

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



О.В. Арнаутков

2010г.

» 12
Регистрационный № 104-1710

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ МАРКЕРОВ ТОКСИЧЕСКОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКОВ НА КЛЕТКИ ПРО- И
ЭУКАРИОТ ДЛЯ ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ОПАСНОСТИ
ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОБЪЕКТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр гигиены»

Авторы: И.А.Застенская, А.М.Войтович, Н.В.Дудчик,
И.И.Ильюкова, Е.К.Власенко

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению «Применение системы маркеров токсического воздействия ксенобиотиков на клетки про- и эукариот для гигиенической оценки опасности загрязнения объектов среды обитания человека» (далее – Инструкция) устанавливает методики оценки токсического действия потенциально опасных химических веществ, их смесей, продуктов, содержащих химические вещества, отходов, природных объектов - сточные воды, донные отложения, образцы почв и др. (далее – объекты исследования) с использованием про- и эукариотических организмов в качестве тест-культур. Настоящая инструкция позволяет применять систему маркеров для оценки токсического действия ксенобиотиков как самостоятельно, так и в сочетании с методами оценки на теплокровных животных, что значительно расширяет объем полученной в ходе экспериментов информации о токсичности химических веществ. Преимуществом применения системы маркеров является соответствие современным требованиям: исключение из эксперимента высокоорганизованных животных, сокращение сроков исследования.

2. Настоящая Инструкция предназначена для научно-практических учреждений, учреждений образования, центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора и других организаций, осуществляющих токсикологические исследования, в т.ч. для целей государственного санитарно-эпидемиологического надзора.

3. Результаты оценки токсического действия ксенобиотиков на клетки про- и эукариот учитывают при определении уровня их возможного прямого или косвенного отрицательного влияния на здоровье человека и прогнозе степени их опасности для населения.

4. Предложенные в Инструкции альтернативные тест-культуры могут быть представлены заинтересованным организациям в «Республиканский научно-практический центр гигиены».

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

5. *Токсичность* – степень проявления вредного действия разнообразных химических соединений и их смесей. Токсичность – один из важных факторов, определяющих качество материалов и изделий, достаточно информативный, существенно дополняющий представление о степени опасности или безопасности материалов и изделий при их использовании, являющийся необходимой составной частью комплексной системы контроля при стандартном анализе.

6. *Маркер токсического действия* – параметр жизнедеятельности тест-организма, на основании изменения которого делается вывод о

токсичности образца. Среди маркеров токсического действия в настоящей инструкции используются кинетические, метаболические и морфологические.

7. *Тест-культура* – про- и эукариотические организмы или культуры клеток, чувствительные к действию токсических веществ и используемые при оценке токсического действия.

8. *Цитотоксическое действие* – свойство исследуемых объектов исследования проявлять повреждающее или летальное действие на про- и эукариотические клетки.

9. *Дегидрогеназы* – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие реакции отщепления водорода от одного субстрата и переносящие его на др. Участвуют в процессах катаболизма всех типов питательных веществ. Коферментами дегидрогеназ, которые являются акцепторами

10. *Цитохром P450* – фермент, относящийся к классу гемсодержащих монооксигеназ, который катализирует расщепление веществ разного типа с участием НАДФН и молекулярного кислорода (O_2) и является важнейшими элементами системы детоксикации ксенобиотиков.

11. *Малоновый диальдегид* – альдегид, образующийся в организме при деградации полиненасыщенных жиров реактивными формами кислорода, служит маркером перекисидирования жиров и оксидативного стресса.

12. *Апоптоз* – генетически программируемая клеточная гибель.

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

13. Оборудование.

	Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и др.)
Анализатор потенциометрический (рН-метр)	ГОСТ 25.7416.0171
Микробиологический анализатор с электрохимическим (импедансным) принципом детекции	
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200г	ГОСТ 24104
Весы лабораторные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1000г	ГОСТ 24104
Весы лабораторные аналитические	
Гомогенизатор для измельчения	
Термостат электрический с диапазоном рабочих температур 28-55 С с погрешностью + 1 С	
Сушильный электрический шкаф	ГОСТ 13474
Термометр лабораторный 0-55°С, цена деления шкалы – 0,5 °С	ГОСТ 215

Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры ($+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	ГОСТ 16317
Морозильная камера бытовая, обеспечивающая замораживание ($-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$)	
Микроскоп световой биологический с увеличением 900-1000	ГОСТ 8284
Автоклав вертикальный	ГОСТ 9586
Баня водяная с терморегулятором	
CO ₂ инкубатор	
Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр лабораторный	
Флуориметр лабораторный	
Лупа с увеличением 5-10	ГОСТ 8309
Дистиллятор	
Бактерицидные лампы	
Стандарт мутности на 5 ед.	
Гигрометр психрометрический тип ВИТ -1	
Ламинарный шкаф для культуры клеток (класс I)	
Ламинарный шкаф (класс II)	
Ультразвуковая баня лабораторная	
Проточный цитофлуориметр	
Ультрацентрифуга лабораторная, обеспечивающая более 100 тыс. g	
13. Материалы.	
Воронки лабораторные	ГОСТ 25336
Пипетки автоматические дозаторы любого типа объемом 0,02-0,5 мл $\pm 1,0\%$	
Пипетки вместимостью 0,5, 1,0 мл	ГОСТ 29227
Стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм	ГОСТ 7148
Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10,50 мл	ГОСТ 25336
Флаконы и банки стеклянные с навинчивающейся крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб вместимостью 10, 50, 100 мл	
Цилиндры вместимостью 25, 50 мл второго класса точности	ГОСТ 1770
Стеклянные предметные	ГОСТ 9284
Стеклянные покровные	ГОСТ 6672
Петля бактериологическая	
Шпатель микробиологический пластиковый	

Пинцеты медицинские	ГОСТ 21241-89
Чашки Петри пластиковые микробиологические, стерильные	ГОСТ 23932-90
Планшеты для культивирования клеток стерильные	
Посуда для культур клеток - стерильные культуральные флаконы, планшеты, пробирки, пипетки и пр.	
Ступка фарфоровая	
Автоматические пипетки переменного объема 500-5000, 1000-10000 мкл; и наконечники к ним	
14. Реактивы.	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Кислота серная	ГОСТ 4204
Кислота соляная	ГОСТ 3118
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328
Спирт этиловый, х.ч.	ТУ 6-091710
Агар микробиологический	ФС 42-188ВС-90
Глюкоза, х.ч.	ГОСТ 6038-79
Калия гидроксид	ГОСТ 9285-78
Мясо-пептонный агар	
Среда Сабуро агаризованная	
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805-76
Манит, х.ч.	ГОСТ 8321-74.
Калий фосфорнокислый двухзамещенный 3- водный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 2493-75
Магний сернокислый семиводный, ч.д.а.	ГОСТ 4523-77
Натрий хлористый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4233-77
Калий сернокислый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4145-74
Кальций углекислый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4530-76
Дрожжевой экстракт	ГОСТ 171-81
Метиленовый синий	
2-тиобарбитуровая кислота	
Ортофосфорная кислота 85%	ГОСТ 6552
ЭДТА	
Tris	
Бутанол	ГОСТ 5208-81
Метанол	
Гексан	
Бихромат калия	ГОСТ 2652-78
1,1,3,3-тетраметоксипропан	

ДМСО
Ацетон
НАДФН
Набор реактивов для определения белка по
Лоури
Набор реактивов для определения цитохрома
Р450
Этоксикумарин
Этоксирезоручин
Бензоксирезорурфин
Иодистый пропиций
Дитиотрейтол
Глицерин
РНК-аза
Формальдегид
Краситель X-gal
Диметилформамид
Лимонная кислота
Ферроцианид калия
Феррицианид калия

15. Тест-культуры

Штамм *Azotobacter sp.* БИМ-74

ГОСТ 2768-84

Рабочая коллекция
«Республиканский
научно-практический
центр гигиены»

Штамм <i>Arthrobacter ureafaciens</i> БИМ В-6	Рабочая коллекция «Республиканский научно-практический центр гигиены»
Штамм <i>Phanaerochaete chrysosporum</i>	Рабочая коллекция «Республиканский научно-практический центр гигиены»
Первичная культура фибробластов	Рабочая коллекция «Республиканский научно-практический центр гигиены»
Печень модельных животных	

16. Допускается использование оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для проведения исследований в соответствии с настоящей Инструкцией. При их использовании следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 4 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

17. К выполнению исследований допускаются лица с квалификацией «техник», «лаборант», «научный сотрудник», «врач-лаборант», изучившие требования безопасности и настоящую Инструкцию по применению.

ГЛАВА 5 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ, РЕАКТИВОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

18. Вся посуда, применяемая для микробиологического анализа, должна быть стерильной.

19. Среда 1 для культивирования *Azotobacter sp.* БИМ-74 (на 1000 мл): глюкоза – 10,0 г, маннит – 10,0 г; калий фосфорнокислый двухзамещенный – 0,2 г; магний сернокислый семиводный – 0,2 г; натрий хлористый – 0,2 г; калий сернокислый – 0,1 г; кальций углекислый – 0,5 г; рН 7,2. Стерилизация автоклавированием 121⁰С в течение 30 мин.

