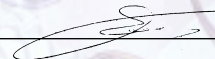


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

Разрешено Минздравом Республики
Беларусь для практического использования

Заместитель министра здравоохранения
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь



В.И. Ключенович

31 декабря 2002 г.
Регистрационный № 135-1102

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЛИЯНИЯ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ НА ПРОЦЕССЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ
СТОЧНЫХ ВОД И САМООЧИЩЕНИЕ ВОДОЕМОВ**

(инструкция по применению)

Учреждение-разработчик: Научно-исследовательский институт санитарии и гигиены, Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Авторы: д-р мед. наук, проф. С.М. Соколов, канд. мед. наук В.В. Дробеня, д-р мед. наук, проф. А.И. Свириновский, В.В. Бурая, В.В. Пасюков, В.В. Сивицкая

[Перейти к оглавлению](#)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОЦЕНКА ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТЕРОВ

1. Изучение токсичности солей тяжелых металлов на инфузорию тетрахимена 3
2. Экспресс-оценка суммарной мутагенной активности и общей токсичности вод поверхностных водотоков методами биотестирования 3
3. Определение суммарной мутагенной активности воды поверхностных водотоков 4
4. Методология проведения эксперимента по определению жизнеспособности клеток лимфобластоидной клеточной линии 1 М-9 при воздействии цитотоксических агентов в растворах солей тяжелых металлов 5
5. Инструкция по ускоренному интегральному методу определения влияния солей тяжелых металлов на процессы биологической очистки сточных вод и самоочищения водоемов 6
6. Инструкция по использованию культуры лимфобластоидных клеток линии LM-9, рекомендуемых для токсиколого-гигиенических исследований 7

ОЦЕНКА ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТЕРОВ

1. Изучение токсичности солей тяжелых металлов на инфузорию тетрахимена

Лабораторная культура одноклеточных организмов инфузорий *Tetrahymena pyriformis* имеет ряд преимуществ в силу своей изученности близости к теплокровным животным по потребности в пищевых веществах и характеру их метаболизма. Обладая высокой скоростью роста, *Tetrahymena pyriformis* позволяет получить за относительно непродолжительное время высокодостоверную информацию на клеточном, организменном и популяционном уровнях с учетом отдаленных и специфических эффектов.

Принцип методов заключается в анализе скорости роста популяции *Tetrahymena pyriformis*, развивающейся в среде культивирования, содержащей исследуемые объекты. Изменения в процессе жизнедеятельности организма на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях сопровождаются изменениями скорости роста клетки, организма, популяции. Учитывая, что рост животных, растений, популяций подчиняется одним законам, анализ и количественная оценка изменений скорости роста популяции *Tetrahymena pyriformis*, происходящих под влиянием факторов химической и физической природы, позволяет выявить общебиологические закономерности воздействия этих факторов на организм.

Осуществлена биологическая оценка в отдельности и многокомпонентной смеси четырех загрязнителей поверхностных водоемов (цинка, меди, свинца, никеля), присутствующих в растворе в концентрации, равной предельно допустимой концентрации (ПДК) для каждого из элементов.

При совместном нахождении в воде поверхностных водоемов исследуемых солей тяжелых металлов при 1–4 ПДК полученные ранее результаты не могут свидетельствовать о гигиенической безопасности.

2. Экспресс-оценка суммарной мутагенной активности и общей токсичности вод поверхностных водотоков методами биотестирования

Результаты исследований с использованием биологических тест-объектов коррелируют с данными, полученными на экспериментальных животных. На биологических тест-объектах можно проводить оценку острой токсичности, суммарной мутагенной активности, причем биологические объекты оценивают эффект всей суммы загрязнений воды поверхностных водоисточников, их комплексное воздействие на человека. При получении отрицательных результатов по экспресс-оценке суммарной мутагенной активности или общей токсичности необходимо проведение полного химического анализа.

Тест-культуры микроорганизмов

Стандартные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA-100, дающие мутации типа сдвига рамки считывания и с заменой пар оснований соответственно без метаболической активации *in vitro*, несут мутации ауксотрофности по гистидину (his^-) и позволяющие выделять различные повреждения ДНК. Эти штаммы входят в качестве тест-объектов для оценки мутагенности в состав всех международных официально принятых комплексных систем изучения мутагенов окружающей среды.

