



Егорова О.В., Демидова Ю.В., Илюшина Н.А.

Оценка экспериментальных условий, влияющих на уровень спонтанных мутаций штаммов *Salmonella*, используемых в тесте Эймса

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

Введение. Метод оценки частоты обратных генных мутаций на бактериях (тест Эймса) нашёл широкое применение в практике тестирования мутагенной активности химических веществ. Уровень спонтанного мутирования индикаторных культур является обязательной характеристикой, подлежащей контролю в лаборатории, выполняющей исследования с помощью теста Эймса. В связи с этим важной задачей является оценка факторов, которые могут влиять на уровень спонтанных мутаций в эксперименте и, следовательно, на общее заключение о мутагенности объекта испытания.

Материалы и методы. В эксперименте использовали стандартный чашечный тест без метаболической активации и в присутствии микросомной активирующей смеси.

Результаты. В настоящей работе обобщены данные исторического контроля, полученные в лаборатории в период 2016–2020 гг., установлены пределы колебаний числа ревертантных колоний по каждому штамму и выявлены факторы variability отрицательного контроля. Не обнаружено значимых отличий в формировании спонтанного фона индикаторных культур при использовании ДМСО или воды в качестве растворителей, пробирок из полипропилена или полистирола, а также чашек Петри разных типов. В случае культур TA1535, TA102 и TA100 не выявлено влияния присутствия смеси S9 в эксперименте на спонтанный фон реверсии ($p \leq 0,05$). Статистически достоверные отличия количества спонтанных ревертантов (при +S9 или -S9) были найдены для штаммов TA97 и TA98. Показано, что важными факторами, приводящими к variability исторического отрицательного контроля, являются объём селективной среды и марка желирующего агента в её составе.

Заключение. Для обеспечения качества экспериментов, согласно принципам надлежащей лабораторной практики и достоверности данных, получаемых с использованием метода оценки обратных генных мутаций, необходима стандартизация операций, предвещающих постановку теста Эймса.

Ключевые слова: оценка мутагенности; тест Эймса; обратные генные мутации; уровень спонтанного мутирования; *Salmonella*; отрицательный исторический контроль

Для цитирования: 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): 736-743. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743>

Для корреспонденции: Егорова Ольга Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, Мытищи. E-mail: egorovaov@fferisman.ru

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов: Егорова О.В. – концепция и дизайн исследования, сбор литературных данных, сбор материала, анализ результатов, статистическая обработка, написание текста; Демидова Ю.В. – сбор материала; Илюшина Н.А. – анализ результатов, написание текста. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила 20.04.2021 / Принята к печати 18.05.2021 / Опубликована 31.07.2021

Olga V. Egorova, Yuliya V. Demidova, Nataliya A. Ilyushina

Assessment of experimental conditions affecting spontaneous mutation level of *Salmonella* strains used in the Ames test

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

Introduction. The bacterial reverse gene mutations test (the Ames test) is widely used to assess chemicals' mutagenic activity. The spontaneous mutation level of test strains is a mandatory characteristic that has to be monitored in a laboratory performing mutagenicity studies using the Ames test. In this regard, it is important to assess the factors affecting the spontaneous mutation level in the experiment and, therefore, on the general conclusion on the test item mutagenicity.

Material and methods. A plate incorporation test version was used both in the presence and absence of a metabolic activation system.

Results. We summarized the historical control data obtained in the laboratory in 2016–2020, determine the fluctuation limits in the number of revertant colonies for each strain, and identify the factors affecting the negative control variability. No significant differences were found in the spontaneous background of test strains when using DMSO or water as solvents, polypropylene or polystyrene tubes, as well as Petri dishes of different types. In the case of the TA1535, TA102 and TA100 cultures, no influence of the presence of the S9 mixture on the spontaneous reversion range was revealed ($p \leq 0,05$). Statistically significant differences in the number of spontaneous revertants (at +S9 or -S9) were found for the strains that allow detecting frameshift mutations, TA97 and TA98. It has been shown that the volume of the selective medium and the brand of gelling agent in its composition are important factors leading to the variability of the historical negative control.

Conclusion. To ensure the quality of experiments according to the principles of good laboratory practice and the reliability of the data obtained using the bacterial reverse mutation method, it is necessary to standardize the operations in advance of experiments.

Keywords: mutagenicity assessment; Ames test; reverse gene mutations; spontaneous mutation level; *Salmonella*; negative historical control

For citation: 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 (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100 (7): 736-743. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743> (In Russ.)

