

## ОБЗОРЫ

© ЕГОРОВА О.В., 2021

Егорова О.В.

## К процедуре подтверждения компетентности лаборатории, проводящей исследования на мутагенность с использованием теста Эймса

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Московская область, г. Мытищи, Российская Федерация

**Введение.** Тест на индукцию обратных генных мутаций (тест Эймса, руководство ОЭСР\* № 471) – один из наиболее востребованных методов оценки мутагенности в виду простоты исполнения и способности выявлять до 70–80% веществ, обладающих канцерогенной активностью. Протокол эксперимента требует минимального количества тестируемого вещества и стандартного оборудования микробиологической лаборатории. Для получения первичных данных необходимо несколько дней от начала эксперимента. Несмотря на наличие публикаций, посвящённых детальному описанию стандартного протокола теста Эймса, существует пробел, затрагивающий ряд аспектов процедуры подтверждения компетентности испытательного центра, использующего в своей практике данный метод.

**Материал и методы.** При подготовке данной статьи использовали литературные данные, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе за последние 20 лет, касающиеся экспериментальных подходов при реализации теста Эймса. Поиск литературы проводили в базах данных Scopus, Medline, Google Scholar, РИНЦ.

**Результаты.** Во ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора метод оценки обратных генных мутаций на бактериях нашёл применение при оценке безопасности технических продуктов пестицидов, их смесей и препаративных форм, а также экспертизы эквивалентности. Испытательный лабораторный центр на базе ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора аккредитован на соответствие стандарту ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий». В настоящей статье, основываясь на новых опубликованных данных и собственном практическом опыте, рассматривается ряд необходимых условий для демонстрации компетентности испытательной лаборатории, использующей в своей практике тест на индукцию обратных генных мутаций, ее способности получать достоверные результаты и осуществлять действия по управлению рисками лабораторной деятельности. Основное внимание уделено обеспечению таких параметров качества теста, как индикаторные культуры, система метаболической активации, контроль фона спонтанного мутирования и др.

**Заключение.** Обсуждаемые практические вопросы могут быть полезны специалистам научно-исследовательских лабораторий, планирующим внедрение этого метода в практику.

**Ключевые слова:** оценка мутагенности; тест Эймса; обратные генные мутации; руководство ОЭСР № 471; подтверждение компетентности; качество исследований

**Для цитирования:** Егорова О.В. К процедуре подтверждения компетентности лаборатории, проводящей исследования на мутагенность с использованием теста эймса. *Токсикологический вестник*. 2021; 29(4): 4-13. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-4-4-13>

**Для корреспонденции:** Егорова Ольга Валерьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф.Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, г. Мытищи. E-mail: [egorovaov@fferisman.ru](mailto:egorovaov@fferisman.ru)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию 08 июня 2021 / Принята в печать 29 июля 2021 / Опубликовано 30 августа 2021

\* ОЭСР – Организация экономического сотрудничества и развития.

Egorova O.V.

# To the procedure of confirmation of the laboratory's competence in performing mutagenicity assessment using the Ames test

FBES "Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Mytishchi, Russia

**Introduction.** The bacterial reverse mutation test (Ames test, OECD\* guideline No. 471) is one of the most popular methods for assessing mutagenicity due to its ease of use and the ability to detect up to 70–80% of substances with carcinogenic activity. The experimental protocol requires a minimum amount of test item and standard microbiological laboratory equipment. To obtain the raw data, several days from the start of the experiment are required.

Despite the existence of publications devoted to the detailed description of the standard Ames test protocol, there is a gap in a number of aspects of the procedure for confirming the competence of a test facility using this method in its practice.

**Materials and methods.** When preparing this article, we used the literature data published in Russian and foreign literature over the past 20 years concerning experimental approaches to the implementation of the Ames test. The literature search was carried out in the Scopus, Medline, Google Scholar, RSCI databases.

**Results.** In the FBES "Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing the bacterial mutation assay has found application in studying the safety of technical grade active ingredients of pesticides, their mixtures and formulation, as well as in the assessment of equivalence. The test facility on the basis of the FBES "Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing is accredited for compliance with the state standard GOST ISO / IEC 17025-2019" General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. "In this article, based on new published data and our own practical experience, a number of necessary conditions are considered for demonstrating the competence of a testing laboratory using the Ames test in its practice, its ability to obtain reliable results and take actions to manage the risks of laboratory activities. The main attention is paid to ensuring such parameters of the test quality as indicator cultures, metabolic activation system, control of the background of spontaneous mutation, etc.

**Conclusion.** The discussed practical issues can be useful for specialists from research laboratories planning to introduce this method into practice.

