

ПРИМЕНЕНИЕ КРАТКОСРОЧНЫХ ТЕСТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ БУТЫЛИРОВАННОЙ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ (обзор литературы и собственные исследования)

И.В. Болпина, кандидат биол. наук, Е.Л. Костик, М.Р. Верголяс, кандидат биол. наук*

Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И. Медведя, г. Киев

*Институт коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского, г. Киев

Резюме. Проведено аналіз мутагенних властивостей бутылірованої питної води з використанням різних тест-об'єктів. В результаті показана ефективність застосування комплексних досліджень для більш точної оцінки якості води.
Ключові слова: токсичність, мутагенна активність, частота аберацій, кількість ревертантних колоній

Резюме. Проведен анализ мутагенных свойств бутылированной питьевой воды с использованием различных тест-объектов. В результате показана эффективность применения комплексных исследований для более точной оценки качества воды.

Ключевые слова: токсичность, мутагенная активность, частота аберраций, количество ревертантных колоний

Summary. The analysis of mutagens properties of butylated drinking-water is conducted with the use of different test-objects. As a result efficiency of application of complex researches is shown for more exact estimation of quality of water.
Key words: toxicity, mutagens activity, frequency of aberrations, amount of revertants colonies

Качество воды в последнее время приобретает все большее значение для здоровья человека, ведь известно, что около 80,0 % заболеваний вызывает именно некачественная вода. Выборочная оценка суммарной мутагенной активности водосточников показала, что выше водозаборов практически 100% воды загрязнены мутагенно-активными веществами, оказывающими среднюю и высокую мутагенную активность, умеренно загрязнены (42%) – в местах водозаборов, т.е. уровень мутагенной активности положительных проб там несколько ниже. Мутагенная активность отмечается и в ряде подземных водосточников (до 10%). Есть интересные данные, свидетельствующие о том, что общепринятое хлорирование воды приводит к образованию целого ряда соединений, обладающих неблагоприятными отдаленными эффектами, такими как канцерогенный и мутагенный [1]

Исследования мутагенной активности системы водоснабжения в Украине проводились в основном с помощью двух тестов – теста Эймса (микрорганизмы) и теста по учету аберраций хромосом в проростках лука *Allium scera* и *Allium fistulosum* L.

В России для исследования донных отложений из рек и озер Москвы использовались тесты на ин-

дукцию аберраций в костном мозге мышей *in vivo*, а мутагенную активность сточных вод Байкальско-го целлюлозно-бумажного комбината после 5-этапной очистки и этапа хлорирования определяли с помощью теста Эймса (табл. 1).

В отличие от химико-аналитического контроля, биологический мониторинг позволяет корректно оценивать и прогнозировать отклонения в состоянии биологических систем от нормы реакции, вызванные воздействием антропогенных/техногенных факторов. Безусловно, биологический мониторинг не позволяет связать регистрируемый эффект с определенным действующим фактором, однако для представителей живой природы он дает интегральную оценку последствий воздействия комплекса веществ, загрязняющих окружающую среду. Таким образом, выдвигается на первый план необходимость поиска чувствительных тест-объектов и тест-систем, которые адекватно отражали бы уровень техногенного воздействия. При этом требуется разрабатывать новые и совершенствовать старые подходы к оценке и прогнозированию состояния окружающей среды на основе данных биоиндикации [8].

Исследования 30 марок фасованной бутылиро-

Таблица 1

Результаты исследований мутагенной активности разных типов вод в Украине и в России

Область	Город	Тест-объект	Результат	Ссылка
<i>Украина, система водоснабжения</i>				
Ивано-Франковская	Ивано-Франковск	Allium Сера	+/-	[2]
	Коломыя		+/-	
	Снятинский р-н		+	
	Верховинский р-н		-	
Закарпатье	Мукачево	Эймс	-	[3]
	Чоп		-	
Львовская	Львов		+/-	
	Брюховичи		+	
	Мостыская		+/-	
Киев	Смешанное водоснабжение		Allium fistulosum L	
	Биологический факультет	+		[5]
	Московская площадь	+		
	Теремки (система горячей воды)	+		
<i>Россия</i>				
Москва	р. Яуза	Донные отложения	++	[6]
	Городня		++	
	Крылатское		-	
Сточные воды Байкальского целлюлозно-бумажного комбината, после очистки		5-этапной	-	[7]
		Хлорированием	+++	

"-" – отсутствие эффекта;

"+/-" – недостоверное превышение;

"+" – достоверное превышение;

"++" – достоверное превышение в 2 раза;

"+++" – достоверное превышение в 3 и больше раз

ванной воды в Украине проводились в Институте коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского, Киев, НАН Украины на следующих биотестах: цериодафии, гидре, рыбе и луке. Исследуемые пробы воды были разделены на три категории - безопасная (3 пробы), небезопасная (21 проба), опасная (7 проб) [9].