For correspondence: Olga V. Egorova, MD, PhD, senior researcher of the department of genetic toxicology, "Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Mytishchi, 141014, Russian Federation. E-mail: egorovaov@fferisman.ru

Information about the authors:

Egorova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771>; Demidova Yu. V., <https://orcid.org/0000-0002-5356-2600>; Ilyushina N.A., <http://orcid.org/0000-0001-9122-9465>

Contribution: Egorova O.V. – the concept and design of the study, collection and processing of material, statistical analysis, writing a text; Demidova Yu.V. – collection of material; Ilyushina N.A. – processing of material, writing a text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received: April 20, 2021 / Accepted: May 18, 2021 / Published: July 31, 2021

Введение

Требования к проведению токсикологических экспериментов и необходимому набору тестов для обоснования гигиенических нормативов помимо определения параметров общей токсичности включают оценку специфических и отдалённых эффектов, в том числе и по критерию мутагенности. Оценка генетической опасности ДНК-тропных агентов основана на использовании батареи тестов, позволяющей выявлять генные, хромосомные и геномные мутации [1]. Выбор тестов зависит от физико-химических свойств соединения, особенностей его метаболизма, объёмов производства, а также вида продукции (лекарственные, косметические средства, ветеринарные препараты, пестициды и т. д.). Тем не менее ни одна процедура тестирования не обходится без проведения испытаний *in vitro*, результаты которых, как правило, служат основой для выбора последующих тестов [2].

Метод оценки частоты обратных генных мутаций на бактериях, известный как тест Эймса, нашёл широкое применение в практике тестирования химических веществ. Для оценки точечных мутаций, возникающих вследствие замены, вставки или делеции одной или нескольких пар оснований, используют ауксотрофные по аминокислотам штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* и/или *Escherichia coli* в условиях метаболической активации и без неё [3, 4]. Обширный массив данных, полученный в ходе экспериментальных работ при использовании теста Эймса, наряду с результатами изучения канцерогенности *in vivo* позволил разработать модели *in silico* для оценки канцерогенного потенциала химических веществ, исходя из их структурных особенностей. Прогностическая значимость данных, полученных в тесте Эймса, в отношении канцерогенного эффекта на животных оценивается на уровне 70–80% [4].

В ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора тест Эймса широко используют для оценки потенциальной мутагенной активности пестицидов [5, 6].

Существующие методические указания и рекомендации, детально описывающие рецепты приготовления селективных агаризованных сред, поддержание индикаторных культур, регламент проведения эксперимента, оценку результатов и пр., датированы 1980–1990-ми годами^{1,2,3}. Международный протокол тестирования с помощью метода оценки обратных генных мутаций на бактериях описан в руководстве Организации Экономического Сотрудничества и Развития (ОЕСД 471) и не пересматривался в течение долгого времени, хотя другие руководящие принципы испытаний на генотоксичность за последние десятилетия были неоднократно пересмотрены⁴. Последнее изменение руководства ОЕСД 471, датированное 26.07.2020 г., касается только уточнения номеров CAS этилированного и метилированного производных нитрозогуанидина. Перечисленные нормативные документы описывают общую стратегию тестирования химических веществ с помощью теста Эймса и оставляют простор для интерпретации экспериментальных подходов/практик в отдельных лабораториях.

При оценке данных могут быть использованы различные критерии для определения положительного результата, такие как статистически значимое увеличение числа колоний ревертантов на чашку по сравнению с отрицательным контролем или правило кратности [7]. Также при анализе

результатов проводят сравнение не только с соответствующим отрицательным контролем в отдельном опыте, но и сопоставляют с данными отрицательного исторического контроля, полученными в лаборатории за несколько лет. Помимо наличия зависимого от дозы и воспроизводимого увеличения числа ревертантов для оценки позитивного ответа необходимо, чтобы как минимум для одной из тестируемых концентраций превышение числа ревертантов находилось выше верхнего предела распределения исторического отрицательного контроля [8].

С учётом существующих критериев оценки мутагенной активности исследования потенциальных факторов, которые могут оказать влияние на количественные характеристики уровня спонтанного мутирования (УСМ), представляется актуальным [9, 10]. К настоящему времени известно, что колебания УСМ могут быть опосредованы использованием разных партий реагентов (агара, ростовых сред, S9), генетическим дрейфом штаммов при пересевах и т. д. [11–14]. Кроме того, внедрение принципов надлежащей лабораторной практики ведёт к необходимости унификации экспериментальных условий при проведении теста Эймса.

Цель настоящей работы – оценить факторы, которые могут оказать влияние на УСМ в эксперименте и, следовательно, на общее заключение о мутагенности объекта испытания. Акцентировано внимание на ряде практических аспектов, которые могут быть полезны специалистам научно-исследовательских лабораторий, использующим данный метод при тестировании химических веществ.