**Keywords:** assessment of mutagenicity; Ames test; reverse gene mutations

**For citation:** Egorova O.V. To the procedure of confirmation of the laboratory's competence in performing mutagenicity assessment using the Ames test. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2021; 29(4): 4-13. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-4-4-13> (In Russian)

**For correspondence:** Olga V. Egorova, senior researcher of the department of genetic toxicology, FBES "F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Mytishchi, Russia. E-mail: [egorovaov@fferisman.ru](mailto:egorovaov@fferisman.ru)

## Information about the author:

Egorova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771>  
Scopus Author ID: 57191422037

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The study had no sponsorship.

Received: June 8, 2021 / Accepted: July 29, 2021 / Published: August 30, 2021

\* OECD – Organization for Economic Cooperation and Development.

## Введение

Возрастающее загрязнение окружающей среды, рост частоты онкозаболеваний, наследственных патологий и так далее усиливает актуальность проблемы генетической безопасности химических веществ, круг которых неуклонно расширяется. Для оценки генотоксичности используют комплекс генетических методов, позволяющих выявлять весь спектр мутационных событий [1].

Метод оценки обратных генных мутаций на бактериях, который впервые был предложен доктором Брюсом Эймсом в 70-х гг. XX века, относят к наименее сложным и легко реализуемым тестам на мутагенность. Тривиальное название метода – тест Эймса – прочно закрепилось в отечественной и зарубежной литературе. Протокол эксперимента требует минимального количества тестируемого вещества и стандартного оборудования микробиологической лаборатории. Для получения первичных данных необходимо несколько дней от начала эксперимента. Несмотря на развитие новых тест-систем, он остаётся одним из наиболее востребованных методов генетической токсикологии, использующихся при скрининге мутагенности химических соединений и краткосрочном прогнозе их потенциальной канцерогенности [2].

Стратегия тестирования химических веществ с помощью теста на индукцию обратных генных мутаций описана в международном протоколе ОЭСР [3]. Во ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф.Эрисмана» Роспотребнадзора метод оценки обратных генных мутаций на бактериях нашел применение при оценке безопасности технических продуктов пестицидов, их смесей и препаративных форм, а также экспертизе эквивалентности [4-6]. Испытательный лабораторный центр на базе ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф.Эрисмана» Роспотребнадзора аккредитован на соответствие стандарту ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (РОСС.RU.0001.510122).

Несмотря на наличие публикаций, посвящённых детальному описанию стандартного протокола теста Эймса [7-10], существует пробел, затрагивающий ряд аспектов процедуры подтверждения компетентности испытательного центра, использующего в своей практике данный метод.

В настоящей статье, основываясь на новых опубликованных данных и собствен-

ном практическом опыте, рассматривается ряд необходимых условий для демонстрации компетентности испытательной лаборатории, ее способности получать достоверные результаты и осуществлять действия по управлению рисками лабораторной деятельности. Принцип и подробное описание проведения самого теста, приготовления сред и растворов, необходимого оборудования, реактивы и расходные материалы приведены в соответствующих публикациях [11, 12].

Обсуждаемые практические вопросы могут быть полезны специалистам научно-исследовательских лабораторий, планирующих внедрение этого метода в практику.

## Материал и методы

При подготовке данной статьи использовали литературные данные, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе за последние 20 лет, касающиеся экспериментальных подходов при реализации теста Эймса. Поиск литературы проводили в базах данных Scopus, Medline, Google Scholar, РИНЦ. Всего найдено свыше тысячи публикаций, последующее изучение аннотаций которых показало, что наиболее близко теме данной работы соответствует около 100 материалов. Основной массив данной статьи сформирован из наиболее релевантных 17 публикаций.

## Результаты и их обсуждение

### Параметры качества тест-системы и возможные способы их обеспечения

Для подтверждения компетенции лаборатории необходима демонстрация чётких доказательств, что лабораторная практика при постановке теста Эймса соответствует всем заложенным критериям качества, рассматриваемым ниже.

#### *Индикаторные культуры и их поддержание.*

При проведении исследований в качестве индикаторных культур используют мутантные штаммы, *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA100, TA97 и т.д.) или *Escherichia coli* (WP2), рост которых зависит от наличия аминокислот в среде. В данной тест-системе мутации, возникающие вследствие замены, вставки или делеции одной или нескольких пар оснований, выявляют путем оценки реверсии от аукотрофности к прототрофности, что позволяет микроорганизмам синтезировать необходимую аминокислоту (гистидин или триптофан). При наличии мутагенного эффекта число индуцированных ревертантов

