**Батарея бактериальных тест-систем для генетической токсикологии**

**Савицкая И.С., Тарасов В.А., Кистаубаева А.С., Воронова Н.В.**

### ***Казахский национальный университет им. аль-Фараби***

Одним из перспективных направлений экологических исследований является генетическая токсикология и ее новый раздел – экотоксикогенетика, который изучает воздействие факторов среды на генетический аппарат различных организмов в составе биоценоза. Основной задачей этого направления является создание методологии для классификации факторов окружающей среды по степени их генетической опасности и осуществление мероприятий, направленных на уменьшение возможных неблагоприятных генетических последствий [1]. Химические соединения, повсеместно распространенные в природе, способные мигрировать по пищевым цепям и представляющие наибольшую опасность, носят название суперэкотоксиканты [2].Для контроля за их содержанием в окружающей среде, необходимо разработать тест-системы для выявления как отдельных генотоксикантов, так и оценки суммарной активности этих факторов в сложных смесях и природных средах, прежде всего в почве.

Поскольку основное количество загрязнителей попадает именно в этот биосферный объект, при проведении эколого-генетического мониторинга почв имеет смысл осуществлять не только выявление и оценку мутагенного потенциала химических соединений, традиционно поступающих в почву, но и определять уровень загрязнения мутагенами почвенного покрова – среды обитания почвенных микроорганизмов. В связи с этим традиционно применяемые в генетической токсикологии бактериальные тесты с успехом могут применяться для данных целей не только из-за своей краткосрочности, но и ввиду возможности определения мутагенного воздействия загрязнителей на обитающие в почве прокариоты.

Для этого на практике основное тестирование или просеивающую программу можно начинать с применением первичной батареи, состоящей из трех разновидностей тестов [3]. В первую включены репарационные тесты, в которых оценивается ДНК - повреждающая активность тестируемых агентов. Они основаны на регистрации большего ингибирующего действия этих агентов у дефектных по репарации штаммов по сравнению с диким типом. Экспресс - методы регистрации агентов, взаимодействующих с ДНК, разработаны для различных микроорганизмов: *B.subtilis, P.mirabilis, E. coli*. В целом эта группа методов носит название RecА-тест, который в настоящее время существует в разных модификациях. Это, прежде всего, диффузионный тест - «spot»-тест и получивший наибольшее развитие чашечный метод - «*plate incorpоration test*» [4]. Принципиально они регистрируют один и тот же эффект – различие в токсичности испытуемых соединений в зависимости от наличия или отсутствия recА функции, одного из ключевых ферментов, участвующих в репарационных процессах. Однако результаты, полученные в «spot»-тесте трудно оценить количественно, в этом методе в большей степени регистрируется качественный эффект. Чашечный тест более трудоемкий, по сравнению с другими модификациями и хуже поддается автоматизации.

Измерение же оптической плотности бактериальной культуры может быть легко автоматизировано путем использования фотоколориметрических методов, и в этом отношении суспензионный тест является наиболее перспективным в плане создания автоматизированных систем массового скрининга. Разработанная на кафедре биотехнологии КазНУ им.аль-Фараби и в лаборатории молекулярной организации генома Иогена АН России модификация этого теста связана не просто с определением количества клеток в суспензионной культуре, а с учетом β-галактозидазной активности в lac+штаммах *E.coli* RR1 (recА+) и *E.coli* HB101(recА-) после контакта с мутагеном. Уровень продукции этого фермента также измеряется фотометрически, отдельно для recА+и recА-мутантов. Это связано с наличием специфических красителей для β–галактозидазы и, в связи с этим, высокой точностью измерения ее активности в клетках, т.е. с повышением разрешающей способности метода спектрофотометрии.

Предлагаемая тест-система была апробирована на ряде классических мутагенов, индуцирующих в ДНК различные типы первичных повреждений. Для этого у recA+ и recA- штаммов E.coli после 2-х часовой обработки мутагеном определялась оптическая плотность суспензии и активность β–галактозидазы. В качестве модельных мутагенов использовали классическимй алкилирующий агент метилметансульфонат (ММС), основным типом первичных повреждений которого являются модифицированные основания в ДНК. Параллельно с ним исследовали ДНК-тропное действие бифункционального алкилирующего агента – Митомицина С (МтС), в результате действия которого, наряду с индукцией моноаддуктов, образуются еще и межнитевые сшивки.