Определение токсичности воды поверхностных водотоков проводится на билюминометре типа «Биоток», ТУ 9443-001-1153463-96. В качестве тест-объекта используется коммерческий препарат лиофилизированных бактерий микробиосенсер «Эколюм», ТУ 6-09-20-236-93. Основным действующим началом является фермент люцифераза, активность которой проявляется излучением квантов света, регистрируемого билюминометром. Излучение света обратно пропорционально концентрации токсинов в исследуемом образце.

3. Определение суммарной мутагенной активности воды поверхностных водотоков

Изучение суммарной мутагенной активности (СМА) воды проводят с помощью бактериальной тест-системы — теста Эймса. В качестве биотестеров берут стандартные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA-100, используемые в тестах на индукцию обратных мутаций, не обладающие способностью синтезировать аминокислоту гистидин, вследствие этого их обозначают his^- . Под воздействием веществ, обладающих мутагенной активностью, происходит обратная мутация от his^- к his^+ , что позволяет бактериям синтезировать гистидин из неорганического азота. Образующиеся мутанты называются ревертантами.

Учет результатов и оценка СМА

В течение первых нескольких часов инкубации все индикаторные his^- бактерии интенсивно размножаются за счет следовых количеств гистидина в среде. После исчерпания его запасов основная часть бактерий прекращает деление в верхнем агаре, образуется видимый глазом (лучше с помощью лупы) сплошной газон бактерий. Однако те бактерии, у которых возникли нарушения ДНК, приводящие к образованию мутаций, вследствие чего происходит обратный переход his^- в his^+ , продолжают делиться, поскольку они приобрели способность синтезировать собственный гистидин из солей аммония, содержащихся в нижнем агаре. Каждая отдельная ревертантная his^+ мутантная бактерия за 48 ч способна дать начало достаточно большому количеству дочерних клеток, видимых невооруженным глазом и легко подсчитываемых. Количество колоний в чашке точно отражает количество ревертантов his^+ , возникших спонтанно (чистый контроль), и в результате воздействия химических загрязняющих веществ (опыт), то есть учет результатов проводят путем подсчета, а затем сравнения числа колоний ревертантов на опытных и контрольных чашках. Уровень мутагенного эффекта определяют как кратность превышения числа ревертантов (среднее по трем чашкам) в данном опытном варианте над чистым контролем (среднее по трем чашкам).

Метод является полуколичественным, так как учитывает число селективных мутантов, а не частоту индуцируемых мутаций. В этом случае не определяется доля мутантных клеток по отношению к числу выживших бактерий после действия испытуемых веществ. Однако получение данных о той или иной степени превышения числа колоний на чашках с опытными вариантами по отношению к контролю позволяет выявить мутагенность исследуемых веществ и охарактеризовать уровень мутагенного эффекта по отношению к данному индикаторному объекту.

4. Методология проведения эксперимента по определению жизнеспособности клеток лимфобластической клеточной линии 1 М-9 при воздействии цитотоксических агентов в растворах солей тяжелых металлов

Проблема методологии и экстраполяции данных, полученных в опытах на животных, на человека продолжает быть актуальной. Принято считать, что нет ни одного вида животных или их таксономической группы, которые могли бы быть идеально пригодными для выявления вероятных токсических факторов. Согласно современным представлениям, все шире распространяется мнение о трудности определения безопасности (или опасности) для человека действия любого ксенобиотика на основании опытов, проведенных только на животных.

Анализ литературы свидетельствует о возможности сокращения срока токсикологических исследований с использованием методов, направленных на изучение защитно-приспособительных систем, функционирующих в процессе действия химических веществ малой интенсивности. По мнению многих исследователей нельзя считать, что при переходе от действующей дозы к недействующей (безопасной) риск от контакта с факторами малой интенсивности полностью исчезает.

За рубежом среди экспериментальных моделей-объектов, используемых в медико-биологических исследованиях, контроле и экспертной оценке все более заметное и важное место занимают культивируемые клетки человека. Как известно, в настоящее время культивируют практически все типы клеток человека. Большое внимание в рекомендациях ВОЗ уделяется методам *in vitro* при определении индивидуальной чувствительности воздействию веществ малой интенсивности, как в плане моделирования непосредственных реакций, так и отдаленных последствий (эффектов). Обращается внимание на развитие методов, позволяющих моделировать, изучать и прогнозировать ранние нарушения здоровья человека, происходящие на уровне клеток и их отдельных структурных компонентов. Клетки, выращенные вне организма, — единственная модель, позволяющая наблюдать за первичными нарушениями в самих клетках до вторичных их реакций, в результате влияния организма в целом.

