

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Южный федеральный университет»

«УТВЕРЖДАЮ»

д.б.н. В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2016 г.

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОТЧЁТ

на тему:

«Анализ научной литературы и подготовка обзора литературы по контролю
генотоксинов в кормах для птиц»

Соглашение РФФ № 16-16-04032 от 11.08.2016 г (вн. № 213.01-03/2016-9) по научному
проекту «Замедление репродуктивного старения кур с помощью культур пробиотических
микроорганизмов – продуцентов веществ с антиоксидантной и ДНК-протекторной
активностью»

Руководитель: д.б.н., В.А. Чистяков

Исполнитель: член-корр. РАН, д.м.н., А.В. Тутельян

Ростов-на-Дону

2016г.

Качество кормов для сельскохозяйственной птицы напрямую зависит от используемого для их производства сырья – продукции растениеводства. По оценкам BusinessStat, в 2014-2017 гг. объем продаж химических средств защиты растений на российском рынке будет расти в среднем на 6,2% в год; в 2017 г. объем продаж составит 140 000 т, что превысит уровень 2012 г. на 35% (Долгова, 2015). Химические средства защиты растений и другие поллютанты антропогенной природы могут кумулироваться и вызывать развитие кормовых токсикозов у птицы (Александров, 2000), а также, попадая затем в продукты питания, оказывать генотоксический эффект (Дубинин, 1977; Куринный, 1983; Абилов и др., 2012; Kier, Kirkland, 2013). Актуальность исследования мутагенных свойств химических соединений обусловлена тем, что большинство мутагенных соединений проявляют канцерогенный эффект и представляют опасность для здоровья человека (Абилов и др., 2012; Poirier, 2016; Lin e.a., 2016; Roos e.a., 2016). Например, было показано, что пестициды в растворах легко образуют комплексные соединения с металлами (Saratovskikh, 1989), характеризующиеся высокой устойчивостью (Saratovskikh, 1989; 2006; 2007). Одна из характерных черт мутагенных и канцерогенных веществ — способность проявлять биологическую активность даже при очень низких концентрациях. Это затрудняет их аналитическое определение в биологических тканях. При этом с помощью химических методов и анализа структуры вещества можно только прогнозировать, какие вещества проявят канцерогенное и мутагенное действие (Абилов и др., 2012). По этой причине для анализа канцерогенности и мутагенности различных соединений все шире применяются биологические тесты.

Генотоксины как наиболее опасный класс антропогенных поллютантов

Деление, рост, дифференциация, функционирование клеток - процессы, неразрывно связанные с их генетическим аппаратом. Отсюда разнообразие нарушений, опосредованных деструктивным действием на генетический аппарат.

Известно, что действие мутагенов - веществ, вызывающих мутации или иные генетические повреждения, приводит к росту числа наследственных заболеваний, врожденных уродств и развитию злокачественных опухолей (Kasai, 2016).

Особая опасность мутагенных соединений заключается в том, что они могут вызывать значительное увеличение числа рецессивных мутаций, ведущих к тяжелым заболеваниям, которые не проявляются в первом поколении, но, постепенно накапливаясь, могут через несколько поколений вызвать "взрыв" заболеваемости у различных живых объектов.

Взаимодействие поллютантов с генетическим аппаратом клеток может иметь следующие точки приложения: изменение конформации ДНК, нарушение процесса репликации ДНК, разрушение ДНК, нарушение механизмов регуляции синтеза ДНК, нарушение синтеза нуклеотидов, нарушение процесса репарации ДНК (Куценко, 2002). Токсикологическое значение веществ, влияющих на ДНК, обусловлено их мутагенным, тератогенным и канцерогенным действием (Порошенко, Абилов, 1988). Повреждающее действие химических веществ на ДНК называется *генотоксическим* (Тарасов и др., 1999). Наиболее чувствительны к генотоксическому действию клетки, способные к делению (эмбриональные, герменативные, костного мозга, эпителия почек, кожи, слизистой желудочно-кишечного тракта и т.д.). В основе канцерогенного, тератогенного, мутагенного действия лежат, по сути, общие механизмы (Кирсо и др., 1988), однако превращение конкретного вещества в канцероген, тератоген, мутаген зависит от целого ряда условий.

Тем не менее, для сильных мутагенов, например таких как 2,3,7,8-тетрахлордibenzo-p-диоксин, проникновение в организм даже единственной молекулы генотоксиканта может привести к пагубным последствиям. Химическое повреждение единичной молекулы ДНК в единичной клетке макроорганизма, при стечении обстоятельств, может стать причиной мутагенеза, тератогенеза, канцерогенеза (Куценко, 2002).

В ходе эволюции были выработаны механизмы репарации ДНК (Тарасов, 1982).

Репарация – это способность клетки корректировать и устранять повреждения ДНК. Например, метилтрансферазы принимают участие в деметилировании O-6-метилгуанина. Гликозилазы расщепляют связи между азотом-9 пурина, подвергнувшегося алкилированию, образуя участки депуризированной ДНК. Фрагменты нуклеиновой кислоты, состоящие, как правило, из 3-4 нуклеотидов, включая депурированный участок, вырезаются из цепи с помощью эндонуклеаз. В дальнейшем удаленные фрагменты заполняются при участии ферментов ДНК-полимераз и встраиваются в общую цепь с помощью ДНК-лигаз. Сбои в этом механизме могут приводить к повреждению генетического кода клеток. Так, например, ингибиторы лигаз угнетают процессы репарации ДНК и повышают частоту мутаций (бензамид). Интоксикация некоторыми веществами сопровождается активацией эндонуклеаз и разрушением ДНК (Куценко, 2002).

