

В.А. Андреев¹, Е.Ю. Андреева², Л.П. Эрдниев²,
Я.А. Степанов², А.Ю. Микшта², И.В. Мокшанов²,
И.А. Ермолаева², Н.В. Степанова³, В.Я. Апчел^{1, 4}

Использование тест-объекта *Paramecium caudatum* для определения острой токсичности физиологически активных веществ

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²33-й Центральный научно-исследовательский испытательный институт Министерства обороны Российской Федерации, Вольск-18

³1-я мобильная бригада войск радиационной, химической и биологической защиты (в/ч 71432), Вольск-18

⁴Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

Резюме. Показано преимущество биотестирования по сравнению с физико-химическим анализом на основе использования *Paramecium caudatum* при проведении токсикологических исследований. Средствами физико-химического анализа часто не удается обнаружить неустойчивые соединения. Кроме того, эти средства не дают возможности определить ультрамалые концентрации химических веществ. Помимо традиционного использования лабораторных животных, в последнее время биообъектами становятся представители простейших. В связи с этим выбран и обоснован тест-объект из типа простейших. Отмечены преимущества использования простейших по сравнению с использованием лабораторных животных. Описаны различные модели, используемые для тестирования токсичных веществ. Отмечены их достоинства и недостатки. Описаны основные достоинства альтернативных моделей второго порядка (различных гидробионтов, бактерий, культур клеток и др.). Показана актуальность и возможность использования культуры клеток инфузории *Paramecium caudatum* для проведения токсикологических исследований. Представлены методические аспекты проведения биотестирования органических растворителей с использованием предложенного тест-объекта. Выявлено одностороннее изменение токсикометрических параметров органических растворителей для двух видов биологических объектов: белая мышь и культура клеток инфузории *Paramecium caudatum*. Отмечена корреляция показателей общей токсичности органических красителей с аналогичными показателями для белых мышей.

Ключевые слова: инфузория *Paramecium caudatum*, биотестирование, органический растворитель, токсикометрия, острая токсичность, биологические модели, культивирование инфузорий, среда Лозино-Лозинского, лабораторные животные.

Введение. Для токсикологической оценки различных физиологически активных веществ (ФАВ) традиционно используют лабораторных животных. Однако в числе организмов, на которых проводят биотестирование, наряду с лабораторными животными зачастую присутствуют представители простейших, что тесно связывает токсикологические исследования с микробиологическими. На сегодняшний день в Российской Федерации разработано около 40 биотестов с использованием бактерий активного ила, грибов и актиномицетов, водорослей, простейших, беспозвоночных и рыб [1, 2, 5]. Наиболее яркими и распространенными представителями простейших являются одноклеточные организмы из класса инфузорий. Применение инфузорий для проведения биотестирования можно объяснить наиболее быстрым развитием тест-реакции в ответ на воздействие химических веществ. Наступление таких реакций может происходить в диапазоне от нескольких минут до нескольких часов.

Применение биотестирования имеет ряд преимуществ перед физико-химическим анализом,

средствами которого часто не удается обнаружить неустойчивые соединения или количественно определить ультрамалые концентрации химических веществ. Довольно часты случаи, когда выполненный современными средствами химический анализ не показывает наличия токсикантов, тогда как использование биологических тест-объектов свидетельствует об их присутствии в исследуемой среде. Об этом говорит значительное число методических разработок, рекомендаций и публикаций, постоянно появляющихся в специализированных изданиях, а также их широкое использование на практике. Эти методики обладают высокой чувствительностью, экспрессностью, надежностью, универсальностью и малой себестоимостью. Они просты в проведении, поддаются инструментализации и автоматизации, а их результаты легко интерпретируемы. Биотестирование дает возможность быстрого получения интегральной оценки токсичности, что делает весьма привлекательным его применение при скрининговых исследованиях [1, 5, 6, 7].

