ности отхода и в основном не зависит от содержания в отходе других компонентов.

Таким образом, предложены методические подходы по проведению исследований отходов для целей экологического нормирования процесса детоксикации люизита и его двойных и тройных смесей. Установлен перечень физико-химических и химических показателей, разработаны и апробированы соответствующие методики определения, что позволяет рекомендовать их для применения в системах технологического и экологического контроля на объектах УХО.

Литература

1. Приказ Федеральной службы по экологическому, технологическому и атомному надзору от 19.10.2007 г. № 703 «Об утверждении методических указаний по разработке проектов нормативов образования отходов и лимитов на их размещение».

2. Приказ МПР России от 15.06.01 № 511 «Об утверждении Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей среды».

3. Мачилз Дж.Б.Х. Верлан Б.Л., Даз А., Медема Я. Уничтожение люизита (сравнение трёх методов) // Росс. хим.журн. 1995. Т. 39. № 4. С. 37-42.

4. Франке З. Химия отравляющих веществ. М.: Химия, 1973. Т. 1. 438 с.

5. Петрунин В.А., Баранов Ю.И., Кузнецов Б.А., Русанов В.М. Горский В.Г., Швыряев Б.В., Смирягина Т.Г., Сохадзе Л.А., Привезенцев Ю.В., Гореленко С.В. Математическое моделирование процесса щелочного гидролиза люизита // Росс. хим. журн. 1995. Т. 39. № 4. С.15-17.

6. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества. М.: Военное издательство, 1990.

7. Умяров И.А., Кузнецов Б.А., Кротович И.Н., Холстов В.И., Соловьев В.К. Методы уничтожения и утилизации запасов люизита и иприта // Росс. хим. журн. 1993. Т. 37. № 3. С. 25.

8. Фёдоров В.А., Ефремов А.А., Гринберг Е.Е., Жуков Э.Г., Баранов Ю.И., Кузнецов Б.А., Потепалов В.П., Холстов В.И. Проблемы получения мышьяка и его соединений особой чистоты на основе люизита // Росс. хим. журн. 1994. Т. 38. № 2. С. 25.

9. Луганский И.Н., Папкова О.А., Чеботаев В.В., Холодова В.А., Шелученко В.В. Уничтожение люизита с использованием методов полимеризации. // Росс. хим. журн., 1994. Т. 38. № 2. С. 36-39.

10. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров, 2002. 543 с.

УДК 631.466.3

Применение в экологических исследованиях методов биотестирования на культурах клеток человека и животных

© 2008. В.Н. Чупис, Л.Л. Журавлева, Д.Е. Иванов
Научно-исследовательский институт промышленной экологии,
e-mail: ecovector@sar-ecoinst.org

В статье рассмотрены возможности применения методов биотестирования на культурах клеток человека и животных при проведении экологического мониторинга, а также необходимое для этого лабораторное оборудование.

The article describes the opportunities of biotesting methods application on cell cultures of human beings and animals in the process of ecological monitoring. The labware necessary for it is presented.

Ключевые слова: биотестирование, культуры клеток, экологический контроль, токсикодинамика

Комплексное изучение состояния окружающей среды в районах расположения опасных промышленных предприятий включает использование методов биотестирования и биоиндикации. Как правило, проводится оценка состояния флоры и фауны наземных и водных биоценозов и токсичности проб воды и почвы в строго контролируемых условиях аккредитованных лабораторий биотестирования с помощью методик, допущенных для целей государственного экологического контроля.

Основные требования, предъявляемые к тест-системам, заключаются в следующем:

– повышенная чувствительность к воздействию загрязняющих веществ и возможность работы на уровне малых доз;
– быстрота и экономичность, воспроизводимость, т. е. возможность получения с помощью данной тест-системы результатов в пределах случайных ошибок другими специалистами аналогичного профиля;
– регистрация токсических эффектов не только самих веществ, но и их метаболитов.

В то же время тест-системы должны обеспечивать возможность экстраполяции полученных результатов от условий воздействия токсикантов in vitro на условия in vivo, от одних типов клеток на другие, особенно от соматических к зародышевым, поскольку мутации именно последних создают реальную опасность изменения наследственности, от одних биологических видов на другие, в том числе на человека, обладающего исключительно низкими возможностями генетической адаптации к воздействию мутагенов.

