

## Система биотестов для генетического мониторинга объектов уничтожения химического оружия

© 2008. В.Н. Чупис, Д.Е. Иванов, Л.Л. Журавлёва, В.А. Жирнов, И.Н. Ларин, Н.В. Емельянова, Е.А. Луцкай

Научно-исследовательский институт промышленной экологии,  
e-mail: ecovector@sar-ecoinst.org

В статье рассмотрены методы оценки мутагенного фона окружающей среды, которые могут быть применены для экологического мониторинга объектов уничтожения химического оружия. В оценке на генные мутации необходимо использовать минимум три генетические тест-системы, позволяющие регистрировать индукцию различных категорий мутаций (генные, хромосомные и генома). Для генетического мониторинга заводов по уничтожению химического оружия целесообразно использовать цитогенетические тесты и автоматические приборные методы исследования генной токсичности (*Mutatox assay*, *GreenScreen EM*, *Comet assay* и др.).

Methods of genic toxicity estimation are considered applicable to ecological monitoring of chemical weapon destruction objects. In order to estimate genic mutations it is necessary to use at least three genetic test-systems, allowing registering the induction of various categories of mutations (genic, chromosomal and etc.). For genetic monitoring of chemical weapon destruction factories it is expedient to use cellular genetic tests and automatic instrument methods of genic toxicity research (*Mutatox assay*, *GreenScreen EM*, *Comet assay*, etc.).

Ключевые слова: тест-системы, генетический мониторинг, цитогенетические тесты

Известно, что часть загрязнителей среды (около 10% среди биологически активных веществ) являются генотоксикантами или обладают способностью к модификации мутагенных эффектов. Опасные в канцерогенном отношении вещества находятся в окружающей среде, как правило, в незначительных количествах, но действуют совместно; при этом наблюдаются аддитивные эффекты, а также пролонгация и кумуляция их действия. В этих случаях отнюдь не ПДК является показателем опасности, а наличие комбинаций ряда элементов, содержание которых в среде может быть даже ниже установленных ПДК, но обладает повышенной мутагенной активностью [1].

Поиск в окружающей среде факторов генотоксического действия на биоту является важным самостоятельным направлением биологического мониторинга [2].

Для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ разработано руководство по краткосрочным тестам [3]. В России существуют нормативные документы, регламентирующие определение генетической опасности отходов, поступающих в окружающую среду [4,5], а также методические рекомендации, утверждённые Министерством здравоохранения [6]. Отдельные методики оценки генотоксичности иногда используют в процессе мониторинга природных экосистем в зонах защитных мероприятий объектов по уничтожению химического оружия [7, 8]. Однако детальная оценка гено-

токсичности природных сред и отходов с помощью системы генетических тестов в настоящее время практически не проводится.

В данной статье рассмотрены генетические тесты, которые целесообразно внедрять в практику работы лабораторий биомониторинга и биотестирования, осуществляющих экологический контроль объекта уничтожения химического оружия (ОУХО).

### Система биотестов для генетического мониторинга ОУХО

Генотоксичность компонентов окружающей среды (почвы, воды, воздуха) в зоне влияния ОУХО и отходов можно оценить с помощью методов биотестирования. Для этого необходимо использовать так называемую «батарею биотестов», в которой тест-объектами являются: прокариоты, низшие эукариоты, растения, насекомые, клеточные культуры млекопитающих и человека, целостные организменные системы (таблица).

Для оценки на мутагенность необходимо использовать минимум три генетические тест-системы, поскольку мутагены могут обладать видовой специфичностью.

Химические вещества индуцируют мутации трёх типов: генные, хромосомные и геномные. Поэтому для изучения мутагенности целесообразно использовать несколько методов, позволяющих регистрировать индукцию различных категорий мутаций.

Перечень наиболее широко используемых краткосрочных тестов для выявления мутагенов и канцерогенов в окружающей среде [1, 3].