Классификация мутагенов

Мутагены – это физические и химические факторы, воздействие которых на живые организмы приводит к появлению мутаций с частотой, превышающей уровень спонтанных мутаций. Для того, чтобы агент был мутагеном, он должен обладать определенными свойствами: во-первых, легко проникать в клетки организма, сохраняя его жизнеспособность, и, во-вторых, достигать ядра клетки и влиять на химическую структуру хромосом и происходящие в них химические процессы.

Единой классификации мутагенов в настоящее время нет. Одни авторы делят их на классы в соответствии с принципами механизма их действия, а другие – по характеру вызываемых ими повреждений ДНК.

Среди классификаций первого типа наиболее популярным было разделение химических мутагенов на аналоги азотистых оснований, окислители, восстановители, свободные радикалы, акридиновые красители, гидроксилламин, алкилирующие соединения. Кроме того, химические мутагены пытались подразделять по способности действовать на хромосомы, находящиеся в состоянии покоя или в процессе репликации. К агентам, способным взаимодействовать с генетическим материалом неделящихся бактериальных клеток и вирусов, относили соединения типа гидроксилламина, некоторые окислители и восстановители, которые модифицируют основания без их удаления и образования поперечных сшивок; моно- и бифункциональные алкилирующие соединения, альдегиды, свободные радикалы, агенты типа митомицина С, индуцирующие разрывы полинуклеотидных цепей с образованием ковалентных мостиков между основаниями и сшивками нитей ДНК. Основными представителями мутагенов, действующих только в период репликации, считались аналоги оснований, а также акридины, вызывающие во время репликации вставку или исключение пары оснований (Шигаева и др., 1994).

Согласно второму типу классификации (Тарасов, 1982), химические мутагены следует делить на индуцирующие модифицированные основания (аналоги оснований, азотистая кислота, четырехокись осмия, гидразины, бисульфит, гидроксилламин); имитирующие действие УФ-излучения (4-НХО, N-ацетоокси-ААФ, БМБА); присоединяющиеся к основаниям углеводородные радикалы (все алкилирующие мутагены); вызывающие аtimiновые сайты в структуре молекулы ДНК (флеомицин, блеомицин); фотосенсибилизирующие (псоралены, ацетофеноны, некоторые фотоалкилирующие: 2-пропиламин, ди-изопропанол). К химическим мутагенам относятся также некоторые биополимеры (чужеродные ДНК или РНК), алкалоиды и многие другие.

К физическим мутагенам относятся все виды ионизирующего излучения (гамма- и рентгеновские лучи, протоны, нейтроны и др.), ультрафиолетовое излучение, высокие и низкие температуры.

Мутагены, увеличивающие частоту мутаций в сотни раз (например, нитропроизводные мочевины), называются супермутагенами. Агенты, действию которых на клетки организма препятствуют его защитные механизмы, оказываются слабыми мутагенами (например, воздействие температуры). При длительном действии агента организм может приспособиться к нему за счет различных защитных адаптивных

механизмов. Следовательно, мутагенный эффект того или иного фактора может контролироваться приспособленностью к нему организма.

В настоящее время делается попытка классификации химических мутагенов по их структуре и действию. К первой группе относятся высокоактивные химические вещества, которые могут переносить алкильные группы на другие молекулы. Сюда входят наиболее активные химические мутагены (иприт, формальдегид, этилметансульфонат и др.), которые по своему мутагенному эффекту сходны с ионизирующими излучениями (радиомиметики).

Ко второй группе относятся генераторы активных форм кислорода, в том числе перекиси. Активным началом в данном случае являются свободные радикалы ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$), поэтому все факторы, способствующие образованию свободных радикалов, усиливают мутагенный эффект перекисей. К таким факторам относятся кислород, ультрафиолетовые лучи, видимый свет, ионы металлов с переменной валентностью и т.д.

Механизм третьей группы – метаболит-аналогов, заключается в замещении ими нормальных метаболитов в ходе обменных процессов в клетке. К этой группе относятся, например, различные производные пуриновых и пиримидиновых оснований - бромурацил, аминопурин, производные фолиевой кислоты, аминоптерин и др.

К четвертой группе относятся вещества, принцип действия которых еще не ясен: это различные минеральные соли, алкалоиды, некоторые красители и другие вещества (Шигаева и др., 1994).

Существует также классификация, дифференцирующая мутагены на природные, производственные, пищевые, лекарственные и другие антропогенные мутагены.

Также их можно разделить на две большие группы – истинные, или прямые, и непрямые, или промутагены, у которых мутагенный эффект проявляется лишь после метаболической активации в организме млекопитающих, насекомых и растений под влиянием ферментов микросом.

Многие антропогенные поллютанты обладают генетической активностью. Широкий спектр генотоксинов характерен для **полиароматических углеводородов (ПАУ)** (Clapp et al., 2008; Achten, Hofmann, 2009). ПАУ – это органические соединения, для которых характерно наличие в химической структуре трех и более конденсированных бензольных колец. Основными источниками эмиссии техногенных ПАУ в окружающую природную среду являются предприятия энергетического комплекса, автомобильный транспорт, химическая и нефтеперерабатывающая промышленность. В основе практически всех техногенных источников ПАУ лежат термические процессы, связанные со сжиганием и переработкой органического сырья: нефтепродуктов, угля, древесины, мусора, пищи, табака и др. Для некоторых ПАУ характерен особый элемент структуры молекулы, так называемая *bay*-область, которая легко окисляется с образованием способного реагировать с ДНК эпоксида. Данная реакция катализируется микросомальными оксидазами, поэтому для проявления генотоксичности и канцерогенности ПАУ необходима метаболическая активация.

Не меньший вклад в рост генотоксичности среды вносят галогенорганические соединения: полихлорированные бифенилы (ПХБ), полибромированные бифенилы (ПББ), фосфорорганические соединения.