Для установления качественных и количественных закономерностей в токсикометрии широко используют тесты культуральных методов: нарушение синтеза клеточных макромолекул, угнетение и стимуляция ферментативной активности, изменение размера ядер, изменение морфологии самих клеток; нарушение размножения и дифференцировки.

5. Инструкция по ускоренному интегральному методу определения влияния солей тяжелых металлов на процессы биологической очистки сточных вод и самоочищения водоемов

Оценка *in vitro* токсичности различных веществ для человека требует разработки таких методов, в которых бы не использовались животные, которые проводились бы в стандартных условиях, обладали простотой при выполнении исследований и проводились на материале, имеющем отношение к организму человека.

В связи с тем, что таким условиям удовлетворяют культивируемые клетки человека, целью исследования было определить возможность использования клеточной лимфобластоидной линии ИМ-9 для определения токсичности испытуемых сред.

При изучении сохранения жизнеспособности кроветворных клеток человека в условиях различных воздействий с точки зрения стабильности кроветворения разработана методика биоиндикации на перевиваемой клеточной культуре. Данная культура клеток представляет гомогенную и генетически однородную популяцию клеток, растущих в постоянных условиях. Жизнеспособность клеток была оценена в течение короткого периода времени при варьирующей силе (концентрации солей тяжелых металлов) и продолжительности воздействия. Результаты воздействия оцениваются по известным методикам. В частности, в наших исследованиях выживаемость клеток характеризовалась по сохранности их метаболической активности.

Методы биоиндикации на клеточных культурах, которые подбираются в каждом конкретном случае, широко используются в токсикологии, гигиене и экологии.

Методика разработана на основании исследований, выполненных на лимфобластоидной клеточной линии IM-9 (ATCC CCL159).

Исследования проводились на водных растворах металлов: свинца, никеля, меди и цинка, концентрация которых колебалась в пределах 0-2 ПДК воды поверхностных водоемов.

Принцип метода оценки жизнеспособности клеток с метилтиазолтетразолием (МТТ-тест)

Предлагаемый метод является альтернативой классических методов, использующих изотопные метки (Н-тимидин, ^{51}Cr) в пролиферативных и/или цитотоксических тестах, а также альтернативой методов визуализации мертвых клеток по исключению витальных красителей трипанового синего, нейтрального красного и др. Данный метод применяется для определения клеточно-опосредованной цитотоксичности, вызываемой различными токсикантами (тропными к опухолевым клеткам-мишеням), чувствительности мишеней к этим агентам, для анализа пролиферативного ответа клеток-эффекторов на различные митогенные, ростовые и дифференцировочные факторы, а также для определения жизнеспособности клеток с воздействием различных агентов или без такового.

Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток конвертировать растворимую тетразолиевую соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолиум бромид (МТТ) в нерастворимый формазан. Мертвые клетки не способны столь же эффективно редуцировать МТТ. Интенсивность окраски линейно коррелирует с количеством жизнеспособных клеток в суспензии.

6. Инструкция по использованию культуры лимфобластоидных клеток линии LM-9, рекомендуемых для токсиколого-гигиенических исследований

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

Оборудование:

1) ламинарный бокс для работы с клеточными культурами в стерильных условиях;

- 2) ELISA-ридер (Sanofi Pastuer PR 2100, Франция);
- 3) подсчет клеток проводят в камере Горяева с использованием счетчика Адамса;
- 4) термостат ТС-80 с температурой $37 \pm 1^\circ \text{C}$;
- 5) холодильник «Минск 11» для хранения ростовой среды и других растворов при температуре $4 \pm 2^\circ \text{C}$.
- 6) морозильник «Минск 11» для хранения эмбриональной телячьей сыворотки и других растворов при температуре $-18 \pm 2^\circ \text{C}$;
- 7) микроскоп (Zeiss, Германия) для подсчета клеток в камере Горяева;
- 8) для культивирования клеток используют стерильные:
 - флаконы для тканевых культур (Sarstedt, Германия) с площадью роста 25 см^2 и вместимостью 50 мл;
 - крышки с/без аэрации (Sarstedt, Германия) для соответствующих флаконов;
 - 96-луночный планшет (Flow Lab, Великобритания);
 - флаконы из стекла для бактериальных и вирусных препаратов вместимостью 5, 10, 250 мл;
 - пробки резиновые ПР 27, 24, 20, 19, 18, 16, 14,5 по ГОСТ 7852-76;
 - пинцет;
 - автоматические дозаторы (Ленпипет, Россия) на 20, 200, 1000 мкл;
 - наконечники (Sarstedt, Германия) для автоматических дозаторов.