Существующая на сегодняшний день классификация биологических моделей представлена в следующем виде [2]:

- модели первого порядка – лабораторные животные;
- модели второго порядка – альтернативные модели (различные гидробионты, бактерии, ферменты, культуры клеток и др.);
- модели третьего порядка – математические модели, описывающие биологические процессы.

В качестве лабораторных животных используются мыши, крысы, морские свинки, кролики, собаки, свиньи, приматы. В редких случаях исследования проводятся на крупном рогатом скоте и экзотических видах животных. Однако использование биологических моделей первого порядка сопряжено со значительными финансовыми расходами на закупку и содержание (законность приобретения и создание специализированных помещений), а также с этическими принципами проведения исследований.

В связи с этим особую значимость приобретают токсикологические исследования с использованием биологических моделей второго порядка. Исследования на биологических моделях второго порядка являются не только доступными для большинства лабораторий, но и относятся к наиболее экономически обоснованным в качестве экспресс-оценки токсикометрических показателей химических веществ на этапе доклинического изучения. С точки зрения гуманности и законности данный способ исследований не имеет отрицательного значения.

Цель исследования. Определить острую токсичность некоторых органических растворителей с использованием инфузорий *Paramecium caudatum* в качестве тест-объекта и возможность ее корреляции с аналогичными показателями для белых мышей.

Материалы и методы. В опытах в качестве тест-объектов использовали 10-суточную культуру настоя банановой кожуры, содержащую инфузории *Paramecium caudatum* и 10 белых мышей массой 16–18 г. Выбор *Paramecium caudatum* связан с простотой и дешевизной их культивирования, чувствительностью к токсикантам разного рода и быстрым развитием ответной реакции (табл. 1).

Оценку влияния растворителей на тест-объект проводили в микроаквариумах, в качестве которых использовали иммунологические планшеты с объемом ячейки 0,3 мл. Контроль за выживаемостью тест-объектов осуществляли при помощи цифрового микроскопа «Микрон-400» фирмы «Sititek» (рис. 1).

Периодическое культивирование инфузорий *Paramecium caudatum* осуществляется в чашках Петри. Средой для культивирования служит модифицированная среда Лозино-Лозинского. После культивирования очищали выращенную массу микроорганизмов от посторонних видов и продуктов жизнедеятельности. Для этого использовали разные способы фильтрации и разделения бактерий по разным физическим и биохимическим особенностям.

При очистке использовали нормальную физиологическую реакцию инфузорий собираться в верхних слоях жидкости (рис. 2).

При этом задействовали сосуды с узким длинным горлом, позволяющие сконцентрировать инфузории в верхней зоне и слить их в другой сосуд с минимальным количеством загрязненной культуральной среды. Концентрат разбавляли чистой средой Лозина-Лозинского, опять собирали клетки в верхней зоне и сливали. В результате отмывания инфузорий степень разбавления культуральной жидкости чистой средой была не менее 1:200, что соответствовало рекомендациям других исследователей [5].

В 5 ячеек иммунологического планшета помещали питательную среду с тест-объектами в объеме 0,15 мл и при помощи микроскопа визуально определяли наличие и активность инфузорий. После этого в ячейки добавляли рабочие растворы исследуемых веществ в различных концентрациях в объеме 0,15 мл. Визуальное наблюдение за тест-объектами осуществляли в течение суток. Определяемым токсикометрическим параметром являлся показатель смертности тест-объекта при воздействии растворителя в заданной концентрации (LC50, мг·л⁻¹). В работе придерживались методических рекомендаций по практическому использованию стандартизованных тест-культур [5]. Острое токсическое действие исследуемой пробы определяли по смертности инфузорий за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности пробы служила гибель 50% и более клеток за 24 ч. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

