

С. В. Редкозубов^{1,2}, Г. Л. Снигур¹, В. Д. Бессмертнова

¹ Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра биологии;

² НИИ фармакологии лаборатория лекарственной безопасности

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ В ТЕСТАХ НА МУТАГЕННОСТЬ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 575.224.46.044

В обзоре представлен ретроспективный анализ применения различных организмов в качестве биологических моделей для изучения индуцированного мутагенеза. Описано становление системы государственного регулирования испытаний химических веществ на мутагенные свойства в разных регионах мира. Изложены свойства и качества различных модельных организмов, применяемых для детектирования мутагенеза.

Ключевые слова: модельный организм, химический мутагенез, генетическая токсикология.

S. V. Redkozubov, G. L. Snigur, V. D. Bessmertnova

FEATURES OF THE APPLICATION OF MODEL ORGANISMS IN MUTAGENICITY TESTS OF CHEMICAL COMPOUNDS

The article presents a retrospective review of the application of different organisms as biological models for exploring induced mutagenesis. It also describes the emergence of the state regulation system of testing mutagenic properties of chemicals in different countries. The properties and qualities of the various model organisms used for detecting mutagenesis are analyzed.

Key words: model organism, chemical mutagenesis, toxicological genetics.

При рассмотрении плана эксперимента по выявлению мутагенных свойств одним из главных вопросов является выбор организма, способного служить адекватной моделью.

Известно, что мутагенный эффект существенно зависит от особенностей подвергаемого воздействию организма. Одни и те же мутагены в одинаковых дозах влияют по-разному на геном про- и эукариотов, на простейших и многоклеточных, на растения и животных. Интенсивность мутагенного эффекта значительно зависит от возраста объекта, от стадии жизненного цикла, от того, подвергается ли воздействию весь организм или конкретный орган.

Дрозофила как первый детектор мутагенеза

В довоенный период развития генетической науки приоритет в области исследования химического мутагенеза был за советской генетикой. Первые результаты опытов по применению химических веществ с целью ускорения мутационного процесса у *Drosophila melanogaster* опубликованы исследователями Института экспериментальной биологии под руководством Н. К. Кольцова. Первым веществом, примененным в качестве химического мутагена, был 10%-й раствор йода. В серии опытов 1932 г. В. В. Сахаров обнаружил и описал новые сцепленные с полом мутации дрозофилы [4]. В 1934 г. М. Е. Лобашев и Ф. А. Смирнов публикуют результаты применения уксусной кислоты и аммиака в качестве

мутагенов, хотя констатируют, что мутационный эффект слабый: 0,090 % в опыте против 0,086 % в контроле.

Как самостоятельное направление генетической науки химический мутагенез сформировался в 1946 г., когда одновременно выходят две работы, посвященные открытию «сверхмутагенов», приближающихся по количеству индуцируемых ими мутаций к рентгеновскому излучению. Автором первой: «Карбонильные соединения и химический мутагенез», является выдающийся советский генетик И. А. Рапопорт [5].

В статье указывается на способность карбонильных соединений с малым дипольным моментом, прежде всего формальдегида, вызывать устойчивые мутации у *Drosophila melanogaster*.

Вторая статья: «Chemical production of mutation», опубликованная в журнале Nature, вышла в соавторстве Ш. Ауэрбах и Д. М. Робсона и описывает активное возникновение доминантных летальных мутаций, сцепленных с половыми хромосомами, у дрозофилы под воздействием горчичного газа (азотистый иприт).

Идея проверить иприт на мутагенную активность возникла у Робсона в начале Второй мировой войны. Робсон, изучая воздействие иприта на влагалищный эпителий мышей, обнаружил, что иприт оказывает действие, аналогичное рентгеновским лучам, подавляя митотическую активность клеток [5].

Альтернативные модели

Следует отметить, что в том же 1946 г. Нобелевская премия по биологии и медицине была присуждена Г. Д. Меллеру за открытие в 1927 г. мутационного процесса под воздействием рентгеновского излучения [13]. Известно, что аналогичный эксперимент годом ранее был произведен советскими генетиками Г. А. Надсоном и Г. С. Филипповым на низших грибах рода *Mucoraceae*, с получением новых стойких рас микроорганизмов после воздействия рентгеновских лучей. Результаты эксперимента были опубликованы в журнале «Вестник рентгенологии и радиологии» № 3 за 1925 г. Эта работа не получила широкой известности из-за отсутствия строгого количественного учета полученных мутаций, а также, вероятно, по причине нестандартного выбора объекта испытаний.