Наиболее опасными из хлороорганических соединений, безусловно, являются диоксины (Matés et al., 2010). Эти молекулы содержат два бензольных кольца, кислород и хлор. Наиболее опасен 2,3,7,8-тетрахлор-дibenзо-*p*-диоксин.

Принятые в России предельно допустимые концентрации этих веществ составляют для атмосферного воздуха 0,5 пг/м³, для питьевой воды - 20 пг/л, для молока - 5,2 нг/л. В России норма допустимого поступления диоксинов в организм человека - 10 пг/кг. Для сравнения, в США тот же показатель равен 0,006 пг/кг.

2,3,7,8-тетрахлор-дibenзо-*n*-диоксин является одним из наиболее сильных из идентифицированных на сегодняшний день канцерогенов. Однако его генотоксический эффект опосредован образованием 2- и 4-катехолэстрогенов (Spink et al., 1998).

Специфическое место среди мутагенов окружающей среды занимают выделяемые грибами микотоксины (Kensler et. al., 2011). Эти соединения в большом количестве образуются при неправильном хранении или нелегальном захоронении пищевых продуктов. Многие микотоксины, в частности, принадлежащие к группе афлатоксинов, вырабатываемых *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, обладают выраженным гепатоканцерогенным эффектом. Подобно ПАУ, микотоксины требуют для проявления своих мутагенных свойств метаболической активации.

Наиболее опасными неорганическими генотоксинами являются **соли тяжелых металлов**. К тяжелым относят металлы с плотностью выше 5 г/см³. Мутагенными и, соответственно, канцерогенными считаются соли кадмия, хрома, никеля, ртути, молибдена, мышьяка и др. металлов с переменной валентностью. Со способностью адсорбировать на поверхности кластеры ионов металлов связывают канцерогенность асбеста. Механизм генотоксического действия металлов связан с генерацией активных форм кислорода (Чистяков, 2003).

Методы мониторинга генотоксичности

Существует множество различных программ и схем генетического скрининга на основе различных тестов. В настоящее время известно более 100 тестов с различной степенью информативности, регистрирующих огромное разнообразие генетических повреждений. Однако реально практическое применение имеют не более 20 тест-систем (Дурнев, Середенин, 1998; Mahadevan et al, 2011). Генетическая активность ксенобиотиков оценивается в них путем регистрации повреждений ДНК, генных мутаций или хромосомных aberrаций.

Скрининг повреждений ДНК включает в себя следующие методы:

- оценивающие целостность двуничатой полимерной структуры ДНК;
- регистрирующие модифицированные основания ДНК;
- основанные на регистрации меченых оснований ДНК, которые включаются в макромолекулы при репарации.

В первой группе методов часто используются седиментация радиоактивно- или флюоресцентно-меченной ДНК в градиенте плотности щелочной сахарозы, эластовискозиметрия ДНК (Абилев, Порошенко, 1986), метод (³²P)-пост-мечения (Williams, 1989), хроматографические методы, иммунологические методы (Valdiglesias et al, 2011). Из методов, основанных на оценке электрофоретической подвижности ДНК, перспективным является «метод ДНК-комет» (Comet-assay). Метод дает возможность судить о возникновении щелочелабильных сайтов, одиночных и парных разрывах ДНК, различных типов сшивок в клетках практически любых типов. Он позволяет вести индивидуализированное по клеткам тестирование (Bosco et al., 1996; Shaposhnikov et al., 2009).

Регистрация повреждений ДНК, основанная на учете модифицированных оснований, может быть осуществлена самыми разными способами, хорошо известными в молекулярной дозиметрии, например, методами хроматографии высокого разрешения и иммуноферментного анализа (Cleaver, 1984; Koivisto, Peltonen, 2010).

Из непрямых методов оценки повреждений ДНК наиболее часто используется детально разработанный еще в 80-х годах метод учета внепланового синтеза ДНК в культивируемых клетках млекопитающих (Руководство, 1989). Он основан на автордиографической или сцинтилляционной регистрации (³H)-тимидина, включенного в ДНК в результате репарации повреждений. Метод учета СХО (Руководство, 1989) основан на дифференциальной окраске сестринских хроматид. Для окраски хроматид в среду добавляют 5-бромдезоксимуридин на срок, достаточный для прохождения клетками двух циклов репликации ДНК. Количество СХО на клетку характеризует повреждающую ДНК

активность исследуемого вещества. Довольно широко также используется SOS-хромотест (Quillardet, 1982).

Ввиду своей дешевизны и экспрессности для скрининга генных мутаций широко используются **тест-системы с использованием микроорганизмов** (Biran et al., 2010). Основу микробным тестам положил тест Эймса (*Salmonella*/микросомы). Тест Эймса основан на детекции реверсий к дикому типу мутантных по гену гистидина клеток (His^-) на среде без гистидина (Ames et al., 1975). Реверсии от ауксотрофности к прототрофности служат показателем возникновения генных мутаций (Ames et al., 1975). Но метод Эймса не пригоден для тестирования проб, содержащих гистидин. При определении мутагенной активности экстрактов тканей в питательную среду поступает дополнительное количество гистидина, что способствует появлению ложноположительных результатов.

С целью повышения чувствительности к отдельным типам мутагенов и автоматизации тестирования в последние десятилетия предложены различные модификации теста Эймса. Наиболее значимые – «градиент»-тест Эймса (Rexroat et al., 1995) и автоматизированный «спиральный» тест Эймса (Diehl, Fort, 1996). С помощью этих модификаций можно одновременно на одной чашке оценивать мутагенные свойства вещества сразу в нескольких концентрациях.