Объект	Код теста	Регистрируемые изменения
<b>Бактерии</b>		
<i>Salmonella typhimurium</i>	SAF,SAO,SA2,SA3, SA9 и др.	Генные мутации
<i>Escherichia coli</i>	ECK, ECW, EC2	Генные мутации
<i>Escherichia coli</i>	ECB,ECD,ECL,ERD	ДНК-повреждения
<i>Bacillus subtilis</i>		ДНК-повреждения
<b>Дрожжи и грибы</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SCF, SCR	Генные мутации
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SZF, SZR	Генные мутации
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SZD	ДНК-повреждения
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SZG, SCG	Генная конверсия
<i>Aspergillus nidulans</i>	ANN	Анеуплоидия
<i>Neurospora crassa</i>		Анеуплоидия
<b>Растения</b>		
<i>Tradescantia sp.</i> ,	TSM	Генные мутации
<i>Hordeum sp.</i>	HSM	Генные мутации
<i>Vicia faba</i>	VFS	Обмен сестринских хроматид
<i>Tradescantia sp.</i>	TSI	Микроядра
<i>Vicia faba, Allium cera,</i> <i>Hordeum sp.</i>	VFC, ACC, HSC	Хромосомные aberrации
<b>Насекомые</b>		
<i>Drosophila melanogaster</i>	DMG	Рекомбинации
<i>Drosophila melanogaster</i>	DMM,DMX	Генные мутации
<i>Drosophila melanogaster</i>	DMC, DMH, DML	Хромосомные aberrации
<i>Drosophila melanogaster</i>	DMN	Анеуплоидия
<b>Клетки млекопитающих in vitro</b>		
Крысиные гепатоциты	URP	ДНК-повреждения
Клетки яичника хомяка	GCO	Генные мутации
Клетки легких хомяка	GQH, G90	Генные мутации
Мышиная лимфома	G5T	Генные мутации
Культуры клеток грызунов (хомяки, крысы, мыши)	SIC, SIM,SIR, SIS, SIT, MIA CIC, CIM, CIR, CIS, CIT	Обмен сестринских хроматид Микроядра Хромосомные aberrации
Культура клеток мышей	TBM, TCM	Клеточная трансформация

(Окончание таблицы см. на с. 90 )

Объект	Код теста	Регистрируемые изменения
<b>Клетки человека in vitro</b>		
Фибробласты, лимфоциты, трансформированные клетки	UHF, UHL, UHT SHF, SHL, SH <sub>T</sub> CHF, CHL, CHT	ДНК-повреждения Обмен сестринских хроматид Хромосомные aberrации
<b>Система, опосредованная организмом</b>		
Экскреты человека - бактерии	BFH	Генные мутации
Организм животного - бактерии	HMM	Генные мутации
<b>Организм животных</b>		
Гепатоциты крысы	UPR	ДНК-повреждения
Мыши	MST, SLP	Генные мутации
Мыши, крысы, хомяки	MVM, MVR, MVC	Микроядра
Костный мозг грызунов	CBA	Хромосомные aberrации
Лейкоциты грызунов	CLA	Хромосомные aberrации
Мыши, крысы (доминантные летали)	DLM, DLR	Хромосомные aberrации
Костный мозг in vivo	UBH	ДНК-повреждения
Лимфоциты in vivo	SLH	Обмен сестринских хроматид
Костный мозг in vivo	CBH	Хромосомные aberrации
Лимфоциты in vivo	CLH	Хромосомные aberrации

Для *генетического мониторинга* ОУХО перспективно применять цитогенетические биотесты. С их помощью можно изучить хромосомные aberrации и индукцию микроядер в клетках млекопитающих, рыб и растений. Преимуществом цитогенетических тестов является то, что они выполняются быстро и со сравнительно скромными затратами.

В настоящее время в России для оценки генотоксичности наиболее часто используют *тест Эймса*, биотестирование на дрозофиле и цитогенетические тесты, а за рубежом также SOS Chromotest, Mutatox assay, Green-Screen EM, Comet assay [9 – 14].

Тест Эймса на индукцию мутаций у *Salmonella typhimurium* является бактериальной тест-системой для учёта обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности при действии химических соединений и/или их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания в геноме этого организма.

Для определения наличия промутагенных соединений, мутагенная активность которых связана с активностью их метаболитов, используется система метаболической активации in vitro. Если в тестируемом образце содержатся мутагенные или промутагенные хи-

мические соединения, то они будут индуцировать обратные мутации от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у гистидин-зависимых штаммов *Salmonella typhimurium*. В работах по выявлению мутагенной активности химических соединений обычно используют тест-штаммы *S. typhimurium* TA: TA1535, TA100, TA1537, TA97, TA1538, TA98, сконструированные в лаборатории Эймса из исходного штамма *S. typhimurium* LT-2 дикого типа. Все эти штаммы содержат различного типа мутации в гистидиновом опероне, что приводит к их ауксотрофности по гистидину.