Материалы и методы

В исследованиях использовали штаммы *Salmonella typhimurium* В-5291 (ТА97 (hisD6610, rfa del, uvrB-bio, pKm101 Ap-r)), В-5294 (ТА98 (hisD3052, rfa del, uvrB-bio, pKm101 Ap-r)), В-5303 (ТА1535 (hisG46, rfa del, uvrB-bio)), В-5300 (ТА100 (hisG46, rfa del, uvrB-bio, pKm101 Ap-r)), В-5393 (ТА102 (hisG428, rfa del, pKm101 Ap-r, pAQ1)), полученные из Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ).

При выделении, хранении и проверке генотипов культур руководствовались методикой, описанной в [6, 14]. При рутинном генетическом анализе положительных контролями служили 2-аминоантрацен, циклофосфамид, 2-нитрофлуорен (2-NF), азид натрия (N₃Na), метилметансульфонат (ММС), митоминин С и 9-аминоакридин (9-AA). В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем (диметилсульфоксид (ДМСО) или дистиллированная вода).

Использовали стандартный чашечный тест без метаболической активации и в присутствии микросомной активирующей смеси с содержанием фракции S9 20–30% (15–22 мг/мл белка) [8]. Перед началом эксперимента аликвоты замороженного инокулята рабочей культуры, хранящиеся при $-70 \pm 5^\circ\text{C}$, высеивали в жидкую LB-среду и инкубировали в термостате при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14–16 ч до плотности приблизительно $1-3 \cdot 10^9/\text{мл}$. Определение мутности суспензии проводили с помощью денситометра DEN-1B (BioSan, Латвия) и стандартов мутности 0,5; 1; 2; 3; 4 единицы Мак-Фарланда (Pro-Lab Diagnostics, США).

Для получения постмитохондриальной фракции печени крыс (S9, концентрация белка 18–22 мг/мл) печёночные оксигеназы индуцировали внутрибрюшинным введением совола (300–350 мг/кг, однократно) самцам белых крыс со средней массой тела 150–180 г.

Объём нижнего минимального селективного агара, если не оговорено отдельно, составлял 25 ± 1 мл. Учёт числа ревертантных колоний осуществляли после инкубации бактерий в течение 68–72 ч при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с использованием автоматического цветного счётчика колоний InterScience Scan 500 (Франция) или вручную.

Оценку срока годности приготовленной селективной агаризованной среды проводили методом «выемок проб» (5–8 чашек) в условиях её хранения при $4 \pm 2^\circ\text{C}$ в zip-пакетах

¹ Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.В. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: метод. указание. М., 1985. 33 с.

² Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полухина Г.Н. Тест-система оценки загрязнителей среды на *S. typhimurium*. М.: ВИНТИ, 1997. 52 с.

³ Красовский Г.Н., Журков В.С., Жолдакова З.И. Методические указания по изучению мутагенной активности химических веществ при обосновании их ПДК в воде. М.: Минздрав СССР; Главное санитарно-эпидемиологическое управление, 1986. 23 с.

⁴ Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test // OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 1997. P. 11.

в течение 6 нед в двух независимых экспериментах. В качестве биологического показателя специфической активности среды анализировали число спонтанных ревертантов в отсутствие системы метаболической активации.

Статистическую обработку проводили с использованием программы SPSS Statistics v.22.0 (Корпорация IBM, Нью-Йорк, США). Для оценки результатов, полученных в тесте Эймса, использовали *t*-тест для независимых выборок (для сравнения двух групп), тест Даннетта (для трёх и более групп). Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Обобщённые данные исторического контроля, полученные в лаборатории в период 2016–2020 гг., приведены в табл. 1.

Анализ результатов, полученных при использовании в качестве отрицательных контролей растворителей (ДМСО или вода дистиллированная), не выявил влияния ДМСО на среднее число спонтанных ревертантных колоний ни у одного из штаммов (рис. 1, а, б).

Для штаммов TA1535, TA102 и TA100 не обнаружено влияния наличия или отсутствия метаболической активации в эксперименте на УСМ ($p \leq 0,05$). Статистически достоверные отличия количества колоний спонтанных ревертантов (+S9 или –S9) были найдены для штаммов, несущих мутации сдвига рамки считывания, TA97 и TA98, как в контрольных вариантах с ДМСО, так и H₂O (рис. 1, в, г).

Результаты исследования влияния агар-агара разных производителей, используемого для приготовления селективной среды, на УСМ приведены в табл. 2.

Статистически достоверных различий в числе спонтанных ревертантов в зависимости от типа желирующего агента в составе нижнего минимального агара для штаммов TA98, TA97 обнаружено не было. Для других индикаторных культур было установлено, что флуктуации УСМ могут зависеть от марки используемого агар-агара. Так, для штаммов TA100 и TA102 статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) в количестве ревертантов обнаружены при использовании агар-агара разных марок: для бактериологии, E406, Rapheas и Roereg. Тем не менее число ревертантов в отрицательном контроле находилось в пределах колебаний УСМ независимо от типа агара.