Ни один из взятых отдельно методов биотестирования не позволяет сделать достаточно обоснованное заключение о токсичности природных сред. В связи с этим возникает необходимость использования нескольких биологических объектов и методов, т. е. систем тестирования [1]. Такие системы включают ряд представителей различных систематических групп организмов, а также культуры клеток, что позволяет дать более точную качественную и количественную оценку токсичности воды, почвы и воздуха.

Клеточные культуры в системе биотестирования качества природных сред

В последние годы исследователи при изучении состояния природных сред всё чаще применяют методы биотестирования, в которых используются культуры клеток человека и животных. Подобный подход связан с необходимостью более глубокого изучения влияния антропогенных факторов на различные группы организмов и сложностями проведения исследований на животных тест-объектах. Главное преимущество культивируемых клеток – это возможность прижизненного наблюдения клеток. Существенно, что при работе с культурами клеток в эксперименте используются здоровые клетки и что они сохраняют жизнеспособность в течение всего эксперимента.

Клетки, выращенные in vitro, сохраняют многие черты метаболизма исходных тканей хозяина и в то же время лишены тканевых и органных взаимосвязей, регуляторных влияний нервной и эндокринной систем, обладают весьма ограниченными компенсаторными возможностями. Эти особенности культур клеток дают возможность исследовать взаимодействие химических агентов с клеткой в «чистом виде», выявить изменения клеточных и субклеточных структур, которые в условиях целостного организма могут маскироваться или видоизменяться указанными выше компенсаторными и регуляторными механизмами на ранних этапах развития токсического процесса или при действии низких концентраций химических агентов.

Однако клеточные тест-системы имеют ряд ограничений, обусловленных самой природой метода. Так, в исследованиях на культурах клеток не могут быть учтены такие важные с общетоксикологических позиций моменты, как путь поступления химического агента в организм, его распределение, выведение и другие вопросы токсикодинамики. Как и при применении других модельных тест-систем, экстраполяция полученных результатов на целостный организм требует большой осторожности, особенно когда речь идёт о количественных показателях [2].

Метод биотестирования с использованием клеточных культур может заменить опыты на лабораторных животных по следующим причинам:

1. Дешевизна и доступность используемого материала (для выращивания клеточной культуры достаточно изъять клетки органов у 1 – 2 животных и полученные клеточные линии могут использоваться в течение длительного периода.

2. Возможность быстрого получения результатов и прижизненного наблюдения за моделью в течение всего эксперимента.

3. Высокая корреляция результатов in vitro и in vivo.

4. Полученные клеточные линии сохраняют высокую видовую специфичность [3].

Кроме того, при исследованиях на клеточных культурах возможно использование радиоактивных изотопов для изучения биосинтеза белка и ДНК [4].

Перечень типов клеток, которые в настоящее время можно культивировать, достаточно

велик. Это элементы соединительной ткани (фибробласты), скелетные ткани (кость, хрящи), скелетные, сердечная и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, лёгкие, молочная железа, кожа, мочевой пузырь, почки), клетки нервной системы (глиальные клетки и нейроны, хотя последние лишены способности к пролиферации), эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса), меланоциты и различные типы опухолевых клеток.

В научных исследованиях часто используются различные линии мышиных эмбриональных фибробластов, гетероплоидные клетки глиобластомы человека (GL-6), диплоидные эмбриональные клетки человека. Типичные диплоидные клетки человека включают: клеточный штамм MRC-5 (ATCC, CCL 171), клеточный штамм WI-38 (ATCC, CCL 75) и клеточный штамм HEL 299 (ATCC, CCL 137), лимфобластоиды человека IM-9 (ATCC, CCL 159), штамм диплоидных клеток фибробластов лёгких эмбриона человека LBHEL (КСТС 0127 ВР).

Клетки мезодермального происхождения (фибробласты, клетки эндотелия, миобласты) легче культивировать, чем эпителиальные клетки, нейроны и клетки эндокринных тканей.

