

ЭКОЛОГИЯ**БИОТЕСТИРОВАНИЕ МУТАГЕННЫХ КСЕНОБИОТИКОВ
В ТКАНЯХ БАЙКАЛЬКОЙ НЕРПЫ****Витал Траоре¹, Л.И. Степанова², С.В. Котелевцев²,
О.В. Полякова³, Ю.П. Козлов¹***¹Экологический факультет, Российский университет дружбы народов,
Подольское шоссе, 8/5, 113093, Москва, Россия**²Биологический факультет, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы, 119899, Москва, Россия**³Химический факультет, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы, 119899, Москва, Россия*

Мутагенные ксенобиотики были найдены в тканях нерп из озера Байкал. Мутагенные соединения чаще регистрировались в печени, чем в жире нерпы.

Ежегодно синтезируется большое количество новых химических веществ, не встречающихся в природе. Их называют ксенобиотиками. Эти поллютанты представляют особую опасность для живых организмов, так как долго сохраняются в природе, практически не разлагаясь [1]. Попадая в организм, ксенобиотики в результате монооксигеназного окисления и взаимодействия с ДНК могут проявить канцерогенное, мутагенное, тератогенное действие [2, 3]. Ксенобиотики не вступают ни в пластический, ни в энергетический обмен. Среди процессов биотического распада особое значение имеют реакции окисления и восстановления, ведущие к образованию соединений с повышенной растворимостью в воде, т.е. гидрофильных метаболитов, которые легко выводятся из организма. Таким образом возможно освобождение организма от ядовитых веществ, даже если их метаболиты остаются токсичными [4].

Мутагенные ксенобиотики способны вызывать биологический эффект даже при малой концентрации. Среди них особую опасность представляют полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и хлорированные органические соединения (ХОС). Они являются гидрофобными веществами и обладают большим периодом полураспада и выведения из организма. Передаваясь по пищевым цепям от одних организмов к другим, такие ксенобиотики способны постепенно накапливаться в тканях животных.

За последнее десятилетие, наблюдая за состоянием озера Байкал, исследователи пришли к выводу, что его экосистема ежегодно ухудшается [5, 6], главным образом, в результате поступления различных веществ от байкальского целлюлозно-бумажного комбината. В озере Байкал, как и в других водных экосистемах, обнаруживаются также некоторые хлорорганические пестициды [1, 7, 8], в частности ДДТ, который уже давно (с 1971 г.) запрещен для использования в сельском хозяйстве. Основными загрязняющими органическими веществами в озере Байкал являются персистентные хлорсодержащие органические соединения (ХОС), ПХБ, ДДТ и его метаболиты ДДЕ, ДДД, а также ПАУ [7, 8].

Целью нашей работы являлось изучение накопления мутагенных ксенобиотиков в тканях (подкожном жире и печени) нерпы (*Phoca sibirica*), представляющей собой вершину пищевой цепи в озере Байкал.

Материалы и методы. Пробы биологического материала, собранные на озере Байкал в 1996-1997 гг., были предоставлены нам сотрудниками Института экологической токсикологии им. А.М. Бейма г. Байкальска. Пробы доставлялись в Москву в замороженном состоянии.

Содержание мутагенных ксенобиотиков в экстрактах из подкожного жира и печени нерп оценивали с помощью теста Эймса (сальмонелла + фракция S9 печени крыс) [9].

Подготовка S9 фракции. Индукцию синтеза микросомных ферментов печени у самцов белых беспородных крыс производили внутрибрюшинной инъекцией 0,5 мл раствора Arochlor 1254 в оливковом масле из расчета 100 мг на 1 кг массы животного. Через 48 часов крыс, получавших все это время только воду, декапитуировали. Печень извлекали, взвешивали, промывали стерильным раствором 0,1 М КСl, измельчали и гомогенизировали в 5 объемах 0,1 М КСl, содержащего 1 мкМ ионола (для предотвращения перекисного окисления липидов) и 1 мг БСА (бычьего сывороточного альбумина) (фракция IV — для связывания свободных жирных кислот). Все операции проводили на холоду. Гомогенат центрифугировали при 9000 g в течение 30 мин. Полученную надосадочную жидкость (S9 фракция) разливали аликвотами по 1-2 мл в пластмассовые пробирки, после чего либо сразу использовали в опыте, либо быстро замораживали на сухом льду и хранили при -70°C на протяжении 3-4 мес. до использования. В приготовленной таким образом фракции S9 концентрация белка составляла около 40 мг/мл.