В качестве ещё одного фактора, потенциально способного оказать влияние на колебания УСМ, оценивали объём нижнего минимального агара (табл. 2, рис. 2, а).

Статистический анализ наличия зависимости количества спонтанных ревертантов от объёма среды выявил достоверное увеличение числа ревертантных колоний при увеличении объёма селективного агара в случае штаммов TA102, TA100 и TA97, но не TA98 и TA1535 ($p \leq 0,05$).

Исследование влияния объёма нижнего селективного агара на число индуцированных ревертантов при экспозиции с позитивными контролями выявило обратную зависимость за исключением штамма TA102. При увеличении объёма среды число индуцированных ревертантных колоний на чашку снижалось (рис. 2, б). При этом максимальные отличия наблюдали на штамме TA97, где число ревертантов на чашках с минимальным и максимальным объёмом селективного агара отличалось в 4 раза.

Оценка физических свойств (цвет, прозрачность, отсутствие признаков высыхания) приготовленного нижнего минимального агара и числа спонтанных ревертантов показала, что агаризованная среда может быть использована в течение изученного 6-недельного срока хранения (рис. 3).

Традиционно при постановке теста Эймса используют стеклянные пробирки (16 × 150 мм), соответствующие требованиям ГОСТ 25336-82. Для сокращения трудо- и временных затрат, а также обеспечения требований к чистоте используемой лабораторной посуды нами была оценена возможность использования одноразовых пробирок из полипропилена или полистирола разных производителей (табл. 3).

Таблица 1 / Table 1

Данные исторического отрицательного контроля в лаборатории для штаммов *S. typhimurium*, используемых в тесте Эймса

The data of negative historical laboratory control for *S. typhimurium* strains used in the Ames test

Параметр Parameter	ДМСО Dimethyl sulfoxide		H ₂ O	
	–S9	+S9	–S9	+S9
TA100				
Количество чашек Total of plates	464	460	309	169
Среднее ± σ* Mean ± σ*	105 ± 25	115 ± 26	119 ± 22	129 ± 22
Мин/Макс Min/Max	61/181	61/191	71/172	78/189
Среднее ± 2σ Mean ± 2σ	55–155	63–167	75–163	85–173
TA102				
Количество чашек Total of plates	356	353	245	158
Среднее ± σ* Mean ± σ*	127 ± 30	142 ± 30	143 ± 26	159 ± 28
Мин/Макс Min/Max	67/226	72/230	64/219	78/244
Среднее ± 2σ Mean ± 2σ	67–187	82–203	91–195	98–210
TA1535				
Количество чашек Total of plates	355	356	293	130
Среднее ± σ* Mean ± σ*	20 ± 6	16 ± 6	19 ± 6	17 ± 5
Мин/Макс Min/Max	5/36	3/40	3/33	4/29
Среднее ± 2σ Mean ± 2σ	8–32	4–26	7–31	7–27
TA97				
Количество чашек Total of plates	409	405	216	142
Среднее ± σ* Mean ± σ*	113 ± 28	136 ± 32**	121 ± 17	149 ± 22**
Мин/Макс Min/Max	56/207	51/211	75/174	77/195
Среднее ± 2σ Mean ± 2σ	57–169	72–200	87–155	105–193
TA98				
Количество чашек Total of plates	351	346	244	128
Среднее ± σ* Mean ± σ*	25 ± 5	31 ± 9**	26 ± 7	36 ± 10**
Мин/Макс Min/Max	12/58	12/58	11/46	12/59
Среднее ± 2σ Mean ± 2σ	15–35	16–48	12–40	16–56

Примечание. * – среднее квадратичное отклонение (СКО); ** – статистически значимые отличия, $p \leq 0,05$.

Note. * – standard deviation, (SD), ** – statistical significance, $p \leq 0.05$.