20. Среда Самойленко для культивирования *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6 (на 1000 мл воды): пептон – 10,0 г; дрожжевой экстракт – 5,0 г;

глюкоза – 5,0 г; хлористый натрий – 5,0 г; гидрофосфат натрия – 4 г; дигидрофосфат калия – 1 г; рН 7,2 - 7,4 Стерилизация автоклавированием 121⁰С в течение 30 мин.

21. Приготовление красителя метиленового синего для окрашивания. Готовят раствор из расчета 10г метиленового синего на 100 мл воды. Раствор стоек и может храниться не менее 1 месяца.

22. Приготовление 0,002% красителя метиленового синего для оценки дегидрогеназной активности. Готовят раствор из расчета 0,002 г метиленового синего на 100 мл воды. Раствор стоек и может храниться не менее 1 месяца.

23. Приготовление 0,4% глюкозы для оценки дегидрогеназной активности. Готовят раствор из расчета 0,4 г глюкозы на 100 мл воды.

24. Приготовление буфера состава 5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис -HCl.

24.1 1М Трис рН-7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести рН до 7,5 добавлением HCl и довести объем до 1 л. Раствор простерилизовать;

24.2 0,5 М ЭДТА рН 8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести рН до 8,0 NaOH;

24.3 5 М NaCl. 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл, простерилизовать;

24.4 для приготовления буфера: добавить 5 мл 1 М Трис рН-7,5, 0,1 мл 0,5 М ЭДТА рН-8,0 и 3,3 мл 5 М NaCl и довести до 100 мл дистиллированной водой.

25. Приготовление буфера состава 50 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4.

25.1 1М Трис рН-7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести рН до 7,5 добавлением концентрированной HCl и довести объем до 1 л. Раствор простерилизовать;

25.2 0,5 М ЭДТА рН-8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести рН до 8,0 NaOH;

25.3 5 М NaCl. 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл, простерилизовать

25.4 для приготовления буфера: добавить 5 мл 1 М Трис рН-7,5, 0,2 мл 0,5 М ЭДТА рН-8,0 и 2 мл 5 М NaCl, довести до 100 мл дистиллированной водой и установить рН 7,4.

26. Приготовление физиологического раствора. 8,5 г хлористого натрия растворяют в 1 дм куб. водопроводной воды. Стерилизация автоклавированием 121⁰С в течение 30 мин.

27. Приготовление 2% раствора ортофосфорной кислоты. К 2,6г 75% ортофосфорной кислоты добавить 100 мл дистиллированной воды.

28. Приготовление 0,8% раствора тиобарбитуровой кислоты. К 0,8г тиобарбитуровой кислоты добавить 100 мл дистиллированной воды.

ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

29. Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению тестирования должна обеспечивать подготовку посуды, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемый образец.

30. Тестирование проводят при температуре окружающего воздуха в лаборатории от + 18 °С до 25 °С. Относительная влажность воздуха 80 ± 5 %. Атмосферное давление 84-106 кПа (630-800 мм.рт.ст.). Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

31. При использовании электроприборов частота переменного тока 50 ± 1 Гц. Напряжение сети 220 ± 10 В.

32. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования.

33. Используют посуду из стекла. Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Ее промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды смачивают хромовой смесью, после чего на 2-3 часа посуду оставляют, затем тщательно промывают водопроводной водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают 3-4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для тестирования, за исключением мерной, - в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1 часа.

34. Химически чистую посуду для тестирования хранят с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

35. Для культивирования тест-культур допускается использование пластиковой посуды.

36. Извлечение водорастворимых форм химических соединений из материалов и изделий. В сосуд помещают образец или его часть и заливают 5-ти кратным объемом (5 мл на 1 г образца) дистиллированной воды (рН 7,0-7,4) и выдерживают в течение 24 часов, полученный экстракт тестируют на токсичность.

37. Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность.

38. При исследовании химических веществ или их смесей готовят растворы с концентрацией, отличающейся на порядок, например, 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100; и 1000 мкг/мл, исходя из известных сведений о возможной

токсичности и растворимости. При исследовании водорастворимых веществ в качестве растворителя используют дистиллированную воду, при исследовании водонерастворимых веществ - органические растворители (этиловый, изопропиловый спирт и др. спирты), раствор диметилсульфокида (ДМСО). Полученные растворы предварительно фильтруют через бактериальные фильтры и непосредственно вносят в среду. При использовании растворов ДМСО не рекомендовано выполнять тестирование на первичных клеточных культурах в качестве тест-модели.