Метод локального мутагенеза, предложенный в 1971 г. Хонгом и Эймсом (Hong, Ames, 1971), позволяет выделять мутанты с вновь индуцированными мутациями, локализованными в небольшой области бактериальной хромосомы. Мутации индуцируются в коротком отрезке ДНК бактерии, который содержится в трансдуцирующем бактериофаге, и затем обнаруживаются в клетках, подвергшихся трансдукции, отбором по близко сцепленному маркеру. Таким образом, можно селективно получать мутации в области, составляющей около 1 % бактериальной хромосомы.

У дрожжей, так же как и у бактерий, учитывают прямые и обратные генные мутации, применяют метаболическую активацию, кроме того, дрожжи сами активируют многие промутагены. В дополнение к этому, у дрожжей исследуют внутригенную рекомбинацию (конверсию) и реципрокную рекомбинацию в митозе. На основе генетических критериев у этого объекта учитывают также хромосомные aberrации — потерю плеча или всей третьей хромосомы, а также нерасхождение хромосом.

Репарационный тест на *E.coli* использует нормальный штамм *E.coli* $rec A^+$ и мутантный *E.coli* $rec A^-$, дефектный по гену, отвечающему за рекомбинацию и репарацию ДНК. Метод основан на том, что при наличии ДНК - повреждающего эффекта исследуемого вещества при определенных его концентрациях рост мутантных бактерий не регистрируется, так как повреждения в наследственном аппарате, индуцирующие рекомбинантную репарацию, не исправляются, и в итоге оказывают летальное воздействие. Бактерии дикого типа при данных концентрациях агента проявляют нормальную способность к росту (Takigami et al., 2002).

SOS-ответ представляет собой комплексный ответ клеток *E.coli* на действие ДНК-повреждающих агентов и ряд других неблагоприятных воздействий и заключается в активации экспрессии ряда ферментов (около двадцати по современным представлениям), обеспечивающих репарационные функции и приостанавливающих нормальное деление клеток (Walker et al., 1984). Ключевым механизмом, контролирующим экспрессию этих генов, является протеолитическое расщепление белка Lex A – репрессора SOS-зависимых промоторов, активированной формой RecA белка.

Одним из проявлений SOS-ответа у клеток прокариот является индукция профага λ (Барцевич и др., 1989). Бактериофаг (фаг) λ – типичный умеренный фаг. Поэтому после проникновения в клетку фаг может вступать как в продуктивный (литический), так и в умеренный (лизогенный) циклы. В ходе литического цикла синтезируются белки вириона, упаковываются реплицированные геномы, клетка лизируется и из нее освобождается около 100 фаговых частиц. В лизогенном цикле большая часть функций ДНК фага остается репрессированной. Происходит интеграция генома в специфический участок

хромосомы *E. coli*. В этом случае геном фага (профаг) реплицируется вместе с хромосомой хозяина. В результате возникновения повреждений в ДНК бактерии-хозяина активируется белок Rec A, который расщепляет репрессор Lex A и близкий по структуре репрессор фага C1. Происходит индукция профага, т. е. переход на литический путь развития (Пташне, 1989).

Наиболее точным для количественного учета фагов является метод, основанный на подсчете числа образуемых ими негативных колоний или бляшек. При высеве фагов на чашки с индикаторной культурой по истечении определенного времени происходит образование негативных колоний – участков лизиса на фоне газона роста индикаторной культуры. Существует ряд систем (индуктесты), основанных на учете индукции профага λ , включающих в себя лизогенный и индикаторный штаммы (Moreau et al., 1976).

Для учета мутаций широко применяются и тест-системы на клетках различных млекопитающих и человека. Частоту мутаций оценивают по устойчивости клеток к селективному фактору, токсичному для немутантных клеток.

In vivo часто используют метод учета рецессивных связанных с полом летальных мутаций у *Drosophila melanogaster* (Williams, 1989). Существует множество тестов на *Drosophila*, в которых дифференцированно определяются генные и геномные типы мутаций, а также повреждение ДНК (Friede, Miller, 1992).

Регистрация рецессивных связанных с полом летальных мутаций возможна и у млекопитающих. Также на млекопитающих часто применяется метод учета мутаций в специфических локусах. Для выявления генных мутаций в половых и соматических клетках млекопитающих предлагаются методы, основанные на изучении электрофоретической подвижности белков (Lewis et al., 1991).

Перспективным является расширение использования в тестах трансгенных грызунов. Это позволяет получать репрезентативный материал по частоте мутаций практически из любой ткани (в частности, прижизненно путем кожных биопсий), а также возможно формирование тканеспецифичных линий клеток, для которых подтверждено наличие хороших соответствий параметров *in vitro* / *in vivo*. По изменению интегрированных в геном тестерных генов (выявляемому, например, с помощью ПЦР) можно выявлять индукцию ксенобиотиком генных мутаций (Gordon et al., 1993; Boverhof et al., 2011).

Для регистрации хромосомных мутаций чаще всего используют цитогенетические методы: метод учета хромосомных aberrаций в метафазных клетках пролиферирующих тканей *in vitro* или *in vivo* и метод учета микроядер, который чаще используют *in vivo*. Методы основаны на микроскопическом учете видимых нарушений структуры хромосом (хромосомных aberrаций) в метафазных клетках.

В экспериментах *in vitro* хромосомные aberrации анализируют в клетках первичных и перевиваемых клеточных культур животных и человека: лимфоцитах периферической крови и фибробластах кожи человека, перевиваемых клетках китайского хомячка, клетках мышинной лимфомы и др.

Тест-объектами для изучения хромосомных повреждений *in vivo* являются клетки костного мозга, печени и периферической крови лабораторных животных. В любом случае возникают сложности при интерпретации результатов, заключающиеся в неидентичности действия вещества на изолированную клетку и на целый организм. Очевидно, вырванная из привычного окружения клетка испытывает стресс, в дальнейшем ведет себя неадекватно, кроме того, у неё в условиях *in vitro* нет всех защитных систем целостного организма. В качестве альтернативы учету хромосомных aberrаций и методу учета микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга грызунов (Angelosanto, 1995), предлагается учет доминантных летальных мутаций (Руководство, 1989), учет наследуемых транслокаций (Generoso et al., 1980).