Original article

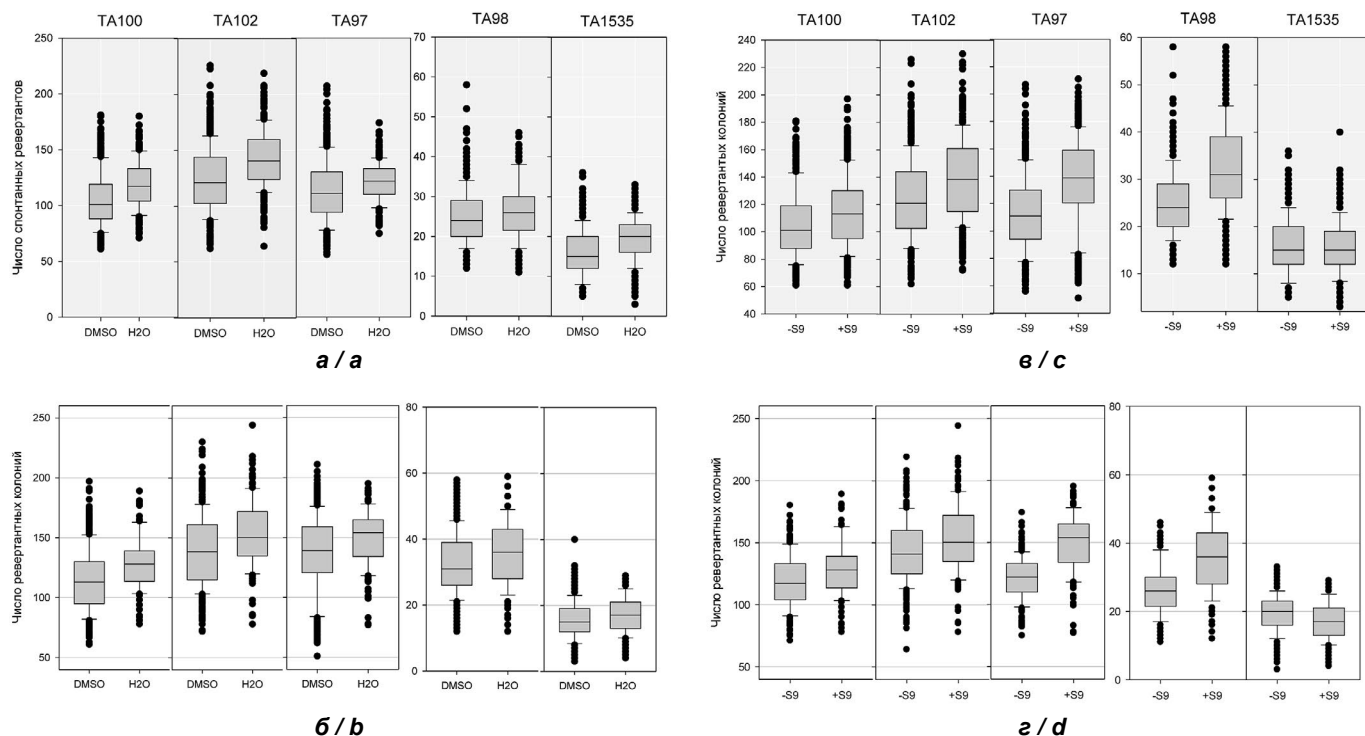


Рис. 1. Число спонтанных ревертантов колоний штаммов *S. typhimurium* на чашку в присутствии растворителей и/или метаболической активации: *а* – без метаболической активации (–S9); *б* – в присутствии S9 (+S9); *в* – ДМСО (DMSO); *г* – H₂O дист.

Fig. 1. The number of spontaneous revertants of *S. typhimurium* per plate in the presence of vehicles or metabolic activation system: *a* – without metabolic activation (–S9); *b* – in the presence of S9 (+S9); *c* – DMSO (DMSO); *d* – H₂O dist.

Таблица 2 / Table 2

Влияние агар-агара, используемого при приготовлении нижнего минимального агара, на фон спонтанного мутирования штаммов *S. typhimurium**

The effect of agar-agar used for the preparation of the bottom minimal agar on the spontaneous mutation level of *S. typhimurium* strains*

Штамм Strain	Тип агар-агара Type of agar-agar					
	Для бактериологии (Диам) Bacteriology grade (Dia-M LLC)	E406 (Германия) E406 (Germany)	Для бактериологии, американский тип (Диам)** Bacteriological American type, (Dia-M LLC)	Рангеас, американский тип (Испания) Panreac, American type (Spain)	Роерер, СЕРО (Германия) Roeper, CERO, (Germany)	Хеликон, для бактериологии (США) Helicon, Bacteriology grade (USA)
TA97, n = 143	126 ± 16	125 ± 10	129 ± 12	137 ± 12	136 ± 16	137 ± 19
TA98, n = 100	30 ± 5	27 ± 8	27 ± 6	30 ± 8	25 ± 7	29 ± 5
TA100, n = 116	138 ± 19 (p = 0,003)	137 ± 30 (p = 0,003)	112 ± 24	140 ± 13 (p = 0,003)	138 ± 12 (p = 0,001)	117 ± 29
TA1535, n = 149	22 ± 6	24 ± 5 (p = 0,005)	20 ± 4	22 ± 5	18 ± 4	19 ± 5
TA102, n = 177	166 ± 24 (p = 0,000)	152 ± 26 (p = 0,004)	134 ± 16	168 ± 20 (p = 0,000)	148 ± 17 (p = 0,037)	138 ± 26
Штамм Strain	Объём нижнего минимального агара, мл Volume of the bottom minimal agar, ml					
	15**	20	25	30		
TA97, n = 80	98 ± 9	114 ± 13 (p = 0,001)	115 ± 14 (p = 0,000)	115 ± 16 (p = 0,000)		
TA98, n = 92	22 ± 5	23 ± 5	23 ± 4	24 ± 5		
TA100, n = 72	80 ± 9	94 ± 24 (p = 0,031)	118 ± 13 (p = 0,000)	122 ± 17 (p = 0,000)		
TA1535, n = 100	20 ± 4	20 ± 5	18 ± 5	18 ± 5		
TA102, n = 96	102 ± 11	118 ± 9 (p = 0,000)	132 ± 9 (p = 0,000)	134 ± 10 (p = 0,000)		