Культуры, полученные из эмбриональных тканей, как правило, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с культурами из соответствующих «взрослых» тканей. Это отражает, по-видимому, более низкий уровень специализации и наличие реплицирующихся клеток-предшественников или стволовых клеток в эмбрионах. «Взрослые» ткани, как правило, характеризуются пониженным пролиферативным пулом и более высоким содержанием неделящихся специализированных клеток, часто ассоциированных с более структурированным и слабо дезагрегирующим внеклеточным матриксом. Получение первичных культур клеток «взрослых» тканей и их размножение являются более сложной задачей, и продолжительность жизни таких культур, как правило, невелика.

Для экотоксикологических исследований перспективно использовать культуру диплоидных эмбриональных клеток человека [5]. Преимущества диплоидных эмбриональных клеток человека перед остальными культурами клеток следующие:

1. Высокая чувствительность к минимальным концентрациям любых субстанций и достаточная стабильность биологических свойств.

2. Генетическая однородность и сохранность свойств донора на протяжении 45 – 50 пассажей.

3. Абсолютная воспроизводимость результатов.

4. Отсутствие зависимости от человека донора для первичных клеток лимфоцитов и фибробластов.

5. Возможность моделирования, изучения и прогнозирования летальной, сублетальной и скрытой формы поражения клеток.

6. Возможность продолжительных наблюдений за поврежденными клетками.

Культуры клеток человека и животных как тест-объекты для исследования потенциальной токсичности и мутагенной активности промышленных загрязнителей широко используются в экотоксикологических исследованиях [6 – 11].

Оборудование и среды для работы с культурами клеток

Технические средства, предназначенные для лаборатории культуры клеток, должны образовывать определённую систему. При подборе оборудования полезно составлять так называемые номенклатурные перечни. При этом все технические средства группируют по их месту в процессе работ с клеточными культурами:

1) приборы и устройства, обеспечивающие работу с клеточными культурами;
2) приборы и устройства для культивирования клеток;
3) микроскопы;
4) устройства для криоконсервации и хранения клеточных культур [12].

Для получения сверхчистой и общелабораторной воды, используемой для приготовления питательных сред, мытья посуды, предназначенной для выращивания культур тканей и других целей, применяют установки ОВ-1, ОВ-2, ОВ-3. Установка ОВ-1 представляет собой последовательно соединённые установки ОВ-2 и ОВ-3. В практике работ с клеточными культурами часто возникает необходимость в массовом дозировании, отборе проб или разведении биологически активных жидкостей. Величина единичной дозы в большинстве случаев находится в диапазоне от 1 мкл до 10 мл. Жёсткие требования

предъявляют также к точности и воспроизводимости разовой дозы. Значительно облегчает проведение этой технологической операции использование автоматических или полуавтоматических устройств, которые в разных источниках называют дозаторами-дилюторами, автоматическими пипетками и т. п. Сменные наконечники можно подвергнуть паровой стерилизации и повторно использовать. За рубежом широко применяют устройства, относящиеся к малой лабораторной технике, не являющиеся по своей сути дозаторами, но значительно облегчающие этот процесс и делающие его более безопасным для оператора. Речь идёт о так называемых приборах «Piped-Aid»; которые предназначены для отбора проб и выдачи дозы при работе с пастеровскими пипетками и любыми градуированными пипетками ёмкостью до 75 мл. Пипетку вставляют в специальный держатель, соединённый с малогабаритным вакуумным насосом. Отбор проб и дозирование проводят путём создания вакуума или избыточного давления в пипетке. Оператор управляет работой прибора с помощью кнопок, размещённых на держателе. Скорость набора и выдачи дозы регулируют с помощью установки производительности насоса или силой нажатия соответствующих кнопок управления. В данных приборах предусмотрена защита от попадания дозируемой жидкости в прибор, а также имеются воздушные фильтры, исключающие загрязнение дозируемой жидкости при выдаче дозы.

Для выращивания клеточных культур, как правило, применяют следующие питательные среды: среда 199, Игла МЕМ и Игла в модификации Дульбекко с добавлением 10 – 15% эмбриональной сыворотки плодов коровы. Для культивирования лимфобластоидной клеточной линии IM-9 используется среда MDM (Sigma, USA). В состав среды входят необходимые добавки: 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-глютамина, 0,1% антибиотиков (пенициллин-стрептомициновый комплекс). Диплоидны с эмбриональные клетки человека культивируют в виде монослоя в плоских флаконах.