Несмотря на верность генетиков дрозофиле, альтернативные объекты мутагенеза все-таки применялись ввиду их большей утилитарности. Американские генетики Д. У. Бидл и Э. Л. Тэйтума, проводили опыты по наследованию мутаций, вызванных рентгеновским излучением, как на дрозофиле, так и на других объектах: кукуруза и плесневом грибе нейроспора густая (*Neurospora crassa*). Выбор нейроспоры в качестве модельного организма оказался удачным – это быстро размножающийся, неприхотливый к условиям культивирования аскомицет. Клетки гиф одноядерные, в асках образуется ровно восемь спор, расположенных линейно, что облегчает визуальную интерпретацию культуры. Геном гаплоидный, преобладает бесполое спороношение, что позволяет возникшим мутациям сразу же проявляться в фенотипе.

Пекарские дрожжи как объект изучения мутагенеза несколько уступают нейроспоре. Сложный жизненный цикл со сменой диплоидной и гаплоидной стадий делают дрожжи хорошим инструментом для изучения рекомбинации признаков, нежели для детекции мутагенеза.

Г. Д. Меллер в статье, опубликованной в Science, также указывает, что в качестве объекта радиационного мутационного он использовал дрозофилу, однако по другим источникам известно, что он также экспериментировал с осами и кукурузой [5]. Кукуруза была одной из любимых, но второстепенных моделей у американских генетиков. Так, в работе Б. Маклинток 1950 г., сообщающей об открытии «мутабельных локусов» (транспозонов) в геноме кукурузы, автор несколько раз проводит ассоциативные параллели с дрозофилой, не являвшейся объектом этого исследования [12].

Такая узость выбора испытуемых объектов генетиками первой половины XX в. понятна. Дрозофила рассматривалась как эталонный модельный объект, а в фундаментальных публикациях она фигурирует чуть ли ни как единственно возможный. Это объясняется тем, что до начала 50-х гг. классическая генетика не сформировала

представления о биохимических и молекулярно-генетических механизмах как мутагенеза, так и наследственности вообще, поскольку не имела представления о нуклеиновых кислотах как о единственном субстрате наследственности. Живой организм рассматривался не как модельный объект, а скорее как биологический детектор мутагенеза. При таких теоретических ограничениях фактическим объектом исследования генетиков становился сам мутаген. Не имея возможность исчерпывающе объяснить биологический механизм вызываемых мутаций, исследователи концентрировались на изучении природы мутагенного фактора. Это подталкивало ученых к унификации природы мутагенеза и эмпирическому выводу о химических мутагенах как примере «рентгеномиметизма» или «радиомиметизма» [5].

В качестве одного из слабых мутагенов рассматривалась даже сама дезоксирибонуклеиновая кислота, о чем неопровержимо свидетельствовали результаты ряда экспериментов. Впервые мутагенность ДНК обнаружил советский генетик С. М. Гершензон, продемонстрировавший, что при скармливании личинкам дрозофилы пищи, обогащенной ДНК, выделенной из тимуса теленка, количество мутаций увеличивается [2].

Но наиболее известная аналогичная работа – это эксперимента О. Эйвери, К. Маклеода и М. Маккарти 1944 г. по трансформации непатогенного штамма *Streptococcus pneumoniae* в патогенный с помощью «высокополимеризованной вязкой формы дезоксирибонуклеиновой кислоты» [4]. Знания о химических свойствах ДНК до начала 50-х гг. развивались без учета информационно-биологической функции этого субстрата. Главными методами выявления мутаций оставались приемы цитогенетики и изучение фенотипа мутанта, не способные значительно продвинуть методологическую базу мутагенеза.

Биологические модели после открытия роли ДНК

Ситуация с двусмысленностью наследственного субстрата разрешилась только с опубликованием результатов исторического для фундаментальной биологии эксперимента А. Херши и М. Чейз в 1952 г. Схема опыта заключалась в нагрузке бактериофага T2 радиоактивными изотопами фосфора P^{32} и серы S^{35} . При инфицировании меченым бактериофагом его естественного хозяина – кишечной палочки – с последующим центрифугированием, оказывалось, что ДНК, нагруженная фосфором P^{32} , целиком проникает в клетку и вызывает полноценную фаговую инфекцию, а изотоп серы S^{35} целиком уходит с белками опорожненной фаговой частицы и в дальнейшем с инфицируемой клеткой не контактирует [11].