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – суммированы данные 3 независимых экспериментов, среднее число ревертантов ± σ, V селективного агара = 25 мл, отрицательный контроль – вода дист., в отсутствие системы метаболической активации. Если не указано, то p ≥ 0,05; ** – группа сравнения.

Note. * Here and in Table 3: independent experiments are summarized, the mean number of revertants ± σ, V of selective agar = 25 ml, negative control – dist. water, in the absence of a metabolic activation system. If not specified then p ≥ 0,05. ** a comparison group.

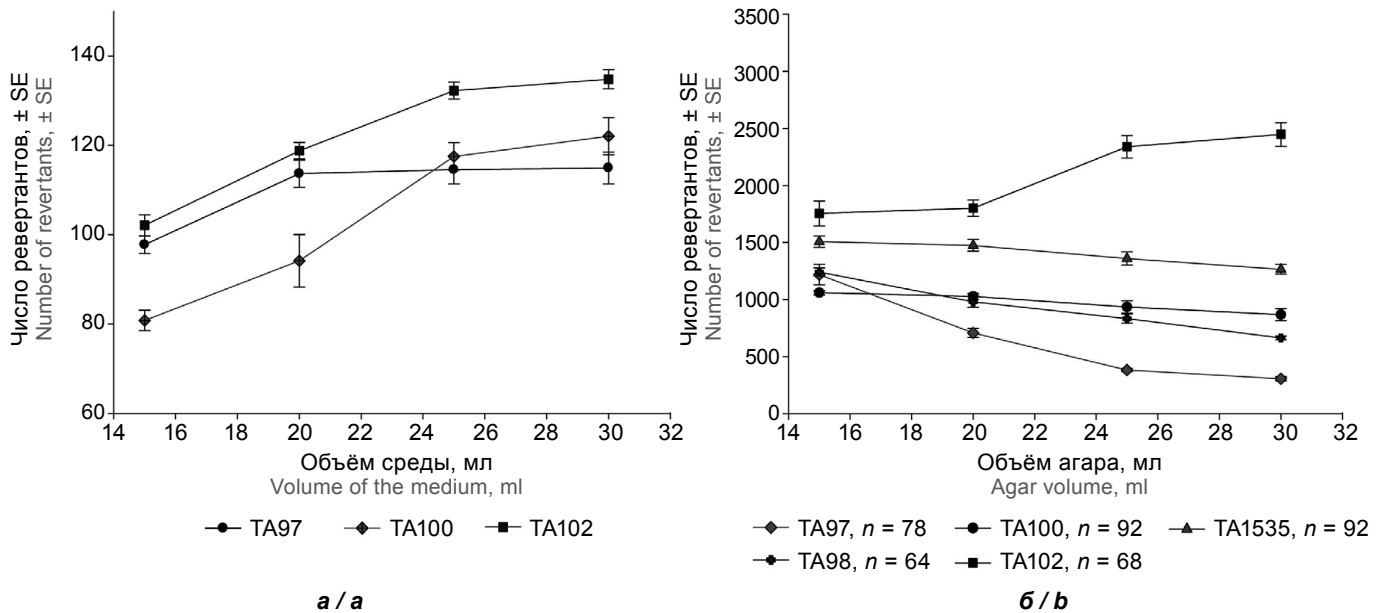


Рис. 2. Число ревертантов *S. typhimurium* на чашку в зависимости от объёма нижнего минимального агара: а – спонтанные ревертанты (spontaneous revertants); б – индуцированные ревертанты (induced revertants) (9-AA – 50 мкг/чашка; N₃Na – 10 мкг/чашка, 2-NF – 10 мкг/чашка, 2; MMC – 5 мкг/чашка).

Fig. 2. The number of revertants per plate depending on the volume of the bottom minimal agar: а – spontaneous revertants; б – induced revertants (9-AA – 50 µg / plate; N₃Na – 10 µg / plate, 2-NF – 10 µg / plate; MMC – 5 µg / plate).