Одним из основных требований к жидким питательным средам для клеточных культур является их стерильность, достигаемая, в частности, с помощью так называемой стерилизующей фильтрации, освобождающей питательные среды от примесей, бактерий и коллоидов. Различают микро- и ультрафильтрацию сред. При микрофильтрации из жидкости удаляют частицы примесей и бактерии размером от 0,25 до 10 мкм. Ультрафильтрация позволяет извлечь из раствора очень мелкие частицы и коллоиды, а также молекулы растворённых веществ с молекулярной массой от 1000 до 1000000. Мембранные фильтры, пригодные для очистки питательных сред, производят ряд фирм. Наиболее широкое применение в практике нашли миллипоровые фильтры. Размеры мембранных фильтров (13, 25, 47, 90, 142 и 293 мм) стали в какой-то мере стандартными. Для фильтрации средних по объему количеств питательных сред (25 –50 л) наиболее удобны установки с мембранными фильтрами диаметром 90 и 142 мм. В общем случае установка для стерилизующей фильтрации состоит из системы, предназначенной для создания избыточного давления на фильтруемую жидкость, стерилизуемого держателя фильтра, фильтрующей мембраны, трубопроводов и сосудов для размещения фильтруемой жидкости и фильтрата. При подборе и расчёте фильтрующей системы рекомендуется предварительно сформулировать задачу (вид среды, подлежащей фильтрации, её температура, вязкость, химический состав, размер частиц, подлежащих фильтрации, режим фильтрации – непрерывный или порционный и т. п.) и подобрать соответствующие мембрану и держатель, а также определить величину избыточного давления, необходимого для фильтрации.

Стерильность при работе с культурами клеток обычно обеспечивается путём проведения исследования в ламинарных боксах.

Для очистки клеток было разработано несколько подходов, в том числе высокоэффективная сортировка на основе мультипараметрического иммунофенотипирования или иммунофенотипирование в сочетании с функциональными тестами. Высокопроизводительный сортёр клеток MoFlo позволяет выделить необходимую популяцию клеток. Окрашеные клетки загружаются в MoFlo. При помощи программного обеспечения Summit, по отношению прямого и бокового рассеяния идентифицируется основная клеточная популяция. Затем по отношению синей и красной флуоресценции красителя Hoechst 33342 идентифицируется минорная популяция клеток. Очищенные клетки полностью сохраняют функциональные свойства, что делает возможным их долгосрочное культивирование.

Для подсчёта количества клеток часто используется электронный счётчик Коултера (Coulter counter Multisizer II).

Лабораторные термостаты для культивирования клеток должны отвечать определённым требованиям: обеспечивать высокую стабильность заданной температуры, создавать минимальный градиент температуры по полезному объёму, иметь систему быстрого восстановления температуры после кратковременного охлаждения. Внутренняя поверхность термостатов должна быть изготовлена из биологически пассивных материалов, т. е. не влияющих на жизнедеятельность клеток и стойких к воздействию компонентов питательных сред. Материалы, из которых изготавливают внутренние и наружные части термостата, и покрытия должны выдерживать деконтаминацию водными растворами спирта-ректификата и стерилизацию УФ-излучением. Современные модели этих приборов имеют полезный объём от 20 до 1400 л. Полезный объём образуется полированными пластинами из нержавеющей стали или меди (у дорогих моделей). Как правило, термостаты имеют наружную и внутреннюю двери. Последнюю изготавливают из прозрачного материала, что позволяет наблюдать за содержимым термостата без нарушения температурного режима. Многие модели подобных приборов имеют секционную внутреннюю дверь, обеспечивающую доступ в термостат с минимальным нарушением теплового режима в полезном объёме. Температуру в рабочей камере термостатов обычно можно задавать в диапазоне от превышающей комнатную на 5 ^{0}C до 80 ^{0}C. В некоторых моделях термостатов имеется встроенная холодильная установка, позволяющая задавать температуру в диапазоне от –10 до 80 ^{0}C и поддерживать её при помещении в полезный объём приборов, выделяющих дополнительное тепло, например, роллерных установок, встряхивателей и т. п.