Изучение мутагенных соединений на растительных объектах представляет интерес по нескольким причинам. Во-первых, проверяется мутагенная активность вещества для

растений. Во-вторых, в комплексе с животными системами активации ксенобиотиков тесты на растениях можно использовать в скрининге. В третьих, исследуется возможность накопления мутагенов в видах, имеющих сельскохозяйственное значение. Но большинство из существующих тестов с использованием растительных объектов сопряжено с рядом трудностей методологического и экономического порядков.

Большие возможности открывает применение трансгенных мух для тестирования. Перспективен метод FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) в маркировании фрагментов ДНК, например, центромерных сегментов в микроядрах. (Dean, 1997). Информативные данные по характеру воздействия загрязнителей на геном тест-объекта могут быть получены путем типирования по группе стандартных RAPD-маркеров (Conte et al., 1996).

Особое место в протоколах тестирования генетической активности занимают бактериальные биосенсоры (Van der Lelie et al., 1994). Первоначально для упрощения методики оценки повреждений в ДНК в бактериальной клетке (чтобы измерять не окончательный результат ответа - формирование мутаций, а фиксировать сам процесс SOS-индукции, необходимо были сконструированы рекомбинантные ДНК, содержащие два необходимых компонента:

1) индуцируемый промотор, т.е. промотор с регуляторным элементом, который активировался лишь при SOS-индукции, и 2) ген (или гены) - репортер, продукт которого можно сравнительно просто и быстро измерять, и который синтезируется лишь при условии SOS-индукции. Подобная генетическая конструкция должна быть встроена или в хромосому клетки, или в плазмиду, автономно реплицирующуюся в клетке. Бактериальная клетка, содержащая подобную конструкцию, называется **биосенсором** (Robbens et al., 2010).

На определении уровня SOS-ответа *E. coli* и *S. typhimurium* основан ряд биосенсоров для анализа мутагенного эффекта химических веществ, в частности, хромотест (Quillardet et al., 1982) и umu-тест (Witkin, 1976).

Регистрация эффекта в этих методах осуществляется путем измерения уровня фермента β -галактозидазы, ген которого под контролем определенного SOS-промотора локализован либо в хромосоме *E. coli*, либо на плазмиде. Используемые штаммы в обоих случаях несут мутации в хромосомном гене β -галактозидазы. В SOS-хромотесте в качестве тест-системы для определения генотоксичности используются клетки *Escherichia coli* PQ 37 со структурным геном β -галактозидазы (оперон *lac Z*), находящимся под контролем SOS-контролируемого гена *umcA*. Umu-тест использует рекомбинантный штамм *S. typhimurium* TA 1535(pSK 1002) с совмещенным *umuC**lacZ* опероном на плазмиде. В обеих системах сила SOS-индукции определяется колориметрическим измерением содержания фермента β -галактозидазы, образуемой в ответ на действие генотоксинов.

Таким образом, в последние годы целью ряда исследований была разработка биосенсорных методов для оценки воздействия мутагенных и канцерогенных факторов окружающей среды на клетку, в частности, цельноклеточных биосенсорных тест-систем. Цельноклеточные биосенсоры представляют собой бактериальные клетки, содержащие гибридные плазмиды, которые имеют в своём составе два основных генетических элемента: промотор, отвечающий на воздействие токсиканта и ген-репортёр, транскрибируемый с этого промотора. Цельноклеточные биосенсоры в настоящее время широко используются для детекции генотоксических веществ.

В начале 90-х годов при конструкции SOS-биосенсоров в качестве индуцируемых промоторов были использованы промоторы генов *recA*, *umuC*, продукты которых непосредственно участвуют в формировании SOS-ответа и индуцированных мутаций. Геном-репортером при этом оставался ген *lacZ*. Следующий шаг в совершенствовании биосенсоров заключался в замене гена – репортера *lacZ* на более чувствительный, и не требующий лизиса клеток ген-репортер, кодирующий люциферазу (*luxAB*) или зеленый флуоресцирующий белок (*gfp*). Как гены субъединиц люциферазы, так и в целом опероны биолюминесценции (Ptitsyn et al., 1997) активно используются в качестве генов-

«репортеров» при изучении механизмов экспрессии генов и рекомбинации в клетках микроорганизмов.

Одна из биолюминесцентных систем была разработана на основе теста Эймса. Лух-гены были интродуцированы в штамм *Salmonella typhimurium* TA98. Эти бактерии подвергались действию химикатов в течение 48 часов. После экспозиции биомасса ревертантов оценивалась путем измерения биолюминесценции (Cote et al., 1995).

Для быстрой детекции генотоксинов окружающей среды был создан SOS-lux тест. Он основан на приеме «сигналов» SOS-системой, служащей рецептором, чувствительным к повреждению ДНК, и детекции эффекта за счет биолюминесцентной системы, дающей оптический сигнал. Лух-оперон морской фотобактерии (*Photobacterium leiognathi*), содержащий всю информацию для синтеза бактериальной люциферазы и ее субстрата, был клонирован под контроль SOS-промотора и внедрен на плазмиде в *E. coli*. Полученный рекомбинантный штамм позволяет проводить оценку уровня SOS-ответа клеток путем измерения уровня их биолюминесценции (Ptitsyn et al., 1997).