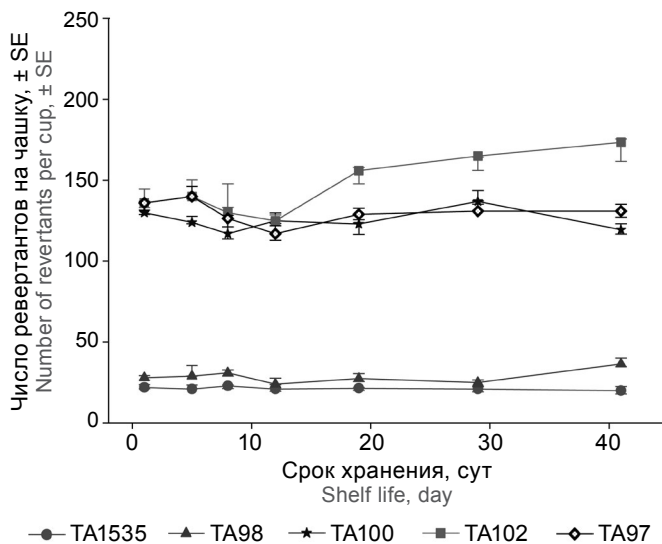


Рис. 3. Среднее число спонтанных ревертантов на чашках в зависимости от срока хранения.

Fig. 3. The mean number of spontaneous revertants per plate depending on storage life.

Полученные результаты также свидетельствуют об отсутствии каких-либо статистически значимых отличий в УСМ индикаторных культур в зависимости от типа используемой посуды, за исключением штамма TA97, в варианте проведения эксперимента в пробирках типа Эппендорф из полипропилена (Ningpro Greetmed Medical) в присутствии S9. Тем не менее и для этого варианта число спонтанных ревертантных колоний находилось в пределах колебаний исторического контроля.

Данные о числе спонтанных ревертантных колоний в зависимости от типа используемых чашек Петри представлены

в табл. 3. Как следует из полученных данных, для всех индикаторных культур статистически достоверных отличий между числом спонтанных ревертантных колоний и типом используемых чашек Петри обнаружено не было. Однако при автоматическом подсчёте колоний мы рекомендуем использовать неветилируемые чашки Петри (ООО «Минимед») ввиду отсутствия «бликов» в пристеночной зоне чашки, которые ошибочно распознаются программным обеспечением как колонии.

Обсуждение

Уровень спонтанного мутирования тест-штаммов является одной из обязательных характеристик, которые подлежат контролю в лаборатории, выполняющей исследование по оценке мутагенности с помощью теста Эймса. При этом, как показал анализ литературных источников, спонтанный фон мутирования, установленный для одного и того же штамма, может значительно варьировать в разных лабораториях. Например, для исторического отрицательного контроля *S. typhimurium* TA100 приведены данные в диапазонах 45–200, 120–200, 61–130 и 80–235 колоний на чашку [3, 10, 15–17]. Также обращают на себя внимание результаты анкетирования 87 лабораторий, использующих тест Эймса. Разброс среди данных исторических контролей в опрошенных лабораториях составил 2–76 для TA1535, 1–80 для TA1537, 2–90 для TA 98 и 20–336 для TA100 [18]. В работе [10] приведены результаты анализа УСМ четырёх штаммов *S. typhimurium* и одного штамма *E. coli* WP2 *uvrA*, полученные 30 лабораториями Японского общества по мутагенам окружающей среды за 2013–2016 гг. в рамках цикла работ по валидации и обеспечению качества экспериментов и достоверности данных. Число спонтанных ревертантов было подвержено незначительным колебаниям за указанный период и находилось в пределах среднего значения ± 3СКО, например, 5–18 для TA1535, 17–42 для TA98 и 78–156 для TA100 (+S9). Проведённые исследования показали, что стандартизация протокола с учётом факторов, которые могут оказать влияние на число спонтанных ревертантов, приводит к снижению variability колебаний УСМ.

Влияние посуды, используемой в тесте Эймса, на фон спонтанного мутирования *S. typhimurium**The effect of plastic ware used in the Ames test on the spontaneous mutation level of *S. typhimurium* strains*