### Параметры качества индикаторных культур Quality parameters of indicator crops

Показатель	Реализация оценки показателя
Подтверждение генотипа каждой индикаторной культуры осуществляется на основе оценки её фенотипа: ауксотрофности по гистидину, наличие/отсутствие плазмид R-фактора, присутствие специфических мутаций <i>rfa</i> и <i>uvrB</i> (или <i>uvrA</i> )	1. Ауксотрофность по гистидину оценивают при высеве штамма на нижний минимальный селективный агар, не содержащий гистидин. О наличии мутации судят по отсутствию роста на среде без гистидина и наличию роста на селективном агаре, содержащем биотин и гистидин. 2. О <i>rfa</i> -мутации, приводящей к нарушению синтеза липосахаридного слоя клеточной стенки бактерий, судят по чувствительности к кристаллвиолету, по наличию чёткой зоны ингибирования вокруг диска, с нанесённым раствором кристаллвиолета. 3. Резистентность к тетрациклину или ампицилину характерна для штаммов, несущих плазмиды pAQ1 или pKM101, о наличии плазмиды свидетельствует отсутствие зоны ингибирования вокруг диска, с нанесённым раствором антибиотика или рост на средах с добавлением антибиотиков (35–50 мг/мл ампициллина или 1–5 мкг/мл тетрациклина). 4. О делеции галактозного оперона ( <i>Dgal</i> ), затрагивающей также и ген <i>uvrB</i> , судят по чувствительности к УФ или митомицину С (о чувствительности к митомицину С судят по наличию чёткой зоны ингибирования вокруг диска с митомицином С).
Оценка фона спонтанного мутирования	Число спонтанных ревертантов для каждого штамма должно находиться в пределах отрицательного исторического контроля в лаборатории, а также соответствовать известным диапазонам спонтанного уровня мутаций, по данным литературы
Оценка действия веществ с доказанной мутагенной активностью	Получение доказательств выраженной дозозависимой мутагенной активности положительных контролей в условиях метаболической активации и без неё
Исследование ростовых характеристик штаммов	Снятие кривых роста индикаторных культур на основе оценки числа КОЕ с параллельным измерением величины оптической плотности
Доказательство стерильности	Готовят серию разведений ночной культуры и ее высевают на чашки с 2–3 типами плотных ростовых сред (по 2–3 чашки каждой среды). После культивирования в течение 24–48 ч при температуре $37 \pm 1$ °C проводят визуальный просмотр изолированных колоний на чашках в прямом и косонаправленном свете через бинокулярную лупу или микроскоп на малом увеличении. Учитывают наличие /отсутствия пророста бактерий и грибов. В норме на плотной питательной среде должны присутствовать колонии с типичными свойствами индикаторных культур по цвету, размеру и морфологии. При обнаружении роста посторонней микрофлоры результат учитывают как «нестерильно», культура не пригодна для дальнейшего использования

после экспозиции с тестируемым веществом растёт с увеличением его дозы. Наблюдаемые эффекты являются воспроизводимыми.

В каждом эксперименте необходимо использовать не менее 5 штаммов бактерий, несущих не только -G-C- пары оснований в первичном сайте реверсии, но и -A-T- для выявления соединений, индуцирующих образование перекрёстных сшивок, гидразинов и окисляющих ДНК мутагенов [13]. Хотя в ряде публикаций указывается, что в качестве источника штаммов бактерий может выступать как коммерческая, так и научно-исследовательская организация, для исключения риска поступления некачественных культур эталонные штаммы следует получать из официально признанной коллекции микроорганизмов. Но даже в этом случае, поступление индикаторных культур в лабораторию сопровождается оценкой их качества (см. таблицу).

Некоторые компании, например, MOLTOX™ предлагают готовые наборы для проведения генетического анализа на основе 6-луночных планшетов.

После того, как подтверждены параметры качества каждого тест-штамма, в лаборатории должны быть созданы банки эталонных и рабочих культур. Такая практика ведения коллекции бактерий, сводит к минимуму количество пассажей и сокращает вероятность диссоциации штамма, потери плазмиды или случайного загрязнения. Поддержание культур на плотных средах путём регулярных пересевов не рекомендовано, так как дополнительные пассажи могут привести к потере эталонных свойств.

Для получения запаса эталонных образцов штамма существуют рекомендации использовать для засева жидкой питательной среды как материал 1-й колонии, так и 4–5-й колоний (во избежание генетического дрей-

фа). Поддержание целостности клеток бактерий при  $-70 \pm 10$  °С обеспечивает введение в культуральную жидкость криопротекторов, таких как ДМСО или глицерин в допустимой концентрации [11]. Также в практике нашей лаборатории для поддержания банка эталонных культур успешно себя зарекомендовала система «КРИБАНК для криоконсервации и восстановления микробиологических культур».