В Vitotox-тесте для SOS-индукции было сконструировано 4 варианта генных слияний под контролем *recN* промотора *Escherichia coli*. *RecN* был клонирован в не имеющий промотора *luxCDABE* оперон *Vibrio fischeri* pmol 877 таким образом, что лух-гены становились под его контроль. Индуцибельность SOS-ответа данной конструкции промотора тестировалась как в *E. coli*, так и в *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 и TA104. Все штаммы показали высокую чувствительность (Van der Lelie et al., 1997).

Mutatox-тест использует «темные» мутанты люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri*. Он определяет способность различных генотоксичных агентов посредством мутаций восстанавливать способность бактериальных клеток к свечению. Тест обеспечивает быстрый скрининг большого ряда чистых и комплексных соединений (Sun, Stahr, 1993).

Таким образом, бактерии, содержащие гибридные плазмиды с генами *luxCDABE*, называются лух-биосенсорами. Основные преимущества лух-биосенсоров - высокая чувствительность, линейная зависимость величины эффекта от концентрации фермента в очень широких пределах, простота и быстрота измерения.

Широко используется в качестве гена-репортера также ген *gfp*, кодирующий зеленый флуоресцирующий белок. Сконструированные на основе этого гена биосенсоры также, как и лух-биосенсоры, не требуют введения в клетку химических веществ в качестве субстратов или кофакторов. Индукция флуоресценции суспензии клеток биосенсора проводится с помощью освещения клеток более коротковолновым излучением. Так как ген *gfp* имеет эукариотическое происхождение, то подобные биосенсоры преимущественно и с большим успехом используются при анализе молекулярных механизмов в клетках высших организмов, а также в прикладных целях в медицине. Что же касается биосенсоров на основе бактерий, то гены-репортеры типа *gfp* используются значительно реже. Причин тому две: пониженная чувствительность и резко замедленная реакция ответа в связи с необходимостью пост-трансляционной модификации полипептида. Например, если для лух - биосенсора, как правило, время ответа (т.е. минимальное время индукции сигнала после добавления токсического агента) – минуты, то для биосенсора с геном-репортером *gfp* время отклика составляет более 3-4 часов (Kohlmeier et al., 2007).

Одним из самых больших недостатков всех бактериальных тест-систем является отсутствие системы метаболической биодеградации ксенобиотиков, свойственной позвоночным животным. Катализируют эти процессы различные классы ферментов, но наибольшее значение имеют оксидоредуктазы (Фонштейн и др., 1977) и особенно монооксигеназы, содержащие цитохром P-450 и его изоформы. Поэтому обязательным этапом скрининга с использованием бактериальных тестов является метаболическая активация исследуемого образца.

Таким образом, современные подходы требуют от тест-систем большей

эффективности, меньше экономических расходов и затрат времени (Кхатаб, 2012).

Согласно основным теоретическим и экспериментально обоснованным требованиям тест-система должна:

- 1) выявлять все типы генетических повреждений, т. е. геномные, хромосомные и генные мутации;
- 2) быть чувствительной к малым дозам мутагенов;
- 3) быть достаточно экспрессивной, дешевой и давать устойчивые, воспроизводимые результаты;
- 4) обнаруживать такие соединения, которые, будучи безвредными сами по себе, при попадании в организм становятся мутагенами за счет внутриклеточной метаболической активации;
- 5) позволять экстраполировать получаемые результаты на «человека» в смысле количественной оценки генетического риска.

Единственная универсальная тест-система, которая отвечала бы всем этим требованиям, вряд ли может быть создана. Анализ основных результатов исследований по созданию систем, используемых для тестирования генотоксичности, показал необходимость использования батарей тестов и создание новых тест-систем, с помощью которых удастся надежно установить мутагенные эффекты многих химических соединений (Кхатаб, 2012).

Список использованной литературы

1. Абилов С. К., Глазер В. М., Асланян М. М. Основы мутагенеза и генотоксикологии. Лекции: учебное пособие. — М. ; СПб. : Нестор-История, 2012. — 148 с.
2. Барцевич В.В., Амиртаев К.Г., Красавин Е.А., Бонев М.Н. Модифицирующее влияние глицерина и цистеамина на индукцию профага λ у клеток *E.coli* при γ -облучении: Препринт ОИЯИ, Дубна, 1989. – 31 с.
3. Долгова А. РЫНОК СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В МИРЕ И РОССИИ: ТЕНДЕНЦИИ, ДИНАМИКА, ПРОГНОЗЫ. П/ред. доктора с.-х. наук А.П. Шутко Ставрополь: Изд-во Ставропольского государственного аграрного университета, 2015. - 14 с.
4. Дубинин Н. П. Мутагены среды и наследственность человека // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. — М.: Наука, 1977. — С. 3–20.
5. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). – М.: Медицина, 1998. – 328 с.
6. Кирсо У.Э., Стом Д.И., Белых Л.И., Ирха Н.И. Превращение канцерогенных и токсических веществ в гидросфере. – Таллин: Валгус, 1988. – 271 с.
7. Куринный А. И. К проблеме предупреждения генетических последствий применения пестицидов: реальность и необходимость / Куринный А. И. // Цитология и генетика. — 1983. — Вып. 17. — № 6. — С. 16–21.
8. Куценко С.А. Основы токсикологии. – С-Пб., 2002. – 420 с. ([Электронный ресурс] / Куценко С.А. 2002. URL <http://www.medline.ru/monograf/toxicology/lit.shtml> (дата обращения 17.07.2012).
9. Кхатаб З.С. Современные методы тестирования генотоксичности / Кхатаб З.С. // Валеология. – 2012. – Т. 2. – С. 58-64.
10. Порошенко Г. Г., Абилов С. К. Антропогенные мутагены и природные антимутагены // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Общая генетика – 1988. – Т.12. – 208 с.
11. Пташне М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг лямбда – М.: Мир, 1989. - 160 с.
12. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. // Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – № 51. – Женева: ВОЗ, 1989. – 112 с.
13. Саратовских Е.А., Глазер В.М., Костромина Н.Ю., Котелевцев С.В.

- ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ПЕСТИЦИДОВ В ТЕСТЕ ЭЙМСА И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ОБРАЗОВАНИЮ КОМПЛЕКСОВ С ДНК// Экологическая генетика. - 2007. – Т. V. - №3. – С. 46 – 54.
14. Тарасов В. А., Асланян М. М., Абилов С. К. Принципы формализованной количественной оценки генетической опасности химических соединений для человека // Генетика. – 1999. – Т. 35. – № 11. – С. 1585 – 1599.
 15. Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. – М., 1982. – 226 с.
 16. Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полухина Т.Н., Абилов С.К., Шапиро А.А. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella* (метод. указания). – М., 1977. – 52 с.
 17. Чистяков В.А. Окислительный стресс как один из основных механизмов токсического действия тяжелых металлов // Известия вузов. Естественные науки. Северо-Кавказский регион. Приложение. – 2003. – Т. 7. – С. 65–69.
 18. Шигаева М.Х., Ахматуллина Н.Б., Абилов С.К. Мутагены и комутагены окружающей среды. – Алматы: Гылым, 1994. – С 9–11, 206–211.
 19. Achten C., Hofmann T. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – a hardly recognized source of environmental contamination // *Sci. Total. Environ.* – 2009. – V. 407. – № 8. – P.2461–2473.
 20. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian*–microsome mutagenicity test // *Mutat. Res.* – 1975. – V. 31. – № 6. – P. 347–364.
 21. Anderson S., Sadinski W., Shugart L., Brussard P., Depledge M., Ford T., Hose J., Stegeman J., Suk W., Wirgin I., Wogan G. Genetic and molecular toxicology: a research framework // *Environ. Health Perspect.* – 1994. – V. 102. – Suppl. 12. – P. 3–8.
 22. Angelosanto F.A. Tissues other than bone marrow that can be used for cytogenetic analyses // *Environ. Mol. Mutagen.* – 1995. – V. 25. – № 4. – P.338–343.
 23. Biran A., Yagur–Kroll S., Pedahzur R., Buchinger S., Reifferscheid G., Ben–Yoav H., Shacham–Diamand Y., Belkin S. Bacterial genotoxicity bioreporters // *Microb. Biotechnol.* – 2010. – V. 3. – № 4. – P.412–427.
 24. Bosco E., Frenzilli G., Pezzica S., Bardini F., Barale R. In vitro Comet Assay validation by testing chemicals in peripheral human leucocytes // *Assoc. genet. Ital. 42 Conv. Sci., Riccione, 2–5 ott., 1996. Assot. Genet. Ital.* – 1996. – V. 42. – P. 19.
 25. Boverhof D.R., Chamberlain M.P., Elcombe C.R., Gonzalez F.J., Heflich R.H., Hernández L.G., Jacobs A.C., Jacobson–Kram D., Luijten M., Maggi A., Manjanatha M.G., Benthem J., Gollapudi B.B. Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook // *Toxicol. Sci.* – 2011. – V. 121. – № 2. – P. 207–233.
 26. Clapp R.W., Jacobs M.M., Loechler E.L. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005–2007 // *Rev. Environ. Health.* – 2008. – V. 23. – N.1. – P.1–37.
 27. Cleaver J.K. Methods for studying excision repair of eucariotic DNA damaged by physical and chemical mutagens // Kilbey B.J., Legator M., Nicholson W., Ramel C. (Eds.). *Handbook of mutagenecity test procedures.* – Amsterdam, NY, Oxford : Elsevier Science Publisher, 1984. – P. 33–69.
 28. Conte C., Maestri E., Regina G., Puglisi P.P., Sicuri G. , Puglisi P., Marmiroli N. Monitoring the genetic effects of environmental pollutants PCR based method // *Assoc. genet. Ital. 42 Conv. sci., Riccione, 2–5 ott., 1996. Atti / Assoc. genet. Ital.* – 1996. – V. 42. – P. 51–52.
 29. Cote C., Blaise C., Delisle C.E., Meighen E.A., Hansen P.D. A miniaturized Ames test employing bioluminescent strains of *Salmonella typhimurium* // *Mutat. Res.* – 1995. – V. 345. – № 3–4. – P.137–146.
 30. Dean S.W. Novel approaches to mutagenecity testing // *Annu. Congr. Brit. Toxicol. Soc.,*