Однако, оценка мутагенной активности бутылированной воды не проводилась, поэтому целью нашей работы было изучение мутагенности 26 фасованных бутылированных вод в двух тестах – тесте Эймса и тесте на индукцию аббераций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* без и с метаболической активацией.

Материалы и методы

Сущность теста Эймса заключается в регистрации способности исследуемого вещества и/или его метаболитов индуцировать реверс-мутации от

ауксотрофности к прототрофности по гистидину на индикаторных штаммах *S. typhimurium*, которые несут *his*-мутации и не способны синтезировать гистидин. С целью образования возможных метаболитов исследуемое вещество подвергают процессу биотрансформации с помощью ферментов микросомального окисления, содержащихся в постмитохондриальном супернатанте гомогената печени крыс – фракции S-9. Для этого бактерии *S. typhimurium* инкубируют вместе с исследуемым веществом, а также микросомальной активирующей смесью – S-9 mix (фракция S-9 + Ко-факторы: НАДФ и глюкозо-6-фосфат).

Наличие мутагенного эффекта учитывали по индукции обратных мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину. С целью выявления разных типов мутаций в эксперименте использовали два индикаторных штамма *S. typhimurium*: TA-98 (*his* D 3052, *rfa*, Δ *uvr* B, + R: *pkM* 101), реги-

стрирующий мутации по типу смещения рамки считывания, TA-100 (his G 46, rfa, Δuvr B, + R: pKM 101), регистрирующий мутации по типу замены пар оснований, которые были получены из Лаборатории Эймса (Bruce Ames Laboratory, Department of Molecular and Cell Biology, University of California at Berkeley, 401 Barker Hall, 94720-0001) в 1993 году.

Мутагенную активность питьевой бутылированной воды исследовали методом стандартного чашечного теста, предложенного D.M. Maron и B.N. Ames [10]. По результатам подсчета количества ревертантных колоний на каждой из трех (пяти) тестерных чашек устанавливали среднее количество ревертантов.

Опыт практической работы проф. А.М Дугана [11], показывает, что более рациональным есть подход, который предусматривает, что независимо от колебаний дисперсии опыта, мутагенный эффект в тесте Эймса считается установленным при превышении количества колоний-ревертантов в опытных вариантах над контрольными штаммами для TA 98 - в 2 раза, для TA 100 - в 1,8 раза. Слабый, средний и сильный мутагенные эффекты оцениваются согласно рекомендациям Л.М. Фонштейна [12].

Основу культивирования лимфоцитов периферической крови (ЛПК) и приготовления препаратов хромосом составлял стандартный полумикрометод [13], но с модификациями, принятыми в лаборатории мутагенеза [14]. Отбор метафазных пластинок для цитогенетического анализа, классификация и учет аберраций хромосом были общепринятыми. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента [15].

Учитывали: частоту аберраций хромосом, количество анеуплоидных клеток (возможный канцерогенный риск), количество мультиабберрантных клеток (возможные нарушения системы репарации ДНК).

Проведено ранжирование вод в двух использованных тестах (табл. 2).

С учетом ранжирования сделана сравнительная оценка фасованных бутылированных вод с окончательными результатами мутагенности по двум тестам (табл. 3).

К сожалению, использование теста Эймса, для исследования всех вод невозможно: в некоторых пробах были обнаружены микроорганизмы, из-за которых нельзя продолжать дальнейшее исследование. А именно: Нумана, Аква Ареал, Сенежская, SPA, Новотерская горная, Доктор (Росинка), Со-

Таблица 2

Категории ранжирования фасованных бутылированных вод в использованных тестах

Категория/ подкатегория	Цитогенетические показатели в культуре ЛПК					Эймс	
	Токсичность	Частота клеток, %		МАК, кол-во	Бактериотоксичность	Мутагенность	
		С аберрациями	Анеуплоидных				
Неопасные	0	Неопасные	0 – 3,0	До 12,0	0		Нет превышения
Небезопасные	1	Нет или п/т без м/а	Недостовверное превышение без или с м/а		до 2	Нет	С/м на 1 штамме
	2	П/т или токс. эффект при нативном добавлении без и/или с м/а					С/м на 2 штаммах
Условно опасные	3	Есть не во всех разведениях без м/а	Достовверное превышение без или с м/а		3 и больше	Есть	Сред/м на 1 штамме
	4	Есть не во всех разведениях без и с м/а					Нет эффекта или с/м на 1 штамме
Опасные	5	Токсичность во всех разведениях без и с м/а					Сред/м на 2 штаммах

Принятые сокращения:

Культура ЛПК – культура лимфоцитов периферической крови человека

Токс. – токсический эффект

п/т – полутоксический эффект

МАК – мультиабберрантные клетки

без и с м/а – без и с метаболической активацией (варианты эксперимента).