Препараты:

Водные растворы металлов: свинца, никеля, меди и цинка предоставлены.

Биологический объект

Используют лимфобластоидную клеточную линию IM-9 (ATCC CCL159), которая характеризуется лимфобластоидной морфологией, в суспензии растет в виде отдельных клеток либо образует скопления. Время удвоения по данным ATCC около 45 ч. Кариотип нормальный околодиплоидный. Линия положительна по антигенам вируса Эпштейна — Барра, синтезирует легкую к-цепь иммуноглобулина G (IgGk). Линия положительна по РНК bcl-2, экспрессирует поверхностные маркеры CD1V, CD20, CD11a, CD29, CD49d, CD18, CD54/ICAM-1, ICAM-2, -3, CDS 7, HLA-DR, поверхностный IgGhc, рецептор для человеческого гормона роста. Клетки не экспрессируют белок ретинобластомы Rb. Таковую культуру клеток, выращенную во флаконах для тканевых культур, можно получить в НИИ гематологии и переливания крови в лаборатории патофизиологии лейкозов.

Для культивирования IM-9 используется среда MDM (Sigma, США). В состав среды входят необходимые добавки: 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-глутамина, 0,1% антибиотиков (пенициллин-стрептомициновый комплекс).

L-глутамин должен добавляться в среду через каждые 7 сут. Пересевы (пассажи) маточных культур клеток, поддерживаемых в лаборатории во флаконах, необходимо проводить через каждые 3–4 сут.

В процессе культивирования маточной линии IM-9 существует опасность загрязнения культуры бактериальной флорой, что может привести к утрате исходной культуры клеток, поэтому при работе с клеточной линией необходимо заранее контролировать стерильность используемых сред и растворов и строго соблюдать правила асептики.

Нельзя проводить лечение загрязненной культуры, необходимо приобретать свежую партию клеток.

В качестве раствора для прижизненного окрашивания клеток используется $0,5 \pm 0,05$ г трипановой сини, растворенной в 100 ± 1 мл 0,9% хлорида натрия.

Этапы проведения эксперимента

1. Проведите визуальный осмотр культуры клеток, предварительно несильно встряхнув флакон для тканевых культур. Клеточная культура должна представлять собой однородную слегка желтоватую взвесь.

2. Перенесите флакон в ламинарный бокс.

3. Откройте флакон.

4. Возьмите дозатором 19,5 мкл взвеси клеток и перенесите ее в лунку 96-луночного планшета, затем добавьте туда 19,5 мкл раствора трипанового синего; перемешайте дозатором полученную смесь и оставьте на 5–10 мин при комнатной температуре.

5. Проведите подсчет клеток в камере Горяева по формуле:

$$X = A - 10000,$$

где А — число клеток в 12,5 больших квадратах камеры Горяева; X — число клеток в мл.

Примечание: а) при использовании трипанового синего окрашиваются мертвые и поврежденные клетки, жизнеспособные не окрашиваются; б) если количество окрашенных клеток превышает 10–15%, то культуру клеток следует браковать (такое положение распространяется исключительно на линию IM-9). Разлейте автоматическим дозатором по 1 мл и более (в зависимости от количества концентраций исследуемого соединения, исходя из того, что на каждую исследуемую концентрацию приходится по 270 мкл клеточной суспензии) в необходимое количество 5 или 10 мл стеклянных флаконов (в зависимости от количества исследуемых соединений) в концентрации 150 000 клеток на мл (например, для приготовления 1 мл клеточной взвеси с такой концентрацией при количестве клеток 1 млн/мл в исходной клеточной культуре необходимо взять 150 мкл исходной клеточной взвеси и 850 мкл ростовой среды) соблюдая строжайшие режимы асептики, после чего закройте флаконы резиновыми пробками.