Метод *анализа единичных клеток* (*Comet assay*) позволяет идентифицировать генетические повреждения и нитевые разрывы ДНК в небольшом числе клеток из любого источника. Суть метода заключается в том, что образцы клеток лизируют в щелочных условиях и подвергают электрофорезу. Клетки, содержащие разрывы ДНК, проявляются в виде «кометы» с хвостом из фрагментов ДНК, отходящих от основного ядра. Технология метода Comet assay достаточно проста и может быть использована для широкого круга ситуаций, когда необходимо определить наличие разрывов и щелочлабильных сайтов в ДНК клеток из различных тканей. При этом ана-

лизируется только небольшое число клеток, что делает метод очень удобным при его использовании для тестирования на генотоксичность.

**SOS-хромотест** основан на современных представлениях о механизме мутационного процесса как следствия функционирования SOS-репарации. В клетках *E. coli* SOS-ответ включает ряд функций, которые индуцируются в ответ на повреждение ДНК или остановку её синтеза. Одна из SOS-функций, контролируемая геном *sfhA*, выражается в ингибировании клеточного деления и нитевидном росте. В клетках тестерного штамма *E. coli* pQ 37 под контроль промотора гена *sfhA* введён структурный ген –  $\beta$ -галактозидазы. Таким образом, активность  $\beta$ -галактозидазы, определяемая колориметрически по интенсивности цветной окраски на этот фермент, непосредственно зависит от степени экспрессии гена *sfhA* и является показателем индукции SOS-функции.

Анализ имеющихся данных показывает, что SOS-хромотест может дополнить тест Эймса на мутагенез в следующих аспектах:

- обнаружение канцерогенов, проявляющих мутагенность только при активации в жидкой среде;
- для определения антиметаболитных ингибиторов синтеза ДНК.

Главным преимуществом SOS-хромотеста является его практичность. Используется всего один штамм. Это очень важно, так как увеличение числа штаммов, как это делается в тесте Эймса с целью повышения его чувствительности, усложняет и удорожает работу. Количественный колориметрический ответ может быть получен в течение нескольких часов.

Основной недостаток SOS-хромотеста заключается в том, что не обнаруживает активности большинства интеркалирующих в ДНК агентов.

Анализ целостности ДНК в клетках живых организмов можно проводить **флюориметрическим методом** [15].

В **месте** оценки токсичности **Mutatox** используют специальные штаммы бактерий, которые под действием генотоксикантов начинают интенсивнее светиться, и это регистрируется с помощью специальных приборов.

Следует отметить, что батарея тестов должна содержать максимально информативный набор методов, позволяющих регистрировать различные типы генетических изменений. Использование системы биотестов для опре-

деления генотоксичности существенно повысит качество экотоксикологического анализа.

## Литература

1. Худoley В.В., Мизгирев И.В. Экологически опасные факторы. СПб. 1996. 186 с.
2. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: Вятка, 2002. 544 с.
3. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Женева: ВОЗ, 1989. № 51. 212 с.
4. Моисеева М.В., Кричевская И.Е., Михеев В.С. и др. Методические основы биотестирования и определения генетической опасности отходов, поступающих в окружающую среду (РД 64-085-89). Министерство медицинской промышленности СССР. Москва. 1990. 45 с.
5. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 16 июня 2003 г. № 144 «О введении в действие СП 2.1.7.1386-03». 20 с.
6. Журков В.С., Красовский Н.Г., Жолдакова З.И. и др. Методические указания по изучению мутагенной активности химических веществ при обосновании их ПДК в воде. МЗ СССР. Главное санитарное управление. М., 1986. 26 с.
7. Быстракова Н.В. Перспективы применения методов цитогенетики для мониторинга мелких млекопитающих в нарушенных местообитаниях // Мониторинг природных экосистем в зонах защитных мероприятий объектов по уничтожению химического оружия: Сборник статей. Всеросс. научно-практ. конф. Ч. 1. Пенза: РИО ПГСХА, 2007. С. 25-30.
8. Титов С.В., Курмаева Н.М., Быстракова Н.В. и др. Молекулярно-генетический анализ популяций мышевидных грызунов зоны защитных мероприятий объекта по уничтожению химического оружия в Пензенской области // Мониторинг природных экосистем в зонах защитных мероприятий объектов по уничтожению химического оружия: Сборник статей. Всеросс. научно-практ. конф. Ч. 1. Пенза: РИО ПГСХА, 2007. С. 182-187.
9. Фонштейн Л.М. Тест-системы для оценки мутагенной активности загрязнений среды на *Salmonella typhimurium*. М., 1977. 126 с.
10. Faibairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. The comet assay: A comprehensive review // Mutat. Res. 1995. V. 339, P. 37-59.
11. McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay 300 chemicals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975, V. 72. P. 5135-5139.
12. Федорова А.И., Калаев В.Н., Плахотина А.Ю. Биоиндикация мутагенного эффекта радона с использо-