с/м – слабый мутагенный эффект

сред/м – средний мутагенный эффект

Таблица 3

Сравнительная оценка фасованных бутылированных вод с использованием двух тестов: бактерии (Эймс) и культуры ЛПК

Марка	Эймс		Культура ЛПК		Окончательно мутагенность	
	Категория	Число	Категория	Число	Категория	Число
Моршинская	Неопасные	0	Неопасные	0	Неопасные	0
Bonagva	Неопасные	0	Небезопасные	1	Небезопасные	1
Vittel	Неопасные	0	Небезопасные	1	Небезопасные	1
HIPP	Неопасные	0	Небезопасные	2	Небезопасные	1
Bebivita	Неопасные	0	Условно опасные	3	Небезопасные	2
Вода питна	Неопасные	0	Условно опасные	3	Небезопасные	2
Цилюща	Неопасные	0	Условно опасные	4	Небезопасные	2
Ватерхол + Селен	Неопасные	0	Условно опасные	4	Небезопасные	2
Пушкарская живая	Неопасные	0	Условно опасные	4	Небезопасные	2
Пилигрим	Неопасные	0	Условно опасные	4	Небезопасные	2
Знаменивская	Неопасные	0	Условно опасные	4	Небезопасные	2
Contrex	Неопасные	0	Опасные	5	Условно опасные	3
Горная вершина	Небезопасные	1	Условно опасные	5	Условно опасные	3
Ватерхол	Небезопасные	2	Условно опасные	5	Условно опасные	3
София Киевская	Условно опасные	3	Условно опасные	3	Условно опасные	3
Демидовская	Условно опасные	3	Условно опасные	3	Условно опасные	3
Ст. Миргород	Условно опасные	4	Небезопасные	1	Условно опасные	3
Ордана	Условно опасные	4	Небезопасные	2	Условно опасные	3
Сенежская	Условно опасные	3	Условно опасные	4	Условно опасные	4
Аква Ареал	Условно опасные	3	Условно опасные	4	Условно опасные	4
SPA	Условно опасные	3	Условно опасные	4	Условно опасные	4
Новотерская горная	Условно опасные	3	Условно опасные	4	Условно опасные	4
Доктор (Росинка)	Условно опасные	3	Опасные	5	Условно опасные	4
Humana	Условно опасные	3	Опасные	5	Условно опасные	4
Калипсо	Условно опасные	4	Опасные	5	Опасные	5
Срибна криниця	Опасные	5	Условно опасные	4	Опасные	5

фия Киевская и Демидовская. Поэтому эти воды отнесены к категории "условно опасные 3".

В некоторых водах (Ордана, старый Миргород, Калипсо) обнаружен слабый мутагенный эффект на обоих тестах – эти воды отнесены к категории "условно опасные 4".

Вода "Срибна криниця" отнесена к категории "опасные 5" из-за мутагенного эффекта средней силы на обоих штаммах.

В исследованиях на культуре лимфоцитов периферической крови картина несколько иная. К неопасным отнесена только одна вода – Моршинская.

К "небезопасным 1" отнесены следующие воды:
– у марки воды "Bonagva" обнаружен токсический эффект в варианте эксперимента без метаболической активации;
– у воды "Vittel" - повышенное содержание количества анеуплоидных клеток;

– у воды "Старый Миргород" – полутоксический эффект в варианте эксперимента без метаболической активации и повышенное содержание количества анеуплоидных клеток.

К "небезопасным 2" отнесены воды HIPP и "Ордана". Они характеризовались полутоксическим эффектом в варианте эксперимента без метаболической активации, токсическим эффектом в варианте эксперимента с метаболической активацией и повышенным содержанием количества анеуплоидных клеток.

Категорию "опасные 5" составляют воды "Доктор (Росинка)", Humana, Калипсо, Contrex из-за токсического эффекта в трех разведениях (последнее – до 50 раз).

Остальные (16 марок) заняли промежуточные варианты – условно опасные 3 или 4 согласно различным цитогенетическим показателям (увеличе-

ние частоты aberrаций хромосом, количества анеуплоидных клеток и др.).

Итак, из данных таблицы видно, что к категории неопасных относится только одна вода – "Моршинская", что не противоречит данным В.В. Гончарука [9], а вот "Бевивита" и "Цилюща" из категории безопасных перешли в разряд "небезопасных 2". Подтвержден статус следующих вод: "Bonagva", "Vittel" – "небезопасные 1". Изменили свои статусы следующие марки воды: "Ордана", "Старый Миргород", "София Киевская" из небезопасных они перешли в разряд "условно опасные 3".