Подготовка бактериальной культуры. Клетки тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* культивировали в бульоне Oxoid (2,5%) в течение суток, отделяли от среды центрифугированием и разводили в физиологическом растворе до концентрации 5 000 000 клеток/мл.

Постановка теста Эймса. В пробирки с жидким агаром верхнего слоя ($T = 45^{\circ}\text{C}$) добавляли 0,1 мл проинкубированной в течение ночи в бульоне Oxoid культуры штамма *Salmonella typhimurium* TA-98 или TA-100. К этим компонентам добавляли 200 мкл испытуемого образца и при необходимости 0,5 мл S9 фракции. Смесь сразу же перемешивали и выливали на поверхность находящегося в чашке агара с глюкозой. Покачивая осторожно чашку, равномерно распределяли верхний слой агара. После застывания агара, чашку переворачивали вверх дном и инкубировали в темноте при 37°C . В эксперименте помимо опытных вариантов ставили контрольные, содержащие либо только культуру бактерий с растворителем (ДМСО) в присутствии (+МА) или в отсутствии S9 фракции (-МА), либо бактерии с известными мутагенами и промутагенами в присутствии или в отсутствии S9 фракции.

Через 2 дня подсчитывали колонии гистидиновых ревертантов сальмонеллы в разных вариантах опыта. Для удобства интерпретации результатов эксперимента данные по подсчету колоний представляли в виде мутагенного индекса, отражающего отношение числа колоний his^{+} -ревертантов в опыте (тестирование стандартных мутагенов и промутагенов) к контролю (растворитель ДМСО). Проводили по два анализа каждого образца и рассчитывали среднюю величину мутагенного индекса. Разброс результатов во всех случаях не превышал 15%.

Увеличенное по сравнению с контролем число колоний his^{+} -ревертантов сальмонеллы свидетельствует о наличии мутагенного эффекта. Если значение

отношения приближается к 2 (1,7-2,0), то мутагенный эффект считается слабо положительным. В случае превышения отношения опыта к контролю в 10 раз имеется мутагенный эффект средней выраженности и при увеличении в 100 раз и более — сильный мутагенный эффект. В каждом опыте было не менее 3 повторностей. Достоверность результатов оценивали с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования выявили наличие в экстрактах из тканей нерпы как прямых мутагенных, так и промутагенных соединения (см. табл.).

Т а б л и ц а
Мутагенный индекс (в тесте Эймса) образцов подкожного жира и печени байкальских нерп

Образцы		Подкожный жир				Печень			
		Штамм сальмонеллы				Штамм сальмонеллы			
		ТА-98		ТА-100		ТА-98		ТА-100	
№	Пол и возраст нерпы	+МА	-МА	+МА	-МА	+МА	-МА	+МА	-МА
1	♀, 3 мес.	1,3	1,2	1,1	1,0	2,3	1,4	1,0	1,2
2	♀, 3 мес.	2,2	2,0	1,1	1,0	2,2	1,9	1,2	—
3	♀, 3 мес.	2,0	0,9	1,1	0,5	2,6	5,2	2,1	1,2
4	♀, 1 год	1,3	1,1	1,0	0,9	2,0	—	1,0	0,9
5	♀, 1 год	2,4	2,9	0,7	0,9	2,4	—	1,0	—
6	♀, 2 года	1,5	1,1	0,9	0,9	3,3	4,1	1,4	1,3
7	♀, 2 года	2,2	2,1	1,1	0,8	2,1	1,0	0,9	1,4
8	♀, 3 года	2,1	3,3	2,9	1,3	—	—	—	—
9	♂, 5 лет	1,1	1,0	0,9	0,9	1,3	0,9	—	—
10	♂, 5 лет	1,7	1,8	1,2	1,0	2,2	1,1	1,1	0,9
11	♀, 7 лет	1,9	1,3	1,0	1,2	1,4	1,8	1,9	1,2
12	♂, 9 лет	1,5	1,3	1,0	1,2	0,9	—	0,9	—
13	♂, 10 лет	1,4	0,9	0,9	0,9	0,8	1,1	1,0	1,9
14	♂, 16 лет	3,0	5,4	3,5	1,9	—	—	—	—

