

АНАЛИЗ МУТАНТНЫХ БАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ БИОТЕСТИРОВАНИИ ГЕНОТОКСИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Н. В. Гриц, Н. А. Белясова, О. А. Мороз

*Белорусский государственный технологический университет,
г. Минск, Беларусь*

Для выявления генотоксичных соединений, количество которых постоянно возрастает в окружающей среде благодаря неумелой хозяйственной деятельности человека, можно использовать биологические тест-системы. Это наиболее простой, дешевый и доступный способ анализа новых веществ, а также содержащих их объектов, на мутагенную и канцерогенную активность [1]. Особое место в методах биотестирования занимает бактерии, которые, как известно, легко культивируются, характеризуются высокой скоростью роста, достаточно просты в отношении генетического анализа.

Существующие бактериальные тест-системы не могут претендовать на абсолютную надежность по отношению к широкому кругу генотоксичных соединений, они лишь дополняют друг друга [2], что предопределяет необходимость их совершенствования. Так, например, две тест-системы, включающие зависимые по гистидину и по триптофану штаммы *E. coli*, а также совмещающие затрагивающие репарацию мутации, перекрывались только на 71 % (57 положительных и 37 отрицательных оценок), а в значительной части предпочтительнее оказывался либо один, либо другой способ [3].

Целью настоящего исследования являлся анализ ауксотрофных мутантов *E. coli* HfrH с целью отбора штаммов, пригодных для биотестирования генотоксичных соединений.

Объектом исследования служили бактерии *E. coli* HfrH В1, у которых под воздействием двух мутагенных факторов – N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (НТГ) и ультрафиолета (УФ) – были индуцированы биохимические мутации. Отобрано 85 мутантных бактерий, утративших способность синтезировать определенные факторы роста (ауксотрофность) и свойство сбраживать лактозу.

Первичный анализ этой группы мутантов показал, что только 62 из них характеризуются полнотой генетического блока и не образуют «подрост» на синтетических средах с очищенным агаром – весьма важное условие использования этих бактерий в биотестировании.

Другим обязательным свойством мутантных бактерий, пригодных для биотестирования генотоксичных веществ, является генетическая стабильность мутаций, которую можно оценить по частоте спонтанных реверсий к прототрофности. Этот параметр можно определить, выявив питательные потребности ауксотрофных мутантов. Ауксанографический метод [4] и тесты на реверсии позволили отобрать из 62 мутантных бактерий 29 штаммов, чьи клетки наследовали, кроме зависимости по триамину, одиночные идентифицированные мутации, эффективность реверсий которых к прототрофности не превышала 10^{-8} .

В бактериальной тест-системе, используемой для определения потенциальной канцерогенной и мутагенной активности веществ (между этими активностями существует тесная корреляция [5]) могут использоваться только точковые мутации. Отличить точковые мутации от делеций или других типов мутаций можно по их способности ревертировать под действием нескольких мутагенов, отличающихся по механизму действия от тех, с чьей помощью были индуцированы прямые мутации. Для анализа этого свойства у идентифицированных мутантов, характеризующихся низкой частотой спонтанных реверсий, индуцировали обратные мутации воздействием ультрафиолета (100 с, 40 см от объекта) и нитрозогуанидина (спот-тест с нанесением на фильтр 50 мкл раствора НГ с концентрацией 1 мг/мл). Из 29-ти проверенных мутантных штаммов выявлено только 7, чьи клетки были способны к реверсиям под действием обоих мутагенов (табл. 1).

Таблица 1

Свойства мутантов *E. coli* HfrH, наследующих точковые мутации

Мутант	Фенотип	Индущирующий фактор	Частота спонтанной реверсии
УЛ2	<i>Lac</i> ⁻	УФ	$1,6 \times 10^{-8}$
H10	<i>Thy</i> ⁻	НГ	$7,2 \times 10^{-8}$
H32	<i>Pro</i> ⁻	НГ	$6,3 \times 10^{-8}$
H48	<i>Pro</i> ⁻	НГ	$5,5 \times 10^{-8}$
H49	<i>Leu</i> ⁻	НГ	$1,2 \times 10^{-8}$
H59	<i>Cys</i> ⁻	НГ	$8,5 \times 10^{-9}$
H60	<i>Pan</i> ⁻	НГ	$3,4 \times 10^{-8}$
НЛ1	<i>Lac</i> ⁻	НГ	$7,6 \times 10^{-9}$

Точковые мутации могут быть представлены транзициями, трансверсиями, выпадением или вставкой одной пары нуклеотидов. Для определения того, какой именно тип мутации наследует каждый из отобранных штаммов, а также для отбора наиболее универсальных мутантных бактерий (должны обладать способностью ревертировать под действием

как можно большего числа мутагенных факторов) осуществляли индукцию обратных мутаций у отобранных бактерий дополнительно такими веществами, как этилметансульфонат (ЭМС), акридиновый оранжевый (АО) и бромистый этидий (БЭ). Исследование проводили с использованием спот-тестов, где на бумажные фильтры, размещенные на свежесезонных газонах бактерий, наносили по 50 мкл растворов: АО – 1 мг/мл; БЭ – 0,5 мг/мл; ЭМС – неразведенный.

Приведенные в табл. 2 данные позволяют судить о характере мутаций в клетках штаммов Н32 и Н49, которые представляют собой, очевидно, транзиции, поскольку ревертируют к прототрофности под действием только тех мутагенов, которые, преимущественно, обуславливают этот тип мутаций. Можно также предположить, что мутации в бактериях УЛ2 и Н10 являются результатом сдвига рамки считывания, т. к. акридиновый оранжевый и бромистый этидий вызывают, в основном, именно такие нарушения в ДНК. В то же время, этилметансульфонат, который специфичен в отношении транзиций, не индуцирует обратных мутаций у бактерий названных штаммов.