- Warwick, 24–26 Varch, 1997. *Hum. And Exp. Toxicol.* – 1997. – V. 16. – № 7. – P. 392.
31. Diehl M., Fort F. Spiral Salmonella assay: validation against the standard pour–plate assay // *Environ. Mol. Mutagen.* – 1996. – V. 27. – № 3. – P. 227–236.
 32. Friede B., Muller J. Mutaqenitats tests mit Drosophila. Methodik und Ergebnisse // Tagungsfer Acad. Landwirtschafts wiss DDR, 1992. – 282 p.
 33. Generoso W.M., Bishop J.B., Goslee D.G. et al. Heritable translocation test in mice // *Mutat. Res.* – 1980. – V. 76. – P. 191–215.
 34. Gordon J.W., Harold G., Leila Y. Transgenic animal methodologies and their applications // *Hum. Cell.* – 1993. – V. 6. – № 3. – P. 161–169.
 35. Hong J, Ames B.N. Localized mutagenesis of any specific small region of the bacterial chromosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1971. – V. 68. – № 12. – P. 3158–3162.
 36. Kasai H. What causes human cancer? Approaches from the chemistry of DNA damage// *Genes Environ.* – 2016. - Jul 1;38:19. doi: 10.1186/s41021-016-0046-8. eCollection 2016.
 37. Kensler T.W., Roebuck B.D., Wogan G.N., Groopman J.D. Aflatoxin: a 50–year odyssey of mechanistic and translational toxicology // *Toxicol. Sci.* – 2011. – V.120. – Suppl. 1. – P. S28–48.
 38. Kier L.D., Kirkland D.J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations// *Crit Rev Toxicol.* – 2013. - 43(4). – P. 283 - 315. doi: 10.3109/10408444.2013.770820.
 39. Kohlmeier S., Mancuso M., Tecon R., Harms H., van der Meer J.R., Wells M. Bioreporters: gfp versus lux revisited and single–cell response // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V. 22. – № 8. – P. 1578–1585.
 40. Koivisto P., Peltonen K. Analytical methods in DNA and protein adduct analysis // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – V. 398. – N. 6. – P. 2563–2572.
 41. Lewis S.E., Barnett L.B., Sadler B.M. et al. ENU mutagenesis in the mouse electroforetic specificisic–locus test, 1. Dose–response relationship of electroforetically–detected mutations arising from mouse spermatogonia treated with ethylnitrosourea // *Mutat. Res.* – 1991. –V. 249. – № 2. – P. 311–315.
 42. Lin JA, Wu CH, Lu CC, Hsia SM, Yen GC Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression// *Mol Nutr Food Res.* – 2016. - 60(8). – P. 1850-64. doi: 10.1002/mnfr.201500759.
 43. Mahadevan B., Snyder R.D., Waters M.D., Benz R.D., Kemper R.A., Tice R.R., Richard A.M. Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2011. – V. 52. – № 5. – P. 339–354.
 44. Matés J.M., Segura J.A., Alonso F.J., Márquez J. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS–mediated mechanisms // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – V.49. – № 9. – P.1328–1341.
 45. Moreau P., Bailone A. and Devoret R. Prophage lambda induction in Escherichia coli K12 envA uvrB: a highly sensitive test for potential carcinogens // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1976. – V. 73. – № 10. – P. 3700–3704.
 46. Poirier M.C. Linking DNA adduct formation and human cancer risk in chemical carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2016 Aug;57(7):499-507. doi: 10.1002/em.22030.
 47. Ptitsyn L.R., Horneck G., Komova O., Kozubec S., Krasavin E.A., Bonev M., Rettberg P. A biosensor for Environmental Genotoxin Screening Based on an SOS lux Assay in Recombinant Escherichia coli Cells // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – № 11. – P. 4377–4384.
 48. Quillardet P., Huisman O., D Ari R. and Hofnung M. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K12 to measure genotoxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1982. – V. 79. – №19. – P. 5971–5975.
 49. Rexroat M.A., Oberly T.J., Bewsey B.J., Garriott M.L. The gradient plate assay: a

- modified Ames assay used as a prescreen for the identification of bacterial mutagens // *Mutat. Res.* – 1995. – V. 341. – № 3. – P. 185–192.
50. Robbens J., Dardenne F., Devriese L., De Coen W., Blust R. *Escherichia coli* as a bioreporter in ecotoxicology// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. - 88(5). – P. 1007 - 1025. doi: 10.1007/s00253-010-2826-6.
 51. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology// *Nat Rev Cancer.* – 2016. - 16(1). – P. 20-33. doi: 10.1038/nrc.2015.2.
 52. Saratovskikh E. A. Synthesis of bidentate complexes of 3,6-dichloropicolinic acid / Saratovskikh E. A. // *Bull. academy sci. USSR. Div. chem. sci.* — 1989. — Vol. 38. — Part 2. — P. 2140–2141.
 53. Saratovskikh E. A. EPR spectroscopic study of metallocomplexes of 3,6-dichloropicolinic acid / Saratovskikh E. A., Orlov V. S., Krinichnyi V. I. // *Bull. academy sci. USSR. Div. chem. sci.* — 1989. — Vol. 38. — Part 1. — P. 2274–2277.
 54. Saratovskikh E. A. Biochemical and Photochemical Degradation of the Herbicide Lontrel /Saratovskikh E. A., Kozlova N. B., Papin V. G., Shtamm E. V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2006. — Vol. 42, N 1. — P. 38–44.
 55. Saratovskikh E. A. Products of photolysis of 3,6-dichloropicolinic acid (the herbicide Lontrel) in aqueous solutions /Saratovskikh E. A., Poliakova O. V., Roschupkina O. S., Lebedev A. T. // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2007. — Vol. 43, N 2. — P. 227–231.
 56. Shaposhnikov S., Frengen E., Collins A.R. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization – a review // *Mutagenesis.* – 2009. –V. 24. – № 5. – P.383–389.
 57. Spink B. C., Cao J. Q., Sutler T. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells // *Carcinogenesis.* – 1998. – V. 19. – P. 291–298.
 58. Sun T.S., Stahr H.M. Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test // *J. AOAC Int.* – 1993. – Jul–Aug. – V. 76. – № 4. – P. 893–898.
 59. Takigami H., Matsui S., Matsuda T., Shimizu Y. The *Bacillus subtilis* rec–assay: a powerful tool for the detection of genotoxic substances in the water environment. Prospect for assessing potential impact of pollutants from stabilized wastes // *Waste Manag.* – 2002. – V. 22. – № 2. – P. 209–213.
 60. Valdíglesias V., Pásaro E., Méndez J., Laffon B. Assays to determine DNA repair ability // *J. Toxicol. Environ. Health A.* – 2011. – V. 74. – N. 15–16. – P. 1094–1109.
 61. Walker G.C. Mutagenesis and inducible responses to DNA damage in *Escherichia coli* // *Microbiol. Rev.* 1984. – V. 48. – № 1. – P. 60–93.
 62. Williams G.M. Methods for evaluating chemical genotoxicity // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1989. – V. 29. – № 1. – P. 189–211.