В связи с необходимостью поддержания постоянного pH питательной среды и её минимального испарения в период инкубации клеток были созданы специальные приборы, предназначенные для этой цели, — так называемые углекислотные инкубаторы. По своей конструкции и основным параметрам они полностью соответствуют описанным выше термостатам. Основным отличием является наличие систем создания и поддержания определённого состава газовой среды в полезном объёме и высокой относительной влажности в нём. В газовой среде камер углекислотного инкубатора повышена концентрация кислорода и углекислого газа, в большинстве случаев только углекислого газа; концентрацию задают в зависимости от условий культивирования и поддерживают автоматически с точностью до ±0,1%. Современные модели этих приборов позволяют регулировать количество кислорода и углекислого газа в диапазоне от 1 до 95 об.%.

Для оперативного получения качественной информации о состоянии культивируемых клеток используют специальные инвертированные микроскопы. Принцип инвертированности (перевернутости) заключается в том, что объект наблюдения освещается сверху, а наблюдение ведётся через объективы, расположенные под объектом. Это позволяет наблюдать за живыми клетками в культуре, т. е. непосредственно в сосудах, где происходит процесс их роста. В микроскопах с обычной оптической схемой отсутствует возможность помещения культивационных сосудов между столиком и объективом из-за недостаточности этого расстояния [13].

В заключение следует отметить, что культуры клеток человека и животных при биотестировании необходимо использовать в составе системы тест-объектов, которые относятся к различным систематическим группам организмов. Только при этом условии применение культуры клеток человека и животных в качестве тест-объекта существенно повышает качество экотоксикологического анализа природных сред в зоне влияния опасных промышленных предприятий.

Литература

1. Чупис В.Н., Лущай Е.А., Ларин И.Н., Загреков А.А., Ильина Е.В., Иванов Д.Е. Система биотестов для экологического мониторинга // Экология и промышленность России. 2008. № 1. С. 44-45.

2. Рязанова Р.А., Елизарова О.Н., Василос А.Ф., Шройт И.Г., Дмитриенко В.Д. Применение метода клеточных культур для исследования биологического действия пестицидов (методические рекомендации) // Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды. М., 1999. С. 50-68.

3. Михайлова Л.П. Возможности и области применения метода биоиндикации на клеточных культурах человека и животных http://www.sinor.ru/-Che/bio.htm

4. Hasspieler B.M., Haffner G.D, Adeli K. In vitro toxicological methods for environmental health testing. 1996. № 4. P. 213-227.

5. Червонская Г.П., Панкратова Г.П., Миронова Л.Л., Крючкова Г.П., Фрейдин М.И. Методические указания по использованию культуры диплоидных эмбриональных клеток человека, рекомендуемых для токсиколого-гигиенических исследований // Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды (методическое пособие). М., 1999. С. 79-88.

6. Бигалиев А.Б., Туребаев М.Н., Елемесова М.Ш., Бигалиева Р.К. Культура клеток как тест-система для исследования потенциальной мутагенной активности промышленных загрязнителей // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып. 2. М.: Изд-во «Мысль», 1977. С. 74-84.

7. Дубинина Л.Г. Культура лейкоцитов человека как тест-система при анализе мутагенности факторов среды // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып.1. М.: Изд-во «Наука», 1977. С. 89-95.

8. Бочков Н.П., Кулешов Н.П., Журков В.С., Яковенко К.Н. Изучение спонтанных хромосомных аберраций в культуре лимфоцитов человека // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып. 1. М.: Изд-во «Наука», 1977. С. 106-110.

9. Hasspieler B.M. Toxicological assessment of industrial solvents using human cell bioassays: assessment of short-term cytotoxicity and long-term genotoxicity potential // Toxicology and Industrial Health. 2006. V. 22. № 7. P. 301-315.

10. Hasspieler, B., Haffner, D., Adeli, K. Human bioassays to assess environmental genotoxicity: development of a DNA break bioassay in HepG2 cells // Clinical Biochemistry. 1995. V. 28. P. 113-116.

11. Dambach D. M., Andrews B. A., Moulin F. New Technologies and Screening Strategies for Hepatotoxicity: Use of In Vitro Models // Toxicologic Pathology. 2005. V. 33. № 1. P. 17-26.

12. Культивирование клеток и тканей. «ЛабоRUтория» (www.primer.ru), 2003.

13. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 263 с.