Таблица - Сравнительная чувствительность суспензионного Rec -теста и Rec -хромотеста

|  |  |
| --- | --- |
| Мутаген | Доза, (мкг/мл), при которой наблюдается % снижение регистрируемых параметров |
| Активность β-галактозидазы | Оптическая плотность | Кч rec-хромотеста |
| РД50 | КРД50 | ЛД50 | КЛД50 |
| recА- | recА+ | recА- | recА+ |
| Митомицин С | 1,5 | 120,0 | 0,0013 | 17,0 | 120,0 | 0,14 | 56,0 |
| Метилметансульфонат | 2,0 | 131,0 | 0,013 | 177,0 | 327,0 | 0,5 | 33,3 |
| Нитрозометилмочевина | 4,2 | 213 | 0,02 | 97 | 176 | 0,5 | 25,0 |
| Нитрозогуанидин | 0,2 | 6,2 | 0,03 | 1,7 | 5,8 | 0,3 | 10,0 |
| 2-Нитрофлуорен | 11,0 | 545,0 | 0,08 | 163,0 | 270,0 | 0,6 | 30,0 |
| Этидиумбромид | 36,0 | 43,0 | 0,8 | 70,0 | 92,0 | 0,8 | 1,0 |
| 2-Аминопурин | 227,0 | 212,0 | 1,1 | 205,0 | 210,0 | 1,0 | 1,0 |

Параметры дозовой кривой рассчитывали в полулогарифмическом масштабе, а эффективность работы тест-системы учитывали по величине коэффифиента К ЛД50, который вычисляли по отношению дозы мутагена, вызывающего 50% гибель клеток (ЛД50) у штамма recA- по сравнению со штаммом recA+. Для варианта Rec-теста К ЛД50= ЛД50 recA-/ ЛД50 recA+.

 В случае Rec-хромотеста коэфффициент рассчитывали подобным образом, но при этом определяли дозу мутагена, которая вызывает 50% снижение ферментативной активности β–галактозидазы – редукционную дозу (РД50). Для Rec-хромотеста КРД50= РД50 recA-/ РД50 recA+. По этим данным определяется коэффициент чувствительности (Кч), по которому можно сравнить эти два теста. Коэффициент чувствительности Rec-хромотеста Кч = К ЛД50/ КРД50.

Эффективность работы системы оценивалась по величине коэффициента R50, регистрирующего кратность показателей 50% снижения активности фермента или плотности культуры у recA+ и recA- штаммов после воздействия мутагена. Видно, что Кч предлагаемой тест-системы значительно различается в зависимости от того, какого типа повреждения ДНК вызывает тот или иной мутаген. Так, при воздействии таких агентов как 2-Аминопурин и этидиумбромид, коэффициент Кч =1, т.е. значения К ЛД50 (концентрация клеток) и КРД50 (редукция активности β–галактозидазы у recA+ и recA- штаммов) не различаются. Этого и следовало ожидать, поскольку данные мутагены индуцируют повреждения, которые реализуются как ошибки репликации.

Однако, для других использованных в работе мутагенов, запускающих работу репарационных систем, значения сравниваемых коэффициентов различаются в 10,0 – 33,3 раза для алкилирующих мутагенов, а в случае МтС в 56 раз. Полученные данные позволяют заключить, что эта новая система «RecА-хромотест» является сверхчувствительной и может быть использована не только для обнаружения мутагенов, но и мутагенного фона объектов окружающей среды с различной степенью загрязнения [5].

В основе другой категории методов тестирования химических веществ на генетическую активность с помощью индикаторных микроорганизмов лежит экспериментальная проверка их способности индуцировать генные мутации. Для этого чаще всего используется бактериальная тест-система Эймса, ставшая уже классической. Метод основан на способности мутагенов вызывать реверсии к прототрофности у ауксотрофных по гистидину штаммов *S.typhimurium.* Ревертировавшие под действием мутагена клетки при высеве на селективную питательную среду образуют колонии. Если исследуемый агент оказывается мутагеном, то в его присутствии число таких колоний будет больше, чем в контроле (спонтанный уровень мутаций).

Предложено достаточно большое число различных модификаций теста Эймса. Основная идея усовершенствований – автоматизация процедуры тестирования и/или повышение чувствительности к отдельным типам мутагенов. Среди наиболее значимых отметим «градиент»-тест Эймса и автоматизированный «спиральный» тест Эймса [6]. С помощью этих модификаций можно одномоментно на одной чашке оценивать мутагенные свойства веществ сразу в нескольких концентрациях.

Вместе с тем тест Эймса, несмотря на несомненную популярность, имеет и недостатки. Метод достаточно трудоемок, требует большого количества реактивов, оценка результатов может быть проведена лишь через 48 часов инкубации индикаторных бактерий с испытуемым образцом. Кроме того, тестирование нерастворимых в воде соединений может быть затруднено или даже вообще неосуществимо ввиду сложности его диффузии в слой селективного агара на чашке. И, наконец невозможно оценить мутагенную активность образцов, содержащих токсические компоненты. Поэтому предлагается новая модификация теста Эймса, основанная на биолюминесцентном методе индикации АТФ бактериальных клеток, в основе которого лежит взаимодействие АТФ, люциферазы и люциферина, сопровождающееся свечением. Т.е. биолюминесцентные варианты теста предусматривают использование штаммов, имеющих гены lux [7].

При этом одновременно определяется рост и ауксотрофов и прототрофов, что обеспечивает возможность параллельного измерения не только мутагенного, но и токсического эффекта. При этом время анализа значительно сокращается, реакция происходит в жидкой среде, измерение поддается автоматизации, что исключает субъективный фактор оценки, присутствующей в тесте Эймса. Данная модификация с успехом испытана на двух стандартных мутагенах – метилметансульфонате и нитрохинолиноксиде. Высокая чувствительность данного теста позволяет рекомендовать его для системы экологического контроля.