ванием ядрышкового теста в клетках корней традесканции // Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация. 2004. № 2. С. 151-156.

13. Daniel M., Sharpe A., Driver J., Knight A.W., Keenan P.O., Walmsley R.M., Robinson A., Zhang T. and Rawson D. Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents // Journal of Environmental Monitoring. 2004. V. 6. P. 855-865.

14. Kwan K.K., Dutka B.J., Rao S.S., Liu D. Mutatox test: a new test for monitoring environmental genotoxic agents // Environ Pollut. 1990. V. 65. № 4. P. 323-332.

15. Усольцев М.В., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Применение флюориметрического метода исследования целостности ДНК на примере оценки генотоксичности диоксида // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2000. Т. 63. № 2. С. 60-62.

УДК 504.056:574

### Методический подход к повышению качества технического мониторинга в зонах влияния химически опасных объектов

© 2008. В.А. Алексеев, М.В. Телегина, М.В. Цапок  
Ижевский государственный технический университет,  
e-mail: lazer@istu.ru

Рассмотрена структура организации технического мониторинга в зонах влияния химически опасных объектов. С целью повышения оперативности, надёжности и достоверности определения возникновения аварийной ситуации предложена геометрическая расстановка постов наблюдения на местности с использованием принципа «треугольника» и взаимной корреляции во времени аварийных измерительных сигналов.

Structural organization of technical monitoring is examined within the impact of zones of chemically dangerous objects. To increase reaction, reliability and certainty of emergency identification, it is offered to use the geometric arrangement of observation posts at site according to the «triangle» principle and mutual time correlation of emergency signals.

Ключевые слова: химически опасный объект, организация технического мониторинга, посты наблюдения, аварийный выброс, заражённое облако

В настоящее время в России и государствах СНГ эксплуатируются более 1000 крупных химически опасных объектов (ХОО) с большим количеством ядовитых и взрывоопасных веществ [1]. К ним относятся хранилища (склады) токсичных химикатов, места их уничтожения, а также средства их транспортировки. Особое место занимают ХОО, на которых хранится и уничтожается химическое оружие.

Одним из важнейших элементов системы обеспечения безопасного функционирования ХОО является мониторинг.

Данный вывод исходит из понимания его основной роли в системе безопасности, состоящей, прежде всего, в том, что мониторинг является первоисточником для получения информации о состоянии объекта. Фактически система мониторинга определяет необходимые условия для правильной оценки обстановки и принятия своевременных решений в случаях возникновения различных чрезвычайных ситуаций.

С точки зрения вида и объёма информации, требующей мониторингового наблюдения, различают технический, экологический, а также мониторинг здоровья персонала и населения, проживающего в районе размещения ХОО.

Согласно классической терминологии, под техническим мониторингом (ТМ) понимают систему наблюдений за источниками и факторами воздействия на окружающую природную среду [2].

С учётом требований, предъявляемых к ХОО в плане обеспечения их безопасной эксплуатации, ТМ должен представлять собой комплексную систему слежения, оценки и прогноза изменений состояния окружающей природной среды и предупреждения о создающихся критических ситуациях, вредных или опасных для здоровья людей и других живых организмов.

Одной из задач проведения ТМ является обнаружение воздействий токсичных химикатов, возникающих при выбросах в атмосферу