элементы, различные гидробионты.

Преимущество живых индикаторов состоит в том, что они: суммируют все без исключения биологически важные данные об окружающей среде и отражают ее состояние в целом, ибо воздействие токсических веществ является толчком к разнообразным изменениям внутри экосистемы, компоненты которой тесно связаны между собой; во многих случаях делают необязательным применение дорогостоящих трудоемких физических и химических методов для измерения биологических параметров; постоянно присутствуют в окружающей человека среде и реагируют на кратковременные и залповые выбросы токсикантов, которые может не зарегистрировать автоматизированная система контроля с периодическим отбором проб на анализы; отражают скорость происходящих в природной среде изменений; указывают пути и места скопления различного рода загрязнений в экологических системах и возможные пути попадания этих агентов в пищу человека; позволяют судить о степени вредности тех или иных веществ для живой природы и человека; дают возможность контролировать действие многих синтезируемых человеком соединений; помогают нормировать допустимую нагрузку на экосистемы, различающиеся по своей устойчивости к антропогенному воздействию, так как одинаковый состав и объем загрязнений может привести к различным реакциям природных систем в разных географических зонах.

Индикаторами могут быть любые биологические объекты на всех уровнях организации (от субклеточного до экосистемного), поэтому задачи биоиндикации во многом совпадают с задачами экотоксикологии.

Для оценки состояния окружающей среды целесообразно использовать метод комплексной биоиндикации. Он заключается в комбинации фито- и зооиндикаторов на разных системных уровнях. Это позволяет оценить состояние экосистемы с точки зрения взаимодействия природных элементов экосистем и антропогенного воздействия, выявить степень устойчивости и реакцию экосистем на воздействие человека.

Использование физиологических индикаторных признаков (биоиндикаторов) позволяет определить изменения в экосистемах на очень ранних стадиях, когда они еще не проявляются морфологическими и структурными изменениями и их нельзя выявить другими методами. Это дает возможность предвидеть нарушения экосистем и вовремя принимать меры.

Изучение состояния биоиндикаторов можно использовать как дополнительную информацию при оценке здоровья населения. Для этого целесообразно использовать именно физиологические индикаторные признаки, так как существует корреляция между физиологическими реакциями животных и человека.

В качестве биологических индикаторов могут быть как растения, так и животные. Ряд групп животных, особенно млекопитающих, очень близки к человеку по морфологическим показателям, и по реакциям таких животных можно обоснованно судить, каково будет состояние человека в таких же экологических условиях обитания.

Методами биотестирования выявляется токсичность, которая является интегральным показателем загрязнения природных сред. Как и все интегральные показатели, они имеют тот недостаток, что не раскрывают индивидуальные загрязняющие вещества, присутствующие в пробе. Однако это не мешает в дальнейшем дифференцировать токсические продукты в пробе, учитывая, что, например, для большинства биотоксинов такие методы хорошо разработаны.

В настоящее время разработано большое количество методов биотестирования, основанных на исследовании реакций на токсичное воздействие отдельных «индикаторных» тест-объектов – гидробионтов, таких как простейшие (инфузории, жгутиконосцы), кишечнополостные (гидры), черви (планарии, пиявки), моллюски (пластинчатожаберные, брюхоногие), ракообразные (дафнии, гаммарусы), рыбы, представители различных групп растений, а также микроорганизмы. Все методы биотестирования основаны на регистрации выживаемости, плодовитости, скорости роста или реакций, связанных с изменением клеточных функций (энергетические показатели, передача возбуждений, био- и хемилюминесценция, движение). Наиболее часто измеряются параметры трех типов реакций – реакций фотосинтеза, реакций био- и хемилюминесценции и поведенческие реакции. В последние годы часто для целей биотестирования применяются биохимические показатели, например активность ферментов.

Широко используются в качестве тест-организмов различные виды ветвистоусых рачков дафний (*Daphnia magna*, *Daphnia longi spina*, *Ceriodaphnia dubia* и др). Биотесты с использованием дафний основаны на оценке изменений определенного набора таких форм поведения, как кувыркание, скручивание, равномерное распределение в заданном объеме, или физиологического состояния (изменения дыхательных ритмов, сердцебиения, окраски тела, абортация зародышей и т.д.), двигательной активности (изменения частоты движения) либо выживаемости и плодовитости при помещении в тестируемую воду. Токсичность воды определяется по достоверному изменению по сравнению с контролем одного-двух регистрируемых параметров.

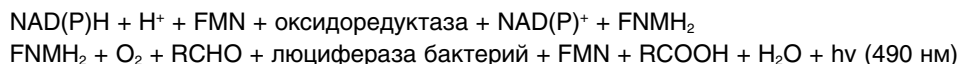
В настоящее время тесты с дафниями наиболее распространены, что обусловлено простотой культивирования этих рачков и сравнительной непродолжительностью тестирования. В странах Евросоюза принят стандарт на биотестирование сточных вод и определение токсичности отдельных химических веществ с помощью *D. magna*. По существу, это метод сводится к установлению  $LD_{50}$  в течение 48 и 24 ч (средняя смертельная доза компонента в миллиграммах действующего вещества, вызывающая гибель 50% подопытных животных) тестируемого вещества для данного вида дафний.