С этого момента мутагены становятся средством экспериментального изучения тонкой

структуры гена, расшифровки генетического кода и инструментом изучения базовых биологических механизмов передачи и реализации наследственной информации. Химический мутагенез фактически превратился из эмпирического воздействия на наследственный материал в инструмент изучения молекулярной структуры и функции генома всех живых организмов. Сами же организмы из разряда биологических детекторов перешли в разряд истинных объектов исследования. В последующие 15 лет с момента опубликования статьи Херши и Чейза начинается лавинообразный рост публикаций об открытии фактов, способов, механизмов и методов исследования мутагенеза на самых различных биологических моделях. Наиболее популярными становятся: система прокариот-бактериофаг; высшие растения, прежде всего *Allium cepa*, *Vicia faba*; культуры клеток млекопитающих; дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (тетрадный анализ половых спор) [4].

Стандартные модели

Интенсивное внедрение в практику вновь синтезированных химических веществ потребовало применения стандартизованных моделей. До 1980-х гг. выбор биологических моделей по исследованию мутагенной активности ограничивался инициативой исследователя и не регулировался на государственном уровне. Наибольшего прогресса в развитии этого направления добиваются США, где в 1969 г. под руководством А. Холландера создано «Общество экологического мутагенеза» (<http://www.emgs-us.org>). В 1971 г. под редакцией Холландера издается первая часть сборника «Химический мутагенез: принципы и методы детекции» [9]. Это первый централизованный сборник методов, касающихся применения биологических моделей для выявления генотоксичности.

В сборнике приведены методики применения ставших классическими в наше время биологических моделей, в том числе и наиболее широко внедренный в современных лабораториях тест Эймса на реверсивные мутации бактерий *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* [9]. Однако в качестве перспективных моделей для изучения мутаций тонкой структуры гена сборник рекомендует и другие бактериальные модели: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Neisseria meningitidis*. Геномы этих бактерий к тому моменту были картированы с достаточной точностью и могли послужить приемлемыми моделями для исследования химического мутагенеза.

Не менее активно работа по внедрению стандартизованных моделей изучения химического мутагенеза в исследовательскую практику велась и в СССР. Исследования по генотоксичности осуществлялись «Секцией генетических аспектов проблемы «Человек и биосфера»», созданной

28 августа 1974 г. постановлением Государственного комитета Совета Министров СССР № 19. Секция занималась разработкой тест-систем для количественной оценки мутагенеза, издавала каталог химических мутагенов, оценивала прогностический эффект применения методик подтверждения генотоксичности. Для выявления точечных повреждений ДНК рекомендовался тест на реверсивные мутации в клетках энтеробактерий (тест Эймса). Для выявления хромосомных aberrаций рекомендовались тест-системы с применением клеток костного мозга млекопитающих либо культуры лейкоцитов человека [6].

В Европе обязанности регулирующего органа по генотоксической безопасности возложены на Организацию экономического сотрудничества и развития ОЭСР. Регулирование осуществляется путем принятия, пересмотра и обновления так называемого «Руководств по использованию тестов» (Test Guidelines OECD). Отдельного комитета в рамках ОЭСР, ответственного за принятие и пересмотр Руководств нет. Руководства обсуждаются, пересматриваются и принимаются посредством утверждения в рамках рабочих и экспертных групп.

В современной России наблюдается тенденция к созданию параллельных отраслевых сборников стандартов. В области испытания лекарственных веществ основным нормативным документом является «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8]. Главы с 1-й по 8-ю регламентируют лабораторные методы выявления у потенциальных лекарственных субстанций мутагенных, канцерогенных и генотоксических эффектов. Мутагенность рекомендуется выявлять в тесте Эймса, тестах на хромосомные aberrации и микроядра в клетках костного мозга млекопитающих либо по возникновению доминантных летальных мутаций в половых зародышевых клетках мышей или дрозофил. Способность непосредственно повреждать геном путем внесения разрывов в ДНК эффективно выявляется методом щелочных ДНК-комет вне зависимости от видовой принадлежности анализируемых клеток.