39. В случае изучения смесей водорастворимых и водонерастворимых веществ и природных объектов допустимо как приготовление вытяжек, так и их непосредственное внесение в среду проведения исследования, в этом случае соотношение выбирается в зависимости от природы объекта и известных сведений о его возможной токсичности.

ГЛАВА 7 ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПО КИНЕТИЧЕСКИМ МАРКЕРАМ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

40. Ограничением при проведении тестирования природных объектов на микроорганизмах является высокая начальная контаминация объекта. При тестировании химических веществ и их смесей ограничением является их бактериостатическое действие.

41. В качестве маркеров используется показатель удельной скорости экспоненциального роста μ в условиях периодического культивирования чувствительных микроорганизмов.

42. Для культивирования *Azotobacter sp.* БИМ-74 использовали среду 1 по п. 19 Инструкции. Культивирование в течение 48 час при 28-30 °С.

43. Для культивирования *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6 использовали среду Самойленко по п. 20 Инструкции. Культивирование в течение 48 час при 28-30 °С.

44. Для приготовления рабочих культур штаммы отсеивают на питательную среду приведенного состава и инкубируют в термостате при температуре 28-30 °С в течение 48-72 ч. Готовят суспензию тест-штаммов в физрастворе и доводят содержание клеток до 10^8 КОЕ/мл, используя стандарт мутности на 5 ед.

45. Проведение испытания. Подготовленные образцы стерильной пипеткой вносят в приготовленные культуральные среды. Тщательно перемешивают внесенные вещества по всему объему среды. В контрольные среды вместо образца вносят равный объем растворителя. Приготовленные среды разливают в измерительные ячейки по 10-15 мл, инокулируют 0,1 – 0,5 мл рабочей суспензии тест-штамма и инкубируют в термоинкубаторе при 28-30 °С в течение 4-18 час. Исследования проводят не менее чем в трех повторностях для каждой концентрации.

46. Для оценки роста тест-штамма выбирают параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующих питательных средах имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу быстрого роста культуры и значительные значения изменений электрохимических показателей среды.

47. Величину лаг-периода (длительность начальной фазы роста) определяют с использованием показателя DT микробиологического анализатора.

48. Расчет параметров роста тест-штамма. Скорость роста оценивают по изменению оптической плотности через каждые 0,5 часа, отбирая аликвоты для измерения на спектрофотометре при длине волны 600нм в кювете толщиной 0,5-1см. При определении удельной скорости роста популяции используют только экспоненциальную фазу.

49. Удельную скорость роста рассчитывают по формуле:

$$\mu = (\ln X_1 - \ln X_0) / (t - t_0), \quad (1)$$

где X_T и X_0 – плотности клеточной суспензии в моменты времени соответственно t и t_0 .

50. Для оценки токсичности пробы рассчитывают коэффициент I (степень ингибирования) по формуле:

$$I = \frac{\mu_1}{\mu_2}, \quad (2)$$

где I – степень ингибирования,

μ_1 – удельная скорость роста в контроле,

μ_2 – удельная скорость роста в опыте.

51. Для расчета показателя I берутся средние арифметические значения μ_1 и μ_2 (не менее чем из трех повторностей).

Если $I < 1$ - выявлен ингибирующий эффект на тест-штамм микроорганизма, что свидетельствует о цитотоксическом действии изучаемого объекта исследования.

52. Метрологические характеристики теста должны составлять: сходимость результатов определения параметра I – 5 %, воспроизводимость результатов определения параметра I – 5%.

53. Параллельно проводится оценка токсического воздействия на тест-культуру по морфологическим маркерам. Готовят фиксированные препараты тест-культур для простого окрашивания метиленовым синим из контроля и опыта, микроскопируют не менее 5 полей зрения. Наличие атипичных клеточных форм свидетельствует о токсическом воздействии на культуру.

ГЛАВА 8

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТЕСТ-КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

54. Оценка токсического воздействия по изменению дегидрогеназной активности тест-культур микроорганизмов основана на способности клеток тест-штаммов *Azotobacter sp.* БИМ-74 и *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6 восстанавливать метиленовый синий в микроаэрофильных условиях при добавлении раствора глюкозы.

55. Метиленовый синий играет в этой системе роль одновременно акцептора водорода и индикатора, позволяющего судить о повреждающем действии токсикантов на клеточные дегидрогеназы.

56. Критерием токсического действия является увеличение времени обесцвечивания метиленового синего в исследуемой пробе (параметр В) по сравнению с таковой для пробы с раствором, не содержащим токсических веществ (V_0). Количественную оценку токсического эффекта проводят по индексу токсичности «Т».