Таблица 2

Способность мутагных бактерий к индуцированным реверсиям

Мутант	Способность к реверсиям под действием:				
	УФ	НГ	ЭМС	АО	БЭ
УЛ2	+	+	-	+	+
Н10	+	+	-	+	+
Н32	+	+	+	-	-
Н48	+	+	-	-	-
Н49	+	+	+	-	-
Н59	+	+	+	+	+
Н60	+	+	+	+	-
НЛ1	+	+	+	-	+

(+) Способность к реверсии.

(-) Отсутствие способности к реверсии.

Обращает на себя внимание мутантный штамм Н59 (*Cys⁻*), клетки которого ревертируют к прототрофности на синтетической среде без цистеина под действием любого из испытанных мутагенных факторов. Это обстоятельство, а также низкая частота спонтанных реверсий делает его удобным для биотестирования широкого круга генотоксичных соединений.

Мутагенная активность веществ может быть оценена по частоте индукции мутаций к прототрофности у ауксотрофных мутантов. При этом чувствительность метода зависит от способа нанесения потенциального мутагена на газон бактериальной культуры, поскольку в каждом случае будет исследована разная концентрация вещества. Кроме того, как известно, на эффективность мутагенеза оказывает влияние и длительность воздействия мутагена на клетки. Чтобы учесть все названные факторы предложено и апробировано несколько способов оценки мутагенной активности N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина на бактерии *E. coli* HfrH H59 *Cys*⁻:

1. На «газон» бактерий в поздней логарифмической фазе роста на плотной синтетической среде с лактозой наносили фильтр (диаметром 0,6 см), смоченный в водном растворе НГ (200 мкг/мл).

2. На «газон» бактерий в поздней логарифмической фазе роста на плотной синтетической среде с лактозой наносили стеклянный цилиндр (внутренний диаметр 0,5 см), в который помещали 0,1 мл водного раствора НГ (200 мкг/мл).

3. На «газон» бактерий в поздней логарифмической фазе роста на плотной синтетической среде с лактозой наносили кристаллик НГ (массой ~2 мг).

4. В 3 мл полужидкой (0,7 % агар-агара) синтетической среды, расплавленной и остуженной до 45 °С, внесли 0,1 мл водного раствора НГ (3 мг/мл) и 0,2 мл бактерий в поздней логарифмической фазе роста (~5×10⁸ кл./мл). Смесь быстро перемешивали круговыми движениями и выливали на «нижний» слой (плотная среда МА).

5. Бактерии в поздней логарифмической фазе роста отмывали от бульона жидкой синтетической средой, получая 0,2 мл суспензии с концентрацией клеток ~5×10⁸ кл./мл. Добавляли к суспензии равный объем раствора НГ в жидкой среде (100 мкг/мл). Инкубировали смесь 30 мин при 30 °С, после чего вносили в расплавленный «верхний» агар, как в пункте 4.

6. Осуществляли все манипуляции, как в пункте 5, за исключением режима преинкубации, которую проводили при 37 °С в течение 20 мин.

Все посеы инкубировали в течение 48 ч при 37 °С, после чего учитывали плотность кольца (интенсивность роста клеток в нем) в методах 1–3 или подсчитывали количество колоний, образованных бактериями-ревертантами (*Cys*⁺) в методах 4–6. Наиболее результативными оказались методы № 2 и № 5: в первом случае образовывалось наиболее плотное кольцо ревертантов вокруг цилиндра с раствором НГ, а во

втором случае на поверхности среды в чашке Петри формировалось от 15 до 24 колоний ревертантов, что соответствует эффективности реверсии 10^{-4} .

1. Христова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. М.: Наука, 1989.
2. De Flora S., Zanacchi P., Camoirano A. et al. // *Mutat. Res.* 1984. V. 133. P. 161–198.
3. Чернин Л.С. Плазмидный контроль метаболизма хромосомной ДНК у бактерий // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Микробиология. 1985. Т. 15. С. 150–254.
4. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1984. Т. 2.
5. Ames B.N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer // *Science.* 1979. V. 204. P. 587–593.

ВЛИЯНИЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ НА ИЗОПРОТЕРЕНОЛ-СТИМУЛИРОВАННУЮ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ

О. И. Губич, Т. А. Желдакова¹, М. В. Шолух

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

¹⁾*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь*

Одним из важнейших аспектов интегрального функционирования эндокринной системы является наличие молекулярных механизмов сопряжения сигнальных систем, обеспечивающих реализацию физиолого-биохимических эффектов гормонов и нейромедиаторов. Так, экспериментально установлена избирательная взаимосвязь между эффектами глюкагона и аденозина на аккумуляцию цАМФ в гепатоцитах крысы [1], модуляция высвобождения норадреналина из симпатических окончаний легочной артерии человека агонистами EP₃- и DP-простагландиновых рецепторов [2], ингибирование простагландином E₂ индуцированного глюкагоном синтеза фосфоенолпируваткарбоксихиназы в культуре гепатоцитов крысы [3], взаимопротивоположное действие простагландинов группы E и простаглицлинов на процесс агрегации тромбоцитов мыши [4]. Современный этап исследования данной проблемы характеризуется смещением акцентов в сторону изучения процессов сопряжения сигнальных систем простагландинов и катехоламинов.

Известно, что симпато-адреналовая система является важнейшим регулятором активности сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной