

УДК 616-098+616-073.56

ВАРИАНТЫ ПРИМЕНЕНИЯ СТАНДАРТНОГО ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Дмитриев А. В.

Санкт-Петербургская государственная медицинская академия
им. И.И. Мечникова, Россия

Ключевые слова: биотестирование, культура клеток, исследования *in vitro*

Введение

Для выполнения оценки характера воздействия на живой организм макро- и микрообъектов, которые могут обладать токсическими свойствами, за последние более чем 10 лет стали достаточно широко использоваться адекватные методы исследования *in vitro*. К таким методам относятся и технологии, основанные на использовании в качестве биологических моделей различных культур клеток.

В работах, посвященных данной теме, достаточно подробно освещены вопросы культивирования, хранения, условия режима и работы с клеточными тест-объектами. В то же время регистрация реакции на исследуемое воздействие в существующих методических указаниях предусматривается либо визуальным методом с большим числом повторений, либо посредством применения специализированных и дорогостоящих измерительных приборов.

Следует отметить, что визуальный способ оценки является сугубо субъективным методом, позволяющим всегда поставить под сомнение точность выполнения подсчета. При выполнении же исследований минимальных нагрузок (в экологических оценках) требуются объективные, высокочувствительные и надежные методы оценки изменения, на которые не может оказать влияние

субъективное состояние исследователя. Однако широкое применение объективных технологий оценки состояния тест-объекта в лабораториях напрямую зависит от доступности измерительных приборов. Для решения этого вопроса необходимы технологии по работе с тест-объектами, в которых используются стандартные приборы и вспомогательное оборудование, входящее в перечень оснащения лабораторий даже среднего уровня входят (фотоколориметры, рН-метры, аналитические весы и т.д.).

Учитывая принципы токсикологической экспертизы и специфику оснащения лабораторий, целесообразным для решения такой задачи представляется использование одноклеточных тест-объектов, ввиду того, что клетка является основой всего живого и несет в себе основные функциональные структуры, которые формируют ответную реакцию на изменение окружающей среды. Кроме этого, жизненный цикл одноклеточных организмов значительно короче, чем у макроорганизма. Это в свою очередь позволяет за незначительный промежуток времени проследить реакцию организма на испытываемое воздействие на всех стадиях его существования, от молодых форм до периода увядания популяции.

Материалы и методы

В связи с этим, наиболее рациональным представляется использо-

вание в качестве тест-объекта достаточно хорошо изученного одноклеточного организма – инфузории *Tetrahimena periformis* (Tr). Данный тест-объект уже длительное время используется в токсикологической практике и при выполнении специализированных исследований по оценке воздействия полимерных материалов. В связи с этим методы его культивирования уже достаточно хорошо стандартизированы. Для повышения достоверности и надежности получаемых результатов при использовании Tr необходима модернизация технологий ее применения и методов регистрации результатов наблюдаемого эффекта воздействия с применением современных измерительных приборов, широко используемых в лабораторной практике.

Регистрацию ответной реакции Tr на дозированное воздействие можно осуществить с использованием методов прямого определения количества клеток в пробе и методов косвенной оценки состояния ее жизнедеятельности.

В первом варианте наиболее рациональным и доступным является использование технологии, позволяющей определить непосредственно вес биомассы. Для этого могут быть использованы технологические приемы термостатирования проб с культурой со стандартным оборудованием и последующего взвешивания на обычных лабораторных аналитических весах, т.к. масса 3-х дневной культуры более чем на порядок превышает нижнюю границу чувствительности данного вспомогательного оборудования. При использовании такой технологии становится возможным использовать культуру Tr для определения DL_{50} для различных химических соединений. Прямая количественная оценка проводится путем определения веса популяции Tr, выросшей в

определенных экспериментальных условиях, относительно контроля.

Учитывая, что объективность получаемых результатов с использованием тест-объекта должна быть подтверждена несколькими параллельно выполненными методами, целесообразно применять оценку косвенных показателей состояния культуры в экспериментальных и контрольных условиях. В этом случае наиболее простым и доступным методом контроля представляется регистрация изменений, происходящих в результате жизнедеятельности культуры Tr, а именно оптических свойств проб, pH среды и интенсивности поглощения кислорода. Обоснованность регистрации данных показателей основана на том, что в процессе своей жизнедеятельности Tr изменяет свойства среды, в которой она культивируется.

Изменение оптической плотности среды с культурой Tr начинает изменяться после 1-х суток экспозиции, достигает достоверного уровня регистрации различий между опытом и контролем на 3-и сутки, замедляется к 7-м суткам и продолжает замедляться до 14-ти суток. Весь процесс достаточно хорошо регистрируется на стандартном колориметре или спектрофотометре методом нефелометрии и в ультрафиолетовом спектре.

Одновременно в результате жизнедеятельности Tr происходит изменение pH питательной среды, в которой она культивируется. Наибольшее изменение pH имеет место на 3-ти сутки экспозиции и меняется с 6,7 до 7,3 по сравнению с контролем. Сам по себе диапазон для оценки результатов на pH-метре весьма мал. Однако такое различие в значениях pH делает возможным применение стандартных индикаторов и позволяет увеличить чувствительность метода регистрации по оптической плотнос-

ти. В этом диапазоне изменений рН пригоден для использования индикатор Аурин с концентрацией 0,1%. Использование индикаторов позволяет увеличить диапазон измерений практически на всю шкалу фотокolorиметра при использовании светофильтра 540 нм. Причем достоверное различие с контролем начинает регистрироваться уже через 18 часов экспозиции. Особые преимущества такая технология дает при биотестировании растворов с высокой мутностью, которая может быть удалена посредством фильтрации и центрифугирования, которые не сказываются на рН раствора, изменившееся в результате жизнедеятельности Тр.

Результаты и их обсуждение

В результате жизнедеятельности Тр происходит и интенсивное потребление кислорода, изменение концентрации которого может быть зарегистрировано как посредством современных портативных лабораторных приборов по определению концентраций кислорода, так и с использованием классической технологии по определению БПК. В то же время такой вариант регистрации является наиболее чувствительным по сравнению с другими, т.к. достоверные различия регистрируются уже через 6 часов экспозиции при соотношении среда-культура 50:2. Одним из преимуществ данной технологии является не только возможность быстрого получения предварительных результатов биотестирования. В этом случае исключается необходимость стерилизации исследуемых растворов, т.к. сопутствующая микрофлора не успевает развиваться за это время и при температурном режиме оптимальном для культивирования Тр настолько, чтобы влиять на оптическую плотность раствора. Кроме этого методика оптимально сочетается с рН-метрией объектов, имеющих высокую

мутность (в колориметрическом варианте).

Таким образом, можно получить разностороннюю объективную информацию о реакции тест-объекта посредством регистрации на широко доступных приборах, которыми располагает практически любая современная лаборатория.

Одновременно, сопоставляя чувствительность и технологию исполнения различных методов, можно выработать концепцию их применения при использовании Тр в качестве биотеста для решения конкретных задач. При этом рассмотренные методы могут с высокой степенью надежности применяться при экологической экспертизе, а часть из них и в токсикологической практике. Возможность использования в том или ином случае определяется скоростью проявления реакции на исследуемое воздействие. Так при определении степени и характера антропогенного воздействия будет иметь место медленное развитие ответной реакции биотеста. Ее наиболее яркое проявление будет наблюдаться (в результате минимального воздействия) в период формирования зрелой культуры, т.е. на 3-и, 7-е сутки экспозиции.

При исследовании мутных сред и почвы, когда регистрировать параметры оптической плотности невозможно, наиболее рационально использовать два метода (необязательно параллельно):

- метод с использованием индикатора Аурин
- метод определения веса биомассы.

При этом регистрация ответной реакции возможна на 3-и и на 7-е сутки.

Токсическое же воздействие, ввиду своей массивности, проявляется уже в первые часы и сутки (ос-

трый и подострый характер). Для решения таких задач могут быть применены технологии с регистрацией по потреблению кислорода и индикатору. При этом регистрация эффекта возможна уже начиная с третьего часа от момента начала воздействия и до 18-24 часов (острый опыт). Регистрация токсического эффекта в подостром и хроническом эксперименте (3 – 14 суток) может быть осуществлена на обычных колориметрах (по оптической плотности при прямой регистрации или с применением индикатора). Кроме этого сочетание регистрации результатов исследований по оптической плотности и по весу биомассы дает возможность определять DL_{50} исследуемых веществ.

Все эти особенности клеточных тест-объектов делают возможным применение их при решении вопросов по оценке эффекта от воздействия наноматериалов непосредственно на клеточном уровне и интерпретации их воздействия на биологический организм в целом.

Вывод

Таким образом, предложенные методики исследования позволяют в значительной степени расширить диапазон применения биотестов в прикладной токсикологической практике по оценке безопасности продукции и объектов среды обитания человека., а также сделать результаты исследований более объективными.

Резюме

ВАРИАНТИ ЗАСТОСУВАННЯ СТАНДАРНОГО ЛАБОРАТОРНОГО УСТАТКУВАННЯ В ТЕХНОЛОГІЇ БІОТЕСТУВАННЯ

Дмитрієв А.В.

Автор ділиться практичним досвідом розширення можливостей культуральних тест-об'єктів на прикладі інфузорії *Tetrahimena periformis* в токсикологічних дослідженнях, санітарно-гігієнічній і екологічній експертизі.

Показано, що можна отримати додаткову різносторонню об'єктивну інформацію за допомогою реєстрації реакції тест-об'єкта з використанням широких доступних приладів, які має в своєму розпорядженні практично будь-яка сучасна лабораторія.

Summary

VARIANTS OF THE STANDARD LABWARE APPLICATION IN BIOTESTING TECHNOLOGY

Dmitriev A.V.

The author shares practical experience of expansion of possibilities of cultural test objects on an example of infusorian *Tetrahimena periformis* in toxicological researches, sanitary-and-hygienic and ecological examination.

It is shown, that it is possible to receive the additional versatile objective information by means of registration of test object reaction with using of widely accessible devices which any modern laboratory has practically.

*Впервые поступила в редакцию 22.07.2009 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*