Из представленных результатов видно, что мутагенный эффект проявлялся обычно только на штамме ТА-98, учитывающем мутацию типа сдвига рамки считывания. Для большинства образцов тканевых экстрактов было характерно снижение мутагенного эффекта в присутствии фракции S9. Это означает, что в присутствии фракции S9 происходит детоксикация имеющихся в тканевых экстрактах ксенобиотиков. Однако для некоторых образцов тканевых экстрактов в присутствии фракции S9 наблюдалось увеличение мутагенного индекса, т.е. происходила метаболическая активация мутагенных ксенобиотиков. По-видимому, это зависит от природы имеющихся в экстрактах ксенобиотиков. В экстрактах печени нерпы мутагенные соединения проявлялись несколько чаще, чем в подкожном жире. Корреляции между мутагенным индексом, с одной стороны, и полом или возрастом животных, с другой стороны, не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никаноров А.М., Хоружая Т.А. Экология. — М.: ПРИОР, 1999.
2. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. — М.: Наука, 1975.
3. Абилов С.К. Метаболическая активация мутагенов / Итоги науки и техники. Общая генетика. Химический канцерогенез. — М.: ВИНТИ, 1986.

4. Фелленберг Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию. — М.: Мир, 1997.
5. Stepanova L.L., Glaser V. M. et al. Accumulation of mutagen xenobiotics in Fresh water (Lake Baikal) and Marine (Hornoe Island) ecosystems // *Ecotoxicology*. — 1999. — Vol. 8. — №2. — P. 83-96.
6. Kotelevtsev S.V. et al. Mutagenicity of bleached and unbleached effluents from baikalsk pulp and paper mill at Lake Baikal, Russia // *Aquatic Ecosystem Health and Management*. — 2000. — №2. — P. 95-104.
7. Polikova O.V., Lebedev A.T. et al. Accumulation of the persistent organic pollutants in the food chain of the Lake Baikal / *Water Pollution. V. Modeling, Measuring and Prediction*. Ed. by P. Anagnostopoulos and C.A. Brebbia. WIT Press, 1999. — P. 419-426.
8. Polikova O.V., Lebedev A.T. et al. Accumulation of persistent organic pollutants in the food chain of Lake Baikal // *Toxicological and Environmental Chemistry*. — 2000. — Vol. 75. — №3-4. — P. 320-334.
9. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella: mammalian microsomes mutagenicity test // *Mutat. Res.* — 1975. — Vol. 31. P. 101-105.

BIO-TESTING OF MUTAGENIC XENOBIOTICS IN TISSUES OF BAIKAL SEALS

Vital Traore¹, L.I.Stepanova², S.V.Kotelevtsev², O.V.Poliakova³,
Yu.P.Kozlov¹

¹*Ecological Faculty, Peoples' Friendship Russian University,
Podolskoye shosse, 8/5, 113093, Moscow, Russia*

²*Biological Faculty, Moscow State University, Vorobjevy Gory, 119899, Moscow, Russia*

³*Chemical Faculty, Moscow State University, Vorobjevy Gory, 119899, Moscow, Russia*

Mutagenic xenobiotics were found by Ames test in extracts from subcutaneous fat and liver of Baikal seals. Mutagenic xenobiotics were found in liver more often than in subcutaneous fat.