Банк эталонных образцов служит источником регулярного получения рабочих культур, который используют в рутинных экспериментах в течение 1–2 лет. При получении запаса рабочей культуры путём засева аликвоты эталонного образца следует избегать подхода, при котором засев инокулята происходит путем соскабливания замороженного материала и его последующего переноса в ростовую среду. Даже кратковременное оттаивание и повторное замораживание образца является крайне губительным для индикаторных штаммов, особенно несущих плазмиды резистентности. Целесообразно готовить аликвоты небольшого объёма, достаточного для однократного засева жидкой питательной среды. Каждая партия рабочей культуры периодически подвергается анализу на соответствие параметрам качества, приведённым в таблице. При получении неудовлетворительных результатов аликвоты рабочих культур утилизируют.

Руководство ОЭСР предписывает использование в эксперименте клеток индикаторной культуры поздней логарифмической фазы или фазы замедленного роста с плотностью не менее  $1 \times 10^9$  клеток/мл. Для получения культуры заданной фазы развития и плотности необходимо изначально оценить динамику роста бактериальной популяции. При построении кривой роста периодической культуры в качестве критериев увеличения числа клеток используют величину оптической плотности и оценку числа КОЕ. В дальнейшем при выполнении рутинных экспериментов о ростовых свойствах культуры можно судить по величине измеренной оптической плотности. В практике ряда лабораторий для дополнительного подтверждения титра бактериальной культуры, используемой в исследовании, нашёл применение метод серийных разведений с последующим высевом на неселективные питательные среды, а также подсчёт количества клеток в камере Горяева.

Поскольку штаммы *S. typhimurium* и *E. coli* являются факультативными анаэробами, следует принять во внимание, что динамика роста индикаторной культуры зависит от условий культивирования: объёма среды, формы колбы (коническая или круглая) и типа пробки (силиконовая или ватно-марлевая), интенсивности встряхивания, характера перемешивания (возвратно-поступательный или орбитальный). При получении новой партии рабочей культуры или изменений условий культивирования необходимо повторно оценить динамику роста.

При выполнении рутинных экспериментов, как правило, используют «ночную культуру», не подлежащую длительному хранению (не более 1 рабочего дня при  $4 \pm 2$  °С). Опыт работы с банком замороженных рабочих культур в нашей лаборатории показал, что для получения «ночной культуры» требуемой плотности при отсутствии перемешивания для засева оптимально использовать аликвоту в объёме 1–2% от объёма жидкой среды.

**Система метаболической активации.** Оценка мутагенной активности вещества осуществляется в вариантах с присутствием и отсутствием системы метаболической активации (S9-mix), которая содержит комплексы ферментов биотрансформации химических соединений и кофакторы. Основным компонентом активирующей смеси является постмитохондриальная фракция гомогената печени лабораторных животных (S9), состоящая из цитозоля и микросом. S9-фракция может быть приобретена у поставщиков данного вида продукции, например, компании MOLTOX™, XENOMETRIX, Sigma-Aldrich или получена самостоятельно. Однако и в том и другом случае в России существуют серьёзные трудности в получении S9-фракции.

При приобретении из коммерческих источников помимо высокой стоимости возникает вопрос об обеспечении логистики при температуре  $-70$  °С. Возможным решением является получение фракции MOLTOX™ в лиофилизированном виде, для которой предусмотрены более высокие температурные режимы ( $-20$  °С).

Общепринятыми индукторами печёночных оксигеназ животных является Арохлор-1254 или смесь фенобарбитала и β-нафтофлавона. Но поставка этих реактивов также сопряжена с колоссальными препятствиями: фенобарбитал включён в перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекур-

соров, подлежащих контролю в Российской Федерации (список III). Зарегистрированных лекарственных средств для ветеринарного применения на основе фенобарбитала в Российской Федерации не найдено (<https://fsvps.gov.ru/fsvps/regLicensing/registration/registrationReestr.html>, дата обращения 14.03.2021).

Исходя из опыта нашей лаборатории, поставка Арохлора 1254 в Российскую Федерацию на данный момент не возможна, поскольку требует получения разрешительной документации для импорта в РФ и дополнительных экспортных процедур в стране производства. При этом орган исполнительной власти, наделённый полномочиями по выдаче разрешительного документа на ввоз на территорию РФ, не определён (ответ поставщика от 11.02.2021 на основании письма Росприроднадзора от 17.05.2019 № АД-10-01-32/13221). Аналог Арохлора 1254 – смесь «Совол» надлежащего качества также не производится на территории Российской Федерации.

Поэтому в качестве альтернативных индукторов может быть рассмотрен ряд других соединений, прежде всего метилхолантрен, этанол, прегненолон или только  $\beta$ -нафтофлавон, эффективность которых показана в ряде работ [14–16].

К обязательным параметрам, которые необходимо контролировать при самостоятельном получении постмитохондриальной фракции, относят её стерильность, содержание белка, а также подтверждение её активности в присутствии как минимум двух известных мутагенов, таких как циклофосамид, этидиум бромид, бенз(а)пирен. В некоторых лабораториях дополнительно оценивают активность P450-монооксигеназ (1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2E1), а также проводят сравнение с действием S9-фракции, полученной из печени неиндуцированных животных.