Таким образом, к настоящему времени разработан довольно широкий круг биологических тестов, используемых для анализа токсичности вод и почв, хотя в методическом отношении наиболее разработаны анализы токсичности водных сред.

Учитывая необходимость разработки универсального теста определения общей токсичности сред, следует более внимательно отнестись к использованию и развитию метода под названием «Биолюминесцентный бактериальный тест».

Биолюминесценция – свечение живых организмов (светляков, фотобактерий, земляного червя *Diplocardia*, некоторых кишечнорастворимых) как следствие окисления субстрата (люциферина) под действием фермента (люциферазы). Превращения субстратов люциферазной реакции приводят к образованию промежуточного электронно-возбужденного фермент-субстратного комплекса.

Люциферины и люциферазы из разных организмов сильно различаются по структуре и химическому механизму образования возбужденного продукта. В светящихся бактериях фермент люцифераза катализирует окисление молекулярным кислородом восстановленного флавина (FMNH<sub>2</sub>) и длинноцепочечного альдегида (RCHO) в окисленный флавин (FMN) и в соответствующую длинноцепочечную жирную кислоту (RCOOH):



Реакция сопровождается интенсивной световой эмиссией в видимой сине-зеленой области с широкой полосой спектра с максимумом 490–495 нм.

Интенсивность свечения зависит от изменений факторов внешней среды, таких как ее химический состав, температура, pH и других. Наличие в среде для фотобактерий разнообразных ксенобиотиков снижает уровень биолюминесценции пропорционально токсичности вещества. Наиболее эффективно ингибируют биолюминесценцию акцепторы электронов и ингибиторы дегидрогеназ. Установлено наличие гидрофобного участка в составе люциферазы для связывания неполярных соединений, что играет существенную роль в мониторинге токсичности гидрофобных ксенобиотиков.

Используют различные детекторы и методы регистрации свечения, например спектрофотометры и флуориметры с выключенными источниками света. Нашли применение также сцинтилляционные счетчики и спектрометры, установки типа «остановленная струя». Наиболее чувствительными и удобными для регистрации биолюминесценции являются фотоэлектронные умножители, когда фотон, попадая на катод фотоэлектронного умножителя, выбивает из него электрон. Возникающий фототок пропорционален количеству фотонов, испускаемых в единицу времени. Фотоэлектронные умножители могут также работать в режиме счетчика квантов. Для измерения достаточно низких уровней интенсивности люминесценции фотоэлектронный умножитель должен иметь хорошую спектральную чувствительность в видимой и близкой ультрафиолетовой области, где в основном излучают люминесцентные системы бактерий, а также высокое соотношение сигнал-шум. Выпускаемые в настоящее время разнообразные установки для регистрации биолюминесценции (биолюминометры) имеют общую блок-схему, однако различаются системами ввода образца, регистрации и обработки получаемых сигналов.

Описанный биолюминесцентный метод оценки токсичности удовлетворяет основным требованиям, предъявляемым к биотестам, и, кроме того, дает количественную меру токсичности и превосходит известные биотесты по быстроте действия, точности и чувствительности. Метод характеризуется также безвредностью, простотой в использовании, доступностью и экономичностью.

В бактериальных биолюминесцентных анализах можно использовать как интактные люминесцентные бактерии (*in vivo*), так и выделенные из них ферментные системы (*in vitro*). Неспецифическая чувствительность, выявляемая взаимосвязью между тушением биолюминесценции и концентрацией различных ксенобиотиков, дает возможность проводить первичную оценку их интегральной токсичности. Фирмой Microbics Operations Beckman Instruments, Inc. был разработан тест-реагент на основе лиофильно высушенных морских люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum* (в настоящее время *Vibrio fischeri*), получивший торговую марку Microtox и сертифицированный в быстрой токсикологии в ряде стран под другими торговыми марками. В России разработаны биосенсоры, получившие фирменный знак «Эколюм». Биотестами «Эколюм» являются как морские светящиеся бактерии, так и сконструированные генно-инженерные штаммы. Аналитическая система обладает большими преимуществами перед другими сенсорами на основе люминесцентных бактерий, позволяя проводить анализ и при более высоких температурах.

Таким образом, наиболее перспективным направлением в анализе объектов окружающей среды на наличие токсичных для человека веществ является разработка и широкое внедрение комплекса методов оценки интегральной токсичности на основе трех основных подходов: использование клеточных культур, использование тест-организмов как биологических индикаторов и применение метода биолюминесценции с тест-бактериями, полученными генно-инженерными методами для тестирования различных групп веществ.

*Главный редактор журнала «Бактериология»,  
директор «Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии»,  
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор И.А. Дятлов*