Таблица 1

Наиболее распространенные тест-объекты и критерии их выбора

Вид тест-объекта	Критерий выбора			
	чувствительность к токсикантам разного рода	простота культивирования и дешевизна использования	время развития тест-реакции	качество потомства
Дафнии	+	+	До 96 ч	Отрицательное
Половые клетки	–	–	До 7 ч	Отрицательное
Люминесцентные бактерии	–	–	До 7 ч	Отрицательное
Инфузии <i>Paramecium caudatum</i>	+	+	От 10 до 15 мин	Отрицательное



Рис. 1. Техническая составляющая исследований: а — иммунологический планшет; б — одноканальный дозатор; в — микроскоп «Микрон-400» цифровой



Рис. 2. Сосуд с длинным горлом, в котором инфузории переместились в верхние слои жидкости

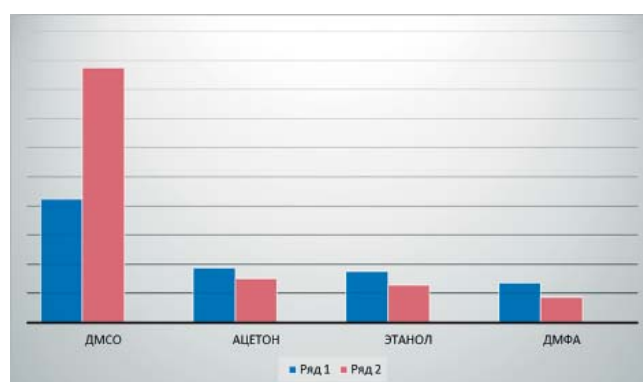


Рис. 3. Количественные значения LD₅₀ для белых мышей и LC₅₀ для инфузорий. Ряд 1 — LD₅₀ для белых мышей, ряд 2 — LC₅₀ для инфузорий

В качестве контроля использовали культуральную среду с инфузориями. При этом в контроле гибель особей не превышала 10%. По окончании срока наблюдения регистрировали токсикометрические показатели исследуемых растворов органических растворителей. Заражение белых мышей проводили *per os* последующим определением их 50% гибели (LD₅₀, мг·кг⁻¹).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что токсичность органических растворителей для инфузорий и белых мышей имеет однонаправленное увеличение в ряду: диметилсульфоксид (ДМСО) → ацетон → спирт этиловый → диметилформамид (ДМФА) (табл. 2).

Так, высокие цифры LD₅₀ для белых мышей (21,18) при тестировании ДМСО соответствуют также высо-

ким цифрам LC₅₀ для инфузорий (43,7), и наоборот: низкий уровень LD₅₀ при исследовании ДМФА соответствует также низкому уровню LC₅₀ для инфузорий, такое соотношение сохраняется для всех тестируемых веществ. Корреляция значения LD₅₀ для белых мышей и LC₅₀ для инфузорий наглядно представлена на приведенном ниже графике (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют об общей направленности изменения токсикометрических показателей органических растворителей для двух видов биологических объектов: белая мышь и инфузории *Paramecium caudatum*. Это подтверждает выбор и обоснованность предлагаемой нами биомодели для проведения токсикологических исследований. Кроме того, процесс подбора оптимального растворителя

Таблица 2

Сравнительная характеристика показателей токсичности органических растворителей для белых мышей и инфузорий *Paramecium caudatum*

Органический растворитель	LD ₅₀ для белых мышей при внутри-желудочном введении, мг·кг ⁻¹	LC ₅₀ для инфузорий, мг·мл ⁻¹
ДМСО	21,18	43,7
Ацетон	9,3	7,49
Спирт этиловый	8,7	6,4
ДМФА	6,8	4,36

для постановки экспериментов на инфузориях может быть упрощен за счет имеющихся баз данных по показателям токсичности для лабораторных животных.