Содержание S9 в активирующей смеси колеблется в диапазоне 5–30% (около 1 мг белка на чашку). Стандартная концентрация, используемая во многих лабораториях, составляет 10%. Если после проведения экспериментов получены результаты, которые не позволяют однозначно сделать вывод о наличии или отсутствии мутагенной активности, рекомендовано провести повторный эксперимент, изменив при этом содержание S9 в смеси, как в сторону увеличения, так и уменьшения [12, 13].

**Выбор концентраций тестируемого соединения и растворителей.** При тестировании соединения, в отношении которого нет данных о его токсичности для клеток бактерий, необходимо провести предварительный эксперимент для установления диапазона концентраций. При этом испытание может быть проведено с использованием двух повторов для каждой дозы. Некоторые лаборатории проводят предварительный эксперимент на всех 5 штаммах, другие – на TA100 и TA98, которые считаются наиболее чувствительными к действию мутагенов. Собственный практический опыт тестирования технических продуктов пестицидов свидетельствует, что наиболее сенситивной культурой в отношении цитотоксичности является штамм TA97.

Руководство ОЭСР № 471 чётко не оговаривает, что является значимым уменьшением числа ревертантных колоний по сравнению с отрицательным контролем. Тем не менее, общепринято говорить о наличии токсичности для бактерий, если имеет место 40–50 % снижение фона спонтанного мутирования. В основном эксперименте в протокол исследования должно быть включено не менее 3–4 нецитотоксичных концентраций. Специалистам, которые только начинают внедрять тест Эймса в лабораторную практику, следует обращать внимание на возможность образования «точечных» колоний (pinpoint colonies). Гибель большей части популяции внесённых бактерий вследствие токсичности соединения приводит к тому, что оставшиеся микроорганизмы растут в условиях избытка гистидина, формируя многочисленные микроколонии ауксотрофных ревертантов, что ошибочно может быть принято за картину позитивного ответа.

В предварительном эксперименте также полезно обращать внимание на образование преципитата при внесении гомогенного стокового раствора вещества в пробирку с буфером и/или верхним агаром. Ряд соединений имеют тенденцию образовывать крупные агрегаты или налипать на стенки пробирок, что несомненно приводит к значительному искажению концентрации, вносимой на чашки. Как показывает наш практический опыт с техническими продуктами пестицидов, большая часть из которых плохо растворимы в воде, в случае высоких концентраций 1,6–5,0 мг/чашку характер образования преципитата после инкубации может значительно отличаться: в одних случаях равномерное

распределение преципитата на поверхности чашки Петри позволяет без особых затруднений провести подсчет ревертантов, в том числе и с помощью автоматического счётчика, в других – образующиеся кристаллы делают практически невозможным даже визуальный подсчёт. Хотя максимальная концентрация вещества ограничена 5 мг/чашку п. 19 руководства ОЭСР № 471, в случае получения неоднозначных результатов она может быть увеличена.

Тестирование веществ, плохо растворимых в воде, ставит вопрос о выборе подходящего растворителя, который должен быть инертным по отношению к соединению и не оказывать влияние на уровень спонтанного мутирования, как в условиях метаболической активации, так и без нее. Диметилсульфоксид (ДМСО) – один из самых распространённых растворителей, используемых в тесте Эймса [17]. Однако, поскольку наличие воды в его составе может приводить к образованию мутагенных примесей, необходимо контролировать условия его хранения и обращения в лаборатории. Эксперименты, проведённые в нашей лаборатории при тестировании тирама, также показали эффективность использования в качестве растворителя метил-β-циклодекстрина (Cavasol®).

**Условия проведения эксперимента.** После проведения предварительного теста и установления диапазона тестируемых концентраций оценивают мутагенную активность в основном эксперименте, который может быть выполнен в двух вариантах: в стандартном чашечном тесте (метод прямого введения, plate incorporation method) и тесте с предварительной инкубацией. Полагают, что предварительная инкубация в варианте с метаболической активацией необходима для детекции короткоживущих метаболитов или выявления мутагенности определённых классов химических веществ. При постановке теста с предварительной инкубацией целесообразно уменьшить количество вносимого ДМСО и увеличить концентрацию S9 или общий объём системы метаболической активации.

К настоящему времени не существует общепринятого подхода какой вариант предпочтительнее использовать. В отдельно взятых лабораториях тестирование химических веществ проводят как при использовании обеих версий, так и одной их них.