Существование в клетках E. coli системы генов SOS- ответа, выражение которых происходит координированно в ответ на действие мутагенов, создает реальную возможность, путем учета индукции активности любого из известных SOS - генов при действии испытуемого соединения, судить о его мутагенной активности. Эта принципиальная возможность реализована при создании так называемых SOS – хромотестов. Путем слежения за синтезом фермента β- галактозидазы, находящегося под контролем SOS-индуцибельного промотора, полученные системы позволяют качественно и количественно оценивать генотоксичность тестируемых соединений.

В настоящее время SOS – хромотест существует в двух вариантах – «хромосомном» и «плазмидном». Достаточно обширный экпериментальный материал по сравнению эффективности SOS – хромотеста с широко известным тестом Эймса указывает, что по уровню прогностической способности эти тесты примерно одинаковы. Это касается также и порога чувствительности тестов, однако по времени, затрачиваемому на одно измерение, а также простоте и возможности автоматизации SOS – хромотест несомненно превосходит тест Эймса. Следует сказать, что это сравнение относится к случаю – «хромосомного» варианта SOS – хромотеста [8].

Однако проведенные нами исследования по определению генотоксичности таких загрязнителей, как фосфорорганические и триазиновые пестициды показали, что SOS – хромотест на базе плазмиды pJB43 превосходит «хромосомный» аналог Килларде и др. по минимально обнаруживаемой концентрации (порогу чувствительности), времени, затрачиваемому на одно измерение и коэффициенту индукции в несколько раз. Достоверный эффект наблюдается в области малых доз – 1 и 10 мкг/мл, для которых активности на штаммах Эймса не обнаружено [9].

Общим достоинством бактериальных тестов является быстрота, экономичность, высокая чувствительность, возможность автоматизации. Краткосрочные бактериальные тест-системы, применяемые в генетической токсикологии, могут быть использованы в системе экологического мониторинга для измерения мутагенного фона объектов окружающей среды.

*Литература*

1. Новиков А.В. Экология, окружающая среда и человек // М.: Наука. – 2001. – 306 c.

2. Fahring R.F., Lang R., Madle S. General strategy for the assessment of genotoxicity // Mutat. Res. – 1991. – Vol. 252. – P. 161-163.

3. Тарасов В.А., Абилев С.К., Велибеков Р.М., Асланян М.М. Эффективность батарей тестов при оценке потенциальной мутагенной опасности химических соединений // Генетика. – 2003. - Т.39. - №10. – С.1406-1417.

4. Yamaguci T. Mutagenic activity of various kinds of cheese on the Ames, rec and umu assay // Mutat. Res.-1989. Vol. – 224. - №4. -P.493-502.

5. Савицкая И.С., Махмудова Г.С., Кистаубаева А.С., Ахметова Ж.А. Перспективы использования автоматизированных бактериальных тест-систем для массового скрининга генотоксичных агентов в почве // Сборник материалов II Международной конференции «Современные проблемы геоэкологии и сохранение биоразнобразия». - Бишкек, 2007 - С. 278-280.

6. Diehl M., Fort F. Spiral Salmonella assay: validation against the standard pour-plate assay // Environ. Mol. Mutagen. – 1996. – Vol. 27. – P. 227-236.

7. Guadano A., Pena E., Azucena G.C., Jose F.A. Development of new bioluminescent mutagenicity assay based on the Ames test // Mutagenesis, 1999, Vol.14, № 4. -P.411-415.

8. Quillardet P., Huisman O.,De An R., Hofnung M. SOS-chromotesti, ei direct assay of induction of a SOS function in Escherichia coli k12 to measure genotoxicity // Proc. Nat. Acad . Sci. (USA). - 1982. - Vol.79. - P.5971-5975.

9. Савицкая И.С., Махмудова Г.С., Кистаубаева А.С., Ахметова Ж.А. Перспективы использования автоматизированных бактериальных тест-систем для массового скрининга генотоксичных агентов в почве // Сборник материалов II Международной конференции «Современные проблемы геоэкологии и сохранение биоразнобразия». - Бишкек, 2007 - С. 278-280.

**Аннотация**

Приводится краткая характеристика основных разновидностей бактериальных тест-систем на мутагенез и репарацию, применяемых в экотоксикологии. Обсуждаются их достоинства и недостатки. Разработана новая модификация Rec-хромотеста. Она рекомендуется для использования в генетической токсикологии при скрининговых исследованиях для определения ДНК-тропной и антигенотоксической активности различных факторов.

**Summary**

The short characteristic of the basic versions of bacterial test systems on mutation and a reparation, applied in ecotoxicology is resulted. Their merits and demerits are discussed. Is developed new updating Rec-hromotests. It is recommended for use in genetic toxicology at screenings researches for definition of DNA-trops and antigen toxics to activity of various factors.