57. Для определения рабочей дозы готовят суспензию клеток тест-культуры со скошенного агара, используя 10 мл физиологического раствора. За рабочую дозу принимали такую концентрацию клеток тест-культуры, которая приводит к обесцвечиванию 0,002% красителя метиленового синего в течение 1 часа при температуре 26-28 °С в микроаэрофильных условиях при добавлении 0,4% глюкозы.

58. Полученную суспензию клеток титруют путем последовательных двукратных разведений в физиологическом растворе (объем 5 мл). Отбирают по 1 мл полученных разведений, пробирки встряхивают и термостатируют при 28 °С в течение 3 час для стабилизации ферментативной активности. Затем для создания микроаэрофильных условий в каждую пробирку вносят по 2 мл расплавленного и охлажденного до температуры (45 ± 3) °С 1% питательного агара, содержащего 0,002% красителя метиленового синего и 0,4% глюкозы. Пробирки после встряхивания термостатируют при оптимальной температуре в течение 1 час, после чего учитывают результат. Дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур восстанавливают метиленовый синий в микроаэрофильных условиях, что выражается в обесцвечивании. Наибольшее разведение тест-культуры, вызвавшее обесцвечивание, принимают за рабочую дозу.

59. При проведении испытания образцы стерильной пипеткой вносят в пробирки с рабочей дозой тест-культур. Тщательно перемешивают внесенные образцы по всему объему среды. В контрольные среды вместо образца вносят равный объем растворителя. Затем для создания микроаэрофильных условий в каждую пробирку вносят по 2 мл расплавленного и охлажденного до температуры (45 ± 3) °С 1% питательного агара, содержащего 0,002% красителя метиленового синего и 0,4% глюкозы.

60. Для оценки токсического действия пробирки после встряхивания термостатируют при оптимальной температуре в течение 1 час, после чего учитывают результат, используя параметр В (час). За В принимают время, в течение которого произошло полное обесцвечивание метиленового синего в пробирке, содержащей рабочую дозу тест-штамма.

61. Количественная оценка параметра тест-реакции выражают в виде безразмерной величины – индекса токсичности «Т», равной отношению

$$T = 100 (V_0 - V) / V_0, \quad (3)$$

где V_0 и V , соответственно, время обесцвечивания метиленового синего контроля и опыта при фиксированной рабочей дозе тест-штамма.

62. Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности: допустимая степень токсичности образца: индекс токсичности Т меньше 20;

образец токсичен: индекс Т равен или больше 20 и меньше 50;

образец сильно токсичен: индекс токсичности Т равен или более 50.

ГЛАВА 9

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ТЕСТ-КУЛЬТУРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

63. Определение малонового диальдегида широко используется в лабораторной практике как показатель, характеризующий течение деструктивных окислительных процессов и процессов перекисного окисления липидов. Использование этого метода в качестве маркера токсичности в культуре микроорганизмов при проведении токсикологического эксперимента *in vitro*, дает возможность выявлять механизм токсического действия ксенобиотиков.

64. Методика основана на проведении реакции малонового диальдегида с 2-тиобарбитуровой кислотой, в ходе которой при высокой температуре и кислом значении рН образуется окрашенный триметиновый комплекс, содержащий 1 молекулу малонового диальдегида и 2 молекулы 2-тиобарбитуровой кислоты. Далее триметиновый комплекс определяют спектрофотометрически.

65. Ход определения. В реакционную смесь, содержащую 3 мл 2% раствора ортофосфорной кислоты и 1 мл 0,8% раствора тиобарбитуровой кислоты, вносят 0,1 мл культуры тест-штамма, разведенной в 10 раз буфером (5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl). Смесь инкубируют 45 мин на водяной бане. Затем смесь охлаждают до комнатной температуры и экстрагируют окрашенный продукт 4 мл бутанола при встряхивании в течение 1 мин. После экстракции бутанол отделяют, для растворения посторонних

примесей в бутанол добавляют 50 мкл этилового спирта. Для приготовления стандартной пробы в реакционную смесь добавляют 0,1 мл 5 мкМ 1,1,3,3-тетраметоксипропана в бутаноле. Измерения оптической плотности органической фракции с учетом оптической плотности холостой пробы проводят на спектрофотометре при длине волны 532 нм.

66. Содержание малонового диальдегида в пробе (X , нмоль/мл) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_{\text{проба}}}{D_{\text{стандарт}}} \times \frac{50}{V}, \quad (4)$$

где $D_{\text{проба}}$ – оптическая плотность пробы;

$D_{\text{стандарт}}$ – оптическая плотность стандарта;

50 – коэффициент пересчета на мл;

V – объем разведенной культуры в пробе, мл

67. Рассчитывают коэффициент токсичности T по формуле

$$T = 100 (X_0 - X) / X_0, \quad (5)$$

где X_0 и X , соответственно, содержание малонового диальдегида в пробе контроля и опыта.

68. Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности: допустимая степень токсичности образца: индекс токсичности T меньше 20;

образец токсичен: индекс T равен или больше 20 и меньше 50;

образец сильно токсичен: индекс токсичности T равен или более 50.

ГЛАВА 10

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P450 В ПЕЧЕНИ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

69. Выделение микросом проводят при 4°C или на льду;

69.1 печени от 3-5 крыс помещают в буфер (0,1 М Трис-НСl; 0,1 М KCl; 1,0 мМ ЭДТА; 1,0 мМ дитиотрейтол; рН 7,4), измельчают скальпелем на кусочки размером до 5 мм, промывают в небольшом объеме этой среды и затем гомогенизируют в этом же растворе в гомогенизаторе в течение 4 циклов на максимальной скорости вращения по 15 с, а затем в гомогенизаторе готовят 25%-ный гомогенат;

69.2 негомогенизированные частицы осаждают (10000 g, 20 мин). Микросомы получают из оставшегося супернатанта осаждением (105000 g, 80 мин), промывают их буфером (0,1 М K_2HPO_4 ; 1,0 мМ ЭДТА; рН 7,4) и снова осаждают (100005 g, 60 мин);

69.3. осадок (микросомы) ресуспендируют в буфере (0,01 М трис-ацетат; 20% глицерин; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ дитиотрейтол; рН 7,4 замораживают в жидком азоте и далее хранят при -18°C. Перед использованием, после

размораживания, суспензию микросом разводят (например, в 100 раз), а затем из разведенного пула используют в пробу 50 мкл суспензии микросом.

70. Измерение содержания P450 в микросомах проводят фотометрией восстановленного дитионитом карбонильного комплекса P450. Разностные спектры поглощения регистрируют на спектрофотометре. Для расчета концентрации P450 используют коэффициент молярной экстинкции $91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

71. Расчет концентрации цитохрома P450 в нмоль/мл производят по формуле:

$$C = \frac{\Delta D}{\varepsilon \cdot l} \quad (6)$$

где c – концентрация цитохрома P450 в нмоль/мл,

ΔD – разностный спектр показателей,

l – длина оптического пути,

ε – коэффициент молярной экстинкции.

72. Субстратспецифические активности (Б[а]П-гидроксилазная активность, этокси-, бензоксирезорифидеэтилазная активность) характеризуют по параметрам максимальной скорости реакции V_{\max} (нмоль продукта реакции/мин. реакции/нмоль цитохрома P450) и константе Михаэлиса K_M (мкМ субстрата). При этом количество продукта реакции определяют по калибровке (для Б[а]П-гидролазной активности строят калибровку по 3-ОН-Б(а)П; для резорифиндеэтилазных активностей – по резорифину в относительных единицах флуоресценции).

Константу Михаэлиса K_M в мкМ рассчитывают по формуле:

$$K_M = \frac{V_{\max}}{2} \quad (7)$$

Оба параметра рассчитывают по программе Enzfitter;

72.1 анализ каталитической активности цитохрома P450 в реакции окисления Б[а]П в 3-ОН-Б(а)П осуществляют при 37°C в буфере (50 мМ трис-HCl, 3 мМ MgCl_2 , pH 7,5) на шейкере в течение 30 мин;

72.2 реакцию начинают внося НАДФН (50 мкМ в системе инкубации) в реакционную смесь с микросомами (0,3-0,5 мкМ цитохрома P450 и 0,5-10 мкМ Б[а]П в системе инкубации). Останавливают реакцию внесением 1 мл холодного ($0-4^\circ\text{C}$) метанола, после чего добавляли 3,25 мл гексана и экстрагируют смесь встряхиванием 1 мин;

72.3 из органической фазы отбирают 1 мл образца и экстрагируют 3-ОН-Б[а]П с помощью 3 мл 1N NaOH на шейкере (1 мин). Концентрацию продукта реакции (3-ОН-Б[а]П) в щелочной фазе определяют на флуориметре при $\lambda_{\text{ex}}=396 \text{ нм}$ и $\lambda_{\text{em}}=533 \text{ нм}$ в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см.

73. Анализ каталитической активности P450 в реакциях с этоксирезорифином (при использовании в качестве индукторов

полиароматических углеводов) и бензоксирезорурфином (при использовании в качестве индукторов лекарственных средств) проводят согласно стандартному подходу;

73.1 субстраты вносят в тест-систему инкубации так, чтобы их концентрации в начале реакции примерно соответствовала величинам K_M , равным концентрациям субстрата, при которых достигаются скорости реакций, равные $0,5 \times V_{max}$, диапазон 0,2-60 мкМ. Окисление, т.е. О-деалкилирование субстратов ведут 10 мин в 0,1 М трис-НСl буферном растворе (рН 7,2) при 30°C;

73.2 реакцию начинают внесением НАДФН (100 мкМ в системе инкубации) в реакционную смесь с микросомами (0,3-0,5 мкМ цитохрома Р450 в системе инкубации). Останавливают реакцию добавлением 1 мл охлажденного до 4°C метанола (в реакциях с БР и ЭР). Концентрацию продуктов определяют на флуориметре при $\lambda_{ex}=365$ нм и $\lambda_{em}=455$ нм и ГР при $\lambda_{ex}=530$ нм и $\lambda_{em}=590$ нм.

74. Концентрацию белка в образцах микросом определяют методом Лоури. Метод основан на образовании биуретового комплекса, который в присутствии фенола дает характерную окраску пропорционально количеству белка;

74.1 для построения калибровочной кривой на аналитических весах взвешивают 10 мг яичный альбумина, растворяют в 100 мл 0,1 N раствора NaOH, оставляют для полного растворения на ночь. При растворении альбумина щелочь приливают постепенно, не взбалтывая. В серию пробирок берется 0,1; 0,2; до 1 мл исходного раствора, объем в каждой пробирке доводится до 1 мл дистиллированной водой, соответственно приливается 0,9; 0,8 и т.д. мл воды. Контроль - 1 мл воды. После колориметрирования по полученным цифрам строится калибровочная кривая. На оси абсцисс откладываются значения концентрации (10γ, 20γ, 30γ и т.д.), по оси ординат - значения экстинции;

74.2 для проведения анализа взвешивают на аналитических весах 200 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 3 мл дистиллированной воды в фарфоровой ступке. Отмеривают микропипеткой 0,03 мл и выливают в пробирку с 7,5 мл 0,1 N раствора NaOH, взбалтывают. Из полученного раствора берут 1 мл, добавляют 4 мл реактива С, через 10 минут приливают 0,2 мл реактива Е. Инкубируют в темноте. Через 30 минут проводят измерения на ФЭК на красном светофильтре ($\lambda=670$ нм) в кювете толщиной 20 мм. Контроль 1 мл дистиллированной воды, 4 мл реактива С, 0,2 мл реактива Е.

74.3. расчет проводится по калибровочной кривой. При навеске 200 мг количество белка в γ умножается на $K = 2,52$, выражается в мг/г сырой ткани.

75. Удельное содержание цитохрома P450 в нмоль/мг белка рассчитывают по формуле:

$$C_{уд.} = \frac{C_{P450}}{C_{белка}}, \quad (8)$$

где C_{P450} – концентрация цитохрома P450 в нмоль/мл,
 $C_{белка}$ – концентрация общего белка в мг/мл.

75. Эффект токсического воздействия оценивают по статистически значимому увеличению экспрессии и ферментативной активности цитохрома P450 в печени модельных животных.

ГЛАВА 11

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P450 В КУЛЬТУРЕ *PHANAEROCHAETE CHRYSOSPORUM*

76. *Phanaerochaete chryso sporum* относится к базидиальным грибам и является фитипатогеном, вызывая белую гниль древесины. Обладает высоким уровнем экспрессии цитохрома P450.

77. Для культивирования *Phanaerochaete chryso sporum* использовали агаризованную среду Сабуро. Культивирование в течение 48 час при 25-30 °С.

78. Для приготовления смыва клеток культуры грибов в чашку Петри (пробирку) добавляют 1 мл буферного раствора (50 мМ Tris, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4), пластиковым шпателем снимают культуру клеток с агаровой подложки, переносят снятую культуру клеток в буферном растворе в пробирку Эппендорф.

79. Для разрушения клеток полученную смесь в пробирке обрабатывают ультразвуком 3 раза по 10 сек. на ультразвуковой бане (35 кГц) с 1 мин интервалом между каждой обработкой. В перерывах пробирки для охлаждения помещают на лед. Центрифугируют при следующих условиях: 4 °С, 15000 об/мин, 30 мин. Супернатант далее аликвотируют в буферном растворе (50 мМ Tris, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4) и замораживают при -20 °С, осадок удаляют.

80. Определение содержания цитохрома P450 и ферментативной активности в культуре *Phanaerochaete chryso sporum* проводят в соответствии с главой 10 инструкции.