Постановка эксперимента в стандартном чашечном тесте может осуществляться двумя способами: в первом в пробирки с 2 мл верхнего агара последовательно добавляют культуру, аликвоту тестируемого вещества, буфер или S9-mix; во втором варианте расплавленный верхний агар вносят в последнюю очередь. При выборе способа постановки эксперимента прежде всего стоит учитывать термостабильность тестируемого вещества, поскольку температура полужидкого агара составляет  $46 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Контроль фона спонтанного мутирования.** Одним из важных показателей качества выполнения теста Эймса является число спонтанных ревертантных колоний в присутствии растворителя, которое используется не только для оценки мутагенного эффекта, но и для верификации результатов. Число спонтанных ревертантов должно укладываться в диапазон колебаний исторического отрицательного контроля в лаборатории (ИОК) и/или литературных данных. Если значения выходят за рамки приемлемого диапазона, то возникает вопрос о соответствии генетических характеристик штамма и, следовательно, достоверности результатов проведённого эксперимента [18].

Данные ИОК могут отличаться от приведённых в литературных источниках. Кроме того, диапазоны колебаний спонтанных ревертантов конкретного штамма, опубликованные в научной литературе, также подвержены значительным вариациям, например, для штамма TA102 число ревертантов в присутствии растворителя может соответствовать 100–300 и 350–420 колоний на чашку. В этой связи целесообразно выявить приемлемый диапазон колебаний уровня спонтанного мутирования для каждого штамма, опираясь прежде всего на собственные результаты.

Процедура определения диапазона колебаний уровня спонтанного мутирования в лаборатории включает сбор и обобщение данных числа спонтанных ревертантов в присутствии конкретного растворителя для каждого штамма в условиях метаболической активации и без, оценку приемлемого диапазона колебаний и описание действий, которые необходимо предпринять в случае, если полученные данные в каком-либо из экспериментов выходят за пределы заданных границ. Хотя единого мнения об оптимальном количестве независимых экспериментов для установления границ колебаний уровня спонтанно-

го мутирования не существует, обычно при обосновании диапазонов ИОК используют обобщённые результаты не менее 20 отдельных исследований.

В случае штаммов, характеризующихся низкой частотой спонтанных реверсий, например, TA1535, если в конкретном эксперименте на чашках отрицательного контроля отсутствуют колонии и/или их число меньше 4–5, то результаты такого теста считаются неприемлемыми, поскольку слабые эффекты могут остаться незамеченными. Результаты теста также считают недостоверными, если наблюдается контаминация в чашках отрицательного контроля. Наличие обширной контаминации на экспериментальных чашках, превышающей 15% общего числа, в конкретном тесте также приводит к признанию результатов эксперимента недостоверными.

При наличии несоответствия числа ревертантов в отрицательном контроле необходимо следовать разработанным процедурам «принятия решений». Например, возможно применение «правила автоматического отклонения результатов теста» или «правила соответствия предупреждающим пределам».

В частности, для автоматического отклонения результатов теста допустимо устанавливать приемлемый контрольный диапазон отсека, опираясь на среднее число ревертантов ИОК  $\pm 3$  стандартных отклонения (СКО). Если данные контрольных чашек не укладываются в диапазон, в этом случае делают заключение о признании результатов эксперимента недостоверными. При следовании «правилу соответствия предупреждающим пределам» помимо контрольного диапазона отсека вводят «предупреждающие границы», которые могут быть установлены на основании среднего числа ревертантов ИОК  $\pm 2$  СКО. В этом случае целесообразно установить возможные причины увеличения или снижения фона спонтанного мутирования, например, при использовании новых партий реагентов, непреднамеренном увеличении концентрации гистидина, генетическом дрейфе штаммов при пересевах и т.д. После установления причины изменения числа спонтанных ревертантов рассматривают вопрос о необходимости пересмотра диапазона ИОК или признания результатов эксперимента недостоверными. Решение о пересмотре «предупреждающих границ» может быть сделано на основании нескольких

экспериментов, число которых оговаривается в процедуре принятия решений лабораторией (как правило, от 3 до 10 независимых исследований).

Нами проведено исследование по оценке экспериментальных условий, влияющих на уровень спонтанных мутаций штаммов *Salmonella*, результаты которого представлены в [19].

**Интерпретация полученных результатов.** Руководство ОЭСР № 471 предоставляет минимум информации о подходах к интерпретации данных и разграничению позитивного или негативного эффектов (п. 35–38 ОЭСР № 471). Общий результат теста может быть охарактеризован как негативный, позитивный или противоречивый (сомнительный).

В настоящее время не существует единого критерия, позволяющего провести чёткое разграничение между мутагенными (биологически значимыми) и немутагенными (биологически незначимыми) откликами. В качестве критерия биологической значимости может быть использовано «правило кратности» или результаты статистического анализа. При этом проводят сравнение не только с соответствующим отрицательным контролем в отдельном опыте, но и сопоставляют с суммарными данными ИОК: необходимо, чтобы как минимум для одной из тестируемых концентраций увеличение числа индуцированных ревертантов превышало верхний предел распределения ИОК.