Гибель клеток инфузорий является наиболее надежной реакцией выявления токсических свойств различных веществ. Однако при исследовании низких концентраций токсических веществ могут выявляться и другие тест-функции, такие как скорость размножения, длина свободного пробега, хемотаксис, двигательная активность [3, 4, 6, 7]. Изменение подвижности – ориентировочный параметр при оценке токсичности, так как на движение у простейших расходуется всего 1% энергии общего обмена, следовательно, эта функция незначительно отражает изменения метаболизма клетки при его нарушениях токсичными агентами. Большей чувствительностью обладает биотест на основе оценки скорости размножения.

Выводы

Культура клеток инфузории *Paramecium caudatum* представляет собой адекватный тест-объект для выявления острой токсичности веществ, и ее использование возможно для проведения токсикологических исследований.

Показатели острой токсичности органических растворителей, выявленные на культуре *Paramecium*

caudatum, в целом коррелируют с аналогичными показателями для белых мышей.

Литература

1. Виноходов, Д.О. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Д.О. Виноходов. – СПб., 2007. – 45 с.
2. Красовский, Г.Н. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека / Г.Н. Красовский, Ю.А. Рахманин, Н.А. Егорова. – М.: Медицина, 2009. – 208 с.
3. Сибгатуллина, А.М. Измерение загрязнённости речной воды (на примере малой реки Малая Кокшага) / А.М. Сибгатуллина, П.М. Мазуркин. – М.: Академия естествознания, 2009. – 71 с.
4. Субботин, А.М. Исследование физиологических параметров культуры инфузорий *Paramecium caudatum* при воздействии фильтратов бактериальных культур рода *Acinetobacter* / А.М. Субботин, Л.Н. Гнатченко, Г.А. Петухова // Вестн. Оренб. гос. ун-та. – 2011. – № 12 (131). – С. 149–150.
5. Суворова, Т.В. Метод и средства контроля токсичности водных сред по реакции бактерий: автореф. дис. ... канд. техн. наук / Т.В. Суворова. – СПб.: СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2004. – 16 с.
6. Терехова, В.А. Биотест-системы для задач экологического контроля: методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур / В.А. Терехова [и др.]. – М.: Доброе слово, 2014. – 48 с.
7. Raoa, J.V. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction / J.V. Raoa [et al.] // Toxicological & Environmental Chemistry. – 2007. – Volume 89, Issue 2. – P. 307–317.

V.A. Andreev, E.Yu. Andreeva, L.P. Erdniyev, Ya.A. Stepanov, A.Yu. Mikshita, I.V. Mokshanov, I.A. Yermolayeva, N.V. Stepanova, V.Ya. Apchel

Using the *Paramecium caudatum* test object to determine acute toxicity of physiologically active substances

Abstract. The advantage of biotesting in comparison with the physicochemical analysis of the use of *Paramecium caudatum* for toxicological studies has been shown. Physical and chemical analysis often fails to detect unstable compounds. In addition, these tools are not possible to determine the ultra-low concentration of chemicals. In addition to the traditional use of laboratory animals, representatives of protozoa have recently been used. In connection with this, a test object of the Simplest type was chosen and justified. The advantages of using the simplest compared with the use of laboratory animals. The various models used to test toxic substances are described. Their advantages and disadvantages are noted. The main advantages of second-order models using alternative models (various hydrobionts, bacteria, cell cultures, etc.) are described. The relevance of using the culture of cells of the ciliate *Paramecium caudatum* for toxicological studies has been shown. The methodological aspects of the biotesting of organic solvents using the proposed test object are presented. A unidirectional change in the toxicometric parameters of organic solvents for two types of biological objects: a white mouse and a culture of infusoria *Paramecium caudatum* were revealed. The possibility of using *Paramecium caudatum* for toxicological studies has been shown. A correlation was noted between the indicators of the general toxicity of organic dyes and those of white mice.

Key words: ciliate *Paramecium caudatum*, biotesting, organic solvent, toxicometry, test objects, acute toxicity, biological models, culturing of infusoria, Lozina-Lozinsky medium, laboratory animals.

Контактный телефон: 8-981-847-41-11; e-mail: vmeda-nio@mil.ru