Выводы. Комплексные исследования действительно показывают весь спектр мутагенной активности исследуемых объектов. Безусловно, двух тестов для подобных исследований мало, тем бо-

лее, что тест Эймса, являясь скрининговым тестом, отвечает на вопрос – мутаген/немутаген. Но, работая в паре с другим тестом (в данном случае культурой лимфоцитов периферической крови), получается более полная характеристика исследуемых марок фасованных бутылированных вод.

Перспектива дальнейших исследований. Как уже говорилось выше, только комплексные подходы могут дать более точный ответ на поставленную задачу – оценку качества воды. Целесообразно начинать с биотестов, (которые используются в качестве скрининговых тестов), далее – продолжить работу в тесте Эймса, а затем (по необходимости) исследовать воду в культуре лимфоцитов периферической крови или на костном мозге мышей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Рахманин Ю.А. Экология человека: современные проблемы и пути их решения / Ю.А. Рахманин // Науки о жизни и технологии жизнеобеспечения "Устойчивое развитие: Наша практика. – 2003. – № 3. – С. 2–9.
2. Козовий Р.В. Комплексне оцінювання генетичних наслідків забруднення навколишнього середовища і шляхи їхнього попередження: автореф. дис. на здобуття наук. ступеню канд. мед. наук: спец. 030015 "Генетика" / Р.В. Козовий. – Івано-Франківськ, 2005. – 20 с.
3. Мутагенність питної води і можливі шляхи її утилізації [А. Фединак, Ю. Козуб, О. Дуган [та ін.]] // Вісник Львів. у-ту. Сер. біол. – 2000. – Вип. 26. – С. 75–83.
4. Дуган А.М. Суммарная мутагенная активность вод из артезианских скважин и смешанного водопровода г. Киева / А.М. Дуган // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб. наук. праць. – Київ, Луганськ. – 1998. – Вип. 9. – С. 18–21.
5. Куцоконь Н.К. Оцінка мутагенних властивостей води з водогінної мережі та водойм м. Києва. / Н.К. Куцоконь, Л.М. Лазаренко, В.Ф. Безруков // [електронний ресурс] Випуск 29. – 1999. Режим доступу до випуску: <http://www.irex.kiev.ua/en>
6. Опыт проведения генетического мониторинга загрязнения окружающей среды и генетического здоровья населения / Ю.А. Ревазова, Ф.И. Ингель, Л.В. Хрипач [и др.] // Вестник РАМН. – 1997. – №2. – С. 18–24.
7. Абилов С.К. Выявление и прогнозирование мутагенной активности химических соединений окружающей среды: автореферат дис. на соискание науч. степени доктора биол. наук.: спец. 030016 "Экология", 030015 "Генетика" / С.К. Абилов. – Москва, 2003. – 50 с.
8. Евсеева Т. Биоиндикация: от методов до методологии защиты окружающей среды / Т. Евсеева, Н. Фролова, Е. Куприянова [электронный ресурс] // <http://ib.komisc.ru/t/ir/vt/>
9. Гончарук В.В. Новая концепция обеспечения населения качественной питьевой водой / В.В. Гончарук // Химия и технология воды. – 2008. – т. 30. – № 3. – С. 239–252.
10. Maron D.M. Revised for the Salmonella mutagenicity test / D.M. Maron, B.N. Ames // Mut. Res. – 1983. – Vol 113. – P. 172–215.
11. Дуган А.М.. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса / А.М. Дуган, В.С. Сурков, С.К. Абилов // Цитология и генетика. – 1990. – Т. 25. – № 6. – С. 41–45.
12. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем. (Методические указания) / Л.М. Фонштейн, С.К. Абилов, Е.В. Бобринев [и др.]: М.ВИНИТИ. – 1985. – 34 с.
13. Hungerford D.A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. / D.A. Hungerford // Stain Techn. – 1965. – V. 40. – P. 333–338.
14. А.с. (Свідоцтво про державну реєстрацію прав автора на твір) Модифікація методу вивчення мутагенної активності речовин (метафазного аналізу аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини) in vitro з метаболічною активацією / Болтіна І.В. № 23794, заяв. 21.12.2007; опубл. 05.03.2008.
15. Атраментова Л.А. Статистические методы в биологии: [Учебник для студентов высших учебных заведений] / Л.А.Атраментова, О.М. Утевская. – Горловка: "Видавництво Ліхтар", 2008. – 247 с.

Статья поступила в редакцию 25.03.2011 г.