Преимущество консервативного подхода, основанного на правиле кратности и заложенного в процедуре проф. Б. Эймсом с соавт., заключается в простоте применения. Недостатком является тот факт, что он не отражает реальные биологические процессы, поскольку при возникновении мутации в результате экспозиции с химическим соединением происходит увеличение, а не кратное умножение числа ревертантов. Данные среднего числа ревертантных колоний в зависимости от штамма колеблются в диапазоне от 3 (TA1535) до 400 (TA102). По этой причине, для штаммов с низким числом спонтанных ревертантов (<10–20) за точку отсека принимают 2,5–3-кратное увеличение индуцированных мутантов по сравнению с отрицательным контролем, с высоким — 1,5–2,0 [11]. Но даже такой подход не гарантирует вероятность получения ложноположительных или ложноотрицательных ответов.



Существует ряд статистических подходов, которые в настоящее время предложены для обработки результатов. Они основаны на предположениях разного рода, более или менее подходящими для анализа числа ревертантов, например, исходя из допущения о наличии нормального распределения для всех штаммов или на распределении Пуассона, которое, как правило, справедливо для штаммов с низкой частотой спонтанного мутирования. Есть также нерешённые вопросы о том, какое значение  $p$  использовать (например,  $p \leq 0.05$  или  $p \leq 0.01$ ), односторонний или двусторонний критерий, необходимо ли вводить поправку для множественных сравнений, так как каждый тест включает 50 парных сравнений (5 концентраций на 5 штаммах в условиях метаболической активации и без).

Хотя в большинстве случаев можно сделать однозначное заключение о наличии или отсутствии мутагенной активности, тем не менее, могут быть получены результаты, которые не позволяют однозначно оценить оказываемое действие вещества, например, при наличии 1–2 критериев позитивного ответа из 3 (наличие дозовой зависимости, превышение верхней границы распределения отрицательного исторического контроля лаборатории и биологической значимости). В этом случае необходимо провести повторный эксперимент с учётом возможных модификаций первоначального протокола (изменение концентрационного ряда, растворителя, содержания S9, прединкубация и так далее). Но даже после проведения повторного эксперимента, могут присутствовать пограничные эффекты, интерпретация которых затруднена, независимо от того используется ли правило кратности или величина  $p$ . В случае пограничных эффектов для трактов-

ки общего результата прежде всего следует учитывать наличие воспроизводимых откликов, и перекрёстной чувствительности штаммов, несущих мутации в одном и том же локусе, например, TA98 и TA1538 [18].

Необходимо отметить, что дозозависимое увеличение числа ревертантов может быть не только линейным, а также выходить на плато или сопровождаться уменьшением числа индуцированных ревертантов в виду цитотоксичности тестируемого вещества. Необходимость проведения повторного подтверждающего эксперимента при получении отрицательных результатов также активно обсуждается экспертами Международного совещания по оценке генотоксической активности (The International Workshops on Genotoxicity Testing). Ещё один нормативный документ ICHS2(R1) исключает выполнение повторного эксперимента, если не выявлен позитивный эффект [20].

## Заключение

Таким образом, вышеописанные особенности проведения теста Эймса необходимо учитывать специалистам научно-исследовательских лабораторий, планирующим внедрение этого метода в практику. Разработка стандартных операционных процедур, описывающих общую последовательность рутинных действий, и являющихся необходимым элементом системы качества, должна предшествовать началу работы. Это позволит установить в лаборатории корректные границы ИОК, получаемые результаты сравнивать с результатами других исследователей, минимизировать риск получения ложноположительных или ложноотрицательных заключений, что в целом будет способствовать обеспечению достоверности получаемых результатов.

## ЛИТЕРАТУРА

(пп. 2, 3, 5, 7, 9, 11–18, 20 см. в References)

- Абилев С.К., Глазер В.М. *Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие*. М.: СПб: Нестор-История, 2015.
- Ракитский В.Н., Ревазова Ю.А., Илюшина Н.А. Стратегия и тактика оценки мутагенности пестицидов. *Токсикологический вестник*. 2015; 134(5): 10–3.
- Егорова О.В., Илюшина Н.А., Аверьянова Н.С., Масальцев Г.В., Дмитричева О.О. Оценка мутагенной активности технического продукта *n*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(4): 418–24.
- Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полухина Г.Н. и Абилев С.К., Шапиро А.Л. *Тест-система оценки загрязнителей среды на S. typhimurium*. М.: ВИНТИ, 1997. 52.
- Красовский Г.Н., Журков В.С., Жолдакова З.И., Фонштейн Л.М., Абилев С.А., Бобринев Е.В. и др. *Методические указания по изучению мутагенной активности химических веществ при обосновании их ПДК в воде*. М.: Минздрав СССР; Главное санитарно-эпидемиологическое управление. 1986. 23.
- Егорова О.В., Демидова Ю.В., Илюшина Н.А. Оценка экспериментальных условий, влияющих на уровень спонтанных мутаций штаммов *Salmonella*, используемых в тесте Эймса. *Гигиена и Санитария*. 2021; 100(7): 736–43.