Для целей технического регулирования ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора подготовил для введения в действие серию межгосударственных стандартов, являющихся переводными аналогами Руководств ОЭСР [3].

Пожалуй, один из самых неоднозначных вопросов биологического моделирования генотоксичности, который до сих пор не решен на должном теоретическом и методическом уровнях, – это модель для тестирования мутагенности пищевых продуктов, содержащих ГМО. Выбор такой модели осложняется не только широким общественным резонансом, вызванным этой проблемой, но и тем, что пока не существует

объективного представления о механизме патогенного воздействия модифицированной ДНК высших животных или растений, принятой человеком *per os*. В связи с этим при разработке государственных нормативных документов, регламентирующих безопасность ГМО, придерживаются косвенных методов.

Согласно МУ 2.3.2 2306-07 «Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения», моделями для тестирования служат мыши инбредных линий: Вистар, СВА и С57В1/6, то есть тех же линий, которые используются в экспериментах по онкогенезу. Такой выбор модельного организма в отсутствие теоретической модели патогенетического воздействия ГМО на высших животных представляется слабо обоснованным.

Современный уровень развития биологического знания, прежде всего о тонкой структуре генома, предоставляет исследователю практически неограниченный выбор биологических моделей для изучения химического мутагенеза на современном уровне. Модель подбирается в зависимости от состава пробы, генетического механизма мутации, статистических требований к массиву первичных данных, затрат времени и др. Свойства объектов могут варьировать вплоть до применения моделей с уникальными параметрами: от использования в тесте Эймса на мутагенность морской воды *Vibrio harveyi*, который лучше энтеробактерий переносит соленость среды [10] до простейших демонстрационных опытов для студентов на одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* из-за наглядности мутаций утраты хлорофилла [7].

В генетической токсикологии правильно выбранный объект, соответствующий схеме эксперимента, может стать биологическим детектором мутагенеза с достаточно высоким прогностическим потенциалом.

Если в области поиска эффективных лекарств исследователь сначала моделирует молекулу *in silico*, имея возможность манипулировать потенциальной биологической активностью вещества без особых затрат [1], то на следующем этапе при тестировании потенциальной токсичности, затратность резко возрастает. Фармакологу необходимо подтвердить безопасность вещества по каждому виду токсичности, для чего применяются целые батареи тестов по каждому виду потенциальных рисков.

Правильно выбранный модельный организм, способный стать эффективным биологическим детектором выявления генной и других видов токсичности, представляет собой перспективу оптимизации времени и затрат доклинического этапа испытаний лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев П. М., Спасов А. А. Применение компьютерной информационной технологии для прогноза фармакологической активности структурно разнородных химических соединений // Вестник ВолгГМУ. – 2005. – № 1. – С. 23–30.
2. Гершензон С. М. Вызывание направленных мутаций у *Drosophila melanogaster* // Доклады АН СССР. – 1939. – Т. 25, № 3. – С. 224–227.
3. ГОСТ 32648-2014. Методические испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Токсикология генетическая: Метод оценки сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций у *Drosophila melanogaster*. – Введ. 2015–06–01 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://standartgost.ru/en/209787>.
4. Инге-Вечтомов С. Г. Ретроспектива генетики (курс лекций). – СПб.: Изд-во Н-Л, 2015. – 336 с.
5. Иосиф Абрамович Рапопорт / Сост. О. Г. Стрелева. – М.: Наука, 2003. – 335 с.
6. Пашин Ю. В. Тест-система для оценки способности индуцировать генные мутации у млекопитающих / Ю. В. Пашин. – М., 1977. – 17 с.
7. Прохорова И. М. Генетическая токсикология: лабораторный практикум / И. М. Прохорова, М. И. Ковалева, А. Н. Фомичева. – Ярославль: ЯрГУ, 2005. – 140 с.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
9. Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection Vol. 1 / Ed. A. Hollaender. – New York: Plenum, 1971. – 310 p.
10. Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments / A. Czyż, et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66 (2). – P. 599–605.
11. Hershey A. D., Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage // J. Gen. Physiol. – 1952. – Vol. 36. – P. 39–56.
12. McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1950. – Vol. 36 (6). – P. 344–355.
13. Muller H. J. Artificial transmutation of the gene // Science. – 1927. – Vol. 46. – P. 84–87.