Поставьте стеклянные флаконы с клеточной культурой в термостат при температуре 37° С и в увлажненной 5% CO₂ атмосфере на 24-часовую инкубацию для достижения логарифмической фазы роста.

Достаньте стеклянные флаконы с культурой из термостата и флакон с ростовой средой из холодильника и перенесите их в ламинарный бокс. Откройте флаконы у огня.

Перенесите дозатором ростовую среду без клеток из флакона в лунки первой вертикальной дорожки 96-луночного планшета по 90 мкл в каждую лунку. Закройте стеклянный флакон с ростовой средой резиновой пробкой. Возьмите из первого стеклянного флакона с клеточной культурой (предварительно его встряхнув) 90 мкл клеточной взвеси и перенесите ее в первые лунки 2, 3 и 4 вертикальных дорожек планшета (дублирующие друг друга триплеты необходимые для получения среднего значения и ошибки среднего).

Добавьте в первый флакон с культурой клеток исследуемое цитотоксическое соединение в минимальной тестируемой концентрации.

Примечание. При расчете тестируемой концентрации следует помнить, что объем клеточной взвеси во флаконе уменьшился на 270 мкл.

Возьмите из первого стеклянного флакона с клеточной культурой (предварительно его встряхнув) 90 мкл клеточной взвеси и перенесите ее во вторые лунки 2, 3 и 4 вертикальных дорожек планшета.

Добавьте в первый флакон следующую по возрастанию тестируемую концентрацию исследуемого цитотоксического вещества.

Примечание: а) при расчете тестируемой концентрации следует помнить, что во флаконе уже имеется предыдущая концентрация исследуемого соединения, а объем клеточной взвеси во флаконе уменьшился еще на 270 мкл; б) при работе с дозатором следует менять использованный наконечник на новый.

6. Выполните эти же действия со вторым и последующими флаконами (в зависимости от количества исследуемых цитотоксических соединений).

7. Перенесите закрытый 96-луночный планшет с анализируемыми концентрациями исследуемых соединений и лимфобластоидными клетками в стерильный эксикатор с увлажненной 5% CO₂ атмосферой.

8. Перенесите эксикатор в термостат и инкубируйте планшет с клеточной культурой и исследуемыми цитотоксическими агентами при температуре 37° С в течение 48 ч.

9. Достаньте эксикатор из термостата и перенесите в ламинарный бокс.

10. Достаньте из эксикатора тестируемый 96-луночный планшет.

11. В каждую тестируемую лунку планшета (в том числе и в лунки, которые содержат только ростовую среду) добавьте по 20 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) в концентрации 5 мг/мл.

12. Перенесите эксикатор в термостат и инкубируйте планшет с клеточной культурой, исследуемыми цитотоксическими агентами и раствором МТТ при температуре 37° С в течение 4 ч.

13. В каждую анализируемую лунку (в том числе и в лунки, которые содержат только ростовую среду) добавьте по 100 мкл солюбилизующей смеси, содержащей 50% пропанола-2 (Aldrich, США), 10% додецилсульфата натрия (Serva, Германия), 0,01 N соляной кислоты.

Примечание. Для полноты растворения содержимое лунок энергично пипетируется (20–30 толчков на лунку).

14. Закрытый планшет перенесите в холодильник и выдержите в течение 20–25 мин до осаждения пены в тестируемых лунках.

15. Откройте планшет и перенесите его в прибор ELISA-ридер, предварительно установив на приборе фильтр с $\lambda = 540$ нм.

16. Для «обнуления» первой вертикальной дорожки планшета (содержит только ростовую среду), которая используется для нулевого значения оптической плотности, нажмите клавишу «BLANK» на приборе.

17. Для получения цифровых значений оптических плотностей в тестируемых лунках нажмите клавишу «START» на приборе.

18. Переведите полученные результаты в проценты, исходя из того, что полученное значение для контрольного триплета (первые три лунки параллельных вертикальных дорожек для каждого исследуемого цитотоксического агента) принимается за 100%.

19. Рассчитайте среднее значение и ошибку для каждого анализируемого цитотоксического соединения, используя соответствующие стандартные статистические формулы или компьютерные статистические программы.

20. Постройте график зависимости жизнеспособности клеток (в %) от концентрации исследуемого цитотоксического вещества.

В качестве примера предлагается график зависимости жизнеспособности лимфобластоидной клеточной линии от концентрации солей никеля.