## REFERENCES

- Abilev S., Glazer V. Mutagenesis with the basic principles of genotoxicology: a tutorial [Mutagenesis s osnovami genotoksikologii: uchebnoe posobie]. Moscow-SPb: Nestor-Istoriya; 2015 (In Russian)
- Zeiger E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mut Research/Genetic Toxicol Environ Mutagenesis*. 2019; 841: 43–8.
- OECD Test No. 471: Bacterial reverse mutation test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2020. Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- Rakitskiy V., Revazova Yu., Ilyushina N. Strategy and tactics of the pesticide mutagenicity assessment. *Toksikologicheskiy vestnik*. 2015; 134(5): 10–3. (In Russian)

5. Egorova O., Ilyushina N., Rakitskii V. Mutagenicity evaluation of pesticide analogs using standard and 6-well miniaturized bacterial reverse mutation tests. *Toxicology in Vitro*. 2020; 69:105006
6. Egorova O., Ilyushina N., Averianova N., Masaltsev G., Dmitricheva O. Assessment of the mutagenicity of the technical product of N-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylylidine. *Gigiena i sanitariya*. 2020; 99(4): 418-24. (In Russian)
7. Maron D., Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut Research/Environ Mutagenesis and Related Subjects*. 1983; 113 (3-4): 173-215.
8. Fonshtejn L.M., Kalinina L.M., Poluhina G.N. i Abilev S.K., Shapiro A.L. *Test system for the assessment of environmental pollutants in S. typhimurium*. Moscow: VINITIS 1997, 52 .
9. Zeiger E. Bacterial Mutation Assays. Genotoxicity Assessment. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 2013; 1044: 3-26.
10. Krasovskij G.N., Zhurkov V.S., Zholdakova Z.I., Fonshtejn L.M., Abilev S.A., Bobrinev E.V. et al. *Methodological instructive regulations on the study of mutagenicity of chemicals under justification of MAC in water*. Moscow: Ministry of Health of the USSR; Main Sanitary and Epidemiological Department [Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu mutagennoj aktivnosti khimicheskikh veshchestv pri obosnovanii ikh PDK v vode]. Moscow: Minzdrav SSSR; Glavnoe sanitarno-ehpidemiologicheskoe upravlenie. . 1986. (In Russian)
11. Hamel A., Roy M., Proudlock R. The bacterial reverse mutation test. Chapter 4. In Proudlock R. Ed. *Genetic Toxicology Testing. A Laboratory Manual*. 2016: 79-138.
12. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000; 455 (1-2): 29-60.
13. Levy D.D, Hakura A, Elespuru R.K, Escobar P.A, Kato M, Lott J. et al. Demonstrating laboratory proficiency in bacterial mutagenicity assays for regulatory submission. *Mut Research/Genetic Toxicol Environ Mutagenesis*. 2018; 848:403075.
14. Bock KW, Lipp HP, Bock-Hennig BS. Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica*. 1990; 20(11):1101-11.
15. Mori Y., Koide A., Fuwa K., Kobayashi Y. N. Benzylimidazole for preparation of S9 fraction with multi-induction of metabolizing enzymes in short-term genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 2001; 16(6): 479-86.
16. Burke D, Wedd D, Herriott D, Bayliss M, Spalding D, Wilcox P. Evaluation of pyrazole and ethanol induced S9 fraction in bacterial mutagenicity testing. *Mutagenesis*. 1994; 9(1):23-9.
17. Maron D, Katzenellenbogen J., Ames B.N. Compatibility of organic solvents with the *Salmonella*/microsome test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1981; 88 (4): 343-50.
18. Levy D.D., Zeiger E., Escobar P.A., Hakura A, van der Leede M. B.-J, Kato M et. al. Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). *Mut Research/Genetic Toxicol Environ Mutagenesis*. 2019; 848: 403074.
19. Egorova O.V., Demidova Yu.V., Ilyushina N.A. Assessment of experimental conditions affecting spontaneous mutation level of *Salmonella* strains used in the Ames test. *Gigiena i Sanitariya*. 2021;100 (7):736-43 (In Russian).
20. ICH Harmonised Tripartite Guideline S2(R1). Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. 2012. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s2r1-genotoxicity-testing-and-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use>

## ОБ АВТОРЕ:

**Егорова Ольга Валерьевна (Egorova Olga Valer'evna)**, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф.Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, г. Мытищи Московской области. E-mail: [egorovaov@fferisman.ru](mailto:egorovaov@fferisman.ru)