81. Эффект токсического воздействия оценивают по статистически значимому увеличению числа клеток с учетом указанных маркеров

ГЛАВА 12

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ КЛЕТОК НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРЕ

82. Метод основан на учете показателей клеточного цикла в клетках животных, например, селезенки, тимуса, крови, а также перевиваемых культур клеток путем анализа гистограмм распределения содержания ДНК в клетках.

83. Используют клеточные суспензии, фиксированные этанолом, дважды отмытые фосфатным буфером с рН 7,0-7,2, фиксируют в охлажденном 70% этаноле и при необходимости хранят при -20°C до проведения анализа.

84. Фиксированные клетки отмывают ФСБ, обрабатывают раствором РНК-азы (150 Ед/мл) и окрашивают раствором пропидиум иодида (50 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре .

85. Полученные образцы изучают и на проточном цитофлуоримете. Для возбуждения флуоресценции используют аргоновый лазер при длине волны 488 нм. Измерения проводят при скорости до 2000 клеток в 1 сек. В одной пробе анализируют не менее 30 000 клеточных ядер.

86. Определяют распределение клеток по фазам клеточного цикла, используя специальные компьютерные программы. Оценивают пролиферативную активность клеток, частоту микроядер для оценки мутагенного действия, частоту апоптоза для оценка репродуктивной гибели клеток.

87. Процент апоптотических клеток рассчитывают на основании измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной иодистым пропидием (250 мкг/мл). На гистограмме в регионе M1 регистрируют апоптотические клетки с содержанием ДНК менее $2n2c$

88. Эффект токсического воздействия оценивают по статистически значимому увеличению числа клеток с учетом указанных маркеров.

ГЛАВА 13

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПО β -ГАЛАКТОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК *in vitro*

89. Метод основан на увеличении β -галактозидазной активности в стареющих клетка, потерявших способность к делению.

90. Клетки отмывают два раза фосфатным буфером и фиксируют 3% раствором формальдегида, приготовленном на фосфатном буфере, в течение 5 минут. Затем клетки отмывают два раза фосфатным буфером и в течение 24 часов инкубируют при 37°C красящим раствором следующего состава: 1 мг/мл раствора 5-бromo-4хлоро-3-индолил-бета-D-галактозида (X-gal, маточный раствор – 20 мг/мл X-gal в диметилформамиде), 40мМ буфера лимонная кислота/фосфат натрия (рН 6,0), 5 мМ ферроцианида калия, 5 мМ феррицианида калия, 150 мМ хлорида натрия, 2мМ хлорида магния.

91. После окраски клетки отмывают два раза фосфатным буфером и 3 раза в восходящих концентрациях этанола (24, 48 и 96%), высушивают стекла с клетками на воздухе и хранят в комнатных условиях. С помощью

микроскопа регистрируют окрашенные (β -гал позитивные) и неокрашенные клетки.

92. Эффект токсического воздействия оценивают по статистически значимому увеличению числа стареющих (окрашенных) клеток в опыте по сравнению с контролем.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция по применению

«Применение системы маркеров токсического воздействия ксенобиотиков на клетки про- и эукариот для гигиенической оценки опасности загрязнения объектов среды обитания человека»

	стр.
Глава 1 Область применения.....	2
Глава 2 Термины и определения.....	2
Глава 3 Оборудование, материалы и реактивы.....	3
Глава 4 Требования к квалификации лиц, проводящих исследования....	7
Глава 5 Приготовление растворов, реактивов и питательных сред.....	7
Глава 6 Подготовка проб к анализу и условия проведения измерений...8	
Глава 7 Оценка токсического воздействия по кинетическим маркерам роста микроорганизмов.....	10
Глава 8 Оценка токсического воздействия по изменению дегидрогеназной активности тест-культур микроорганизмов.....	12
Глава 9 Оценка токсического воздействия по изменению содержания малонового диальдегида в тест-культуре микроорганизмов.....	14
Глава 10 Оценка токсического воздействия по изменению экспрессии и ферментативной активности цитохрома P450 в печени модельных животных	15
Глава 11 Оценка токсического воздействия по изменению экспрессии и ферментативной активности цитохрома P450 в культуре <i>Phanaerochaete chrysosporum</i>	17
Глава 12 Оценка токсического воздействия по морфологическим показателям клеток на проточном цитофлюориметре.....	18
Глава 13 Оценка токсического воздействия по β -галактозидазной активности клеток <i>in vitro</i>	19

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая инструкция разработана специалистами государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (И.А.Застенская, А.М.Войтович, Н.В.Дудчик, И.И.Ильюкова, Е.К.Власенко).

2. Утверждена Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 2010 г., регистрационный №

3. Введена впервые.