Штамм Strain	Тип пробирок / Tubes									
	Стекло, 16 × 150 мм, 23 мл** Glasses, 16 × 150 mm, 23 ml		Полипропилен, 12 × 80 мм, Италия, Nuova Aptaca, 5 мл Polypropylene, 12 × 80 mm, Italy Nuova Aptaca, 5 ml		Полипропилен, 12 × 80 мм, Италия, FI Medical, 5 мл Polypropylene, 12 × 80 mm, Italy FI Medical, 5 ml		Полистирол, 12 × 75 мм, Италия, FI Medical, 5 мл Polystyrene, 12 × 75 mm, Italy, FI Medical, 5 ml		Полипропилен, 15 × 62 мм, Китай, Ningpo Greetmed Medical, 7 мл Polypropylene 15 × 62 mm, China, Ningpo Greetmed Medical, 7 ml	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
TA97, n = 167	99 ± 8	124 ± 11	100 ± 8	132 ± 17	101 ± 12	123 ± 15	87 ± 11	122 ± 11	98 ± 12	137 ± 18 (p = 0,031)
TA98, n = 147	21 ± 4	31 ± 7	19 ± 4	32 ± 7	18 ± 5	34 ± 7	18 ± 4	28 ± 7	17 ± 6	36 ± 8
TA100, n = 248	88 ± 14	101 ± 17	102 ± 16	108 ± 12	93 ± 15	101 ± 13	93 ± 12	104 ± 18	89 ± 17	101 ± 18
TA1535, n = 146	16 ± 4	17 ± 6	18 ± 5	15 ± 5	17 ± 4	15 ± 3	16 ± 3	14 ± 4	17 ± 6	16 ± 6
TA102, n = 146	105 ± 13	119 ± 18	116 ± 20	115 ± 15	114 ± 20	113 ± 18	114 ± 9	119 ± 18	112 ± 15	116 ± 17

Штамм Strain	Тип чашек The Petrie dish					
	90 мм, вентилируемые** 90 mm, vented		100 мм, вентилируемые 100 mm, vented		90 мм, не вентилируемые 90 mm, unventilated	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
TA97, n = 143	109 ± 14	156 ± 22	117 ± 20	147 ± 28	113 ± 15	147 ± 21
TA98, n = 127	21 ± 4	34 ± 7	22 ± 7	31 ± 8	21 ± 5	33 ± 6
TA100, n = 131	115 ± 10	125 ± 13	116 ± 9	127 ± 15	112 ± 8	116 ± 17
TA1535, n = 160	18 ± 4	18 ± 4	20 ± 5	19 ± 5	18 ± 4	17 ± 5
TA102, n = 143	134 ± 12	145 ± 18	128 ± 20	145 ± 17	125 ± 12	139 ± 19

Полученные нами результаты анализа исторического контроля лаборатории за 2016–2020 гг. свидетельствуют о том, что описанные колебания спонтанного фона мутирования соответствуют ранее опубликованным. В работе Ахальцевой Л.В. с соавт. [9] приведены данные, полученные в 2004–2014 гг. для контрольных групп (вода и ДМСО) трёх штаммов бактерий из того же источника ВКПМ ФГУП «ГосНИИГенетика» в вариантах ± S9. Анализ результатов, полученных в двух независимых лабораториях, показал, что диапазоны колебаний для изученных культур TA100, TA97 и TA98 (среднее ± 2σ) были сопоставимы. Аналогично данным нашего исследования использование ДМСО в стандартной приемлемой концентрации (100 мкл на чашку) не влияло на среднее число ревертантных колоний как в присутствии, так и в отсутствие S9. В то же время в отличие от результатов настоящего исследования авторами не было обнаружено влияния фракция S9 на среднее число ревертантов у штаммов, несущих мутации сдвига рамки считывания, TA97 и TA98, как в контрольных вариантах с ДМСО, так и с H₂O. Тем не менее в литературе имеются указания о более высоких значениях верхних и нижних пределов распределения числа спонтанных ревертантов в варианте с метаболической активацией [3, 14]. Кроме того, количество спонтанных ревертантов, например, как это было установлено для культуры TA102 в межлабораторных исследованиях, подвержено колебаниям даже при условии получения штамма из одной и той же постоянной культуры без последующих пересевов [12].

К критически важным аспектам при проведении теста, оказывающим качественное и количественное влияние на результаты, относят стабильность и цитотоксичность тестируемого соединения, выбор доз, растворителя, концентрации микросомной фракции, ростовые характеристики тест-штаммов [7, 14, 19, 20].

В качестве факторов, влияющих на колебания УСМ, могут выступать использование разных типов агар-агара,

наличие S9, генетический дрейф штаммов при пересевах, температурный режим и продолжительность инкубирования культуры на чашках с нижним минимальным агаром [21, 22]. В ряде исследований приводятся данные о чувствительности культур к разновидности агар-агара, который был использован при приготовлении селективной среды. Например, при тестировании нескольких марок желирующего агента разных производителей (Gibco, Difco, Beckton Dickinson и пр.) для штамма TA97а минимальное среднее число спонтанных ревертантных колоний в присутствии ДМСО составило 7 (–S9) и 12 (+S9) при использовании агар-агара Difco Bitek, максимальное – 189 (–S9) и 278 (+S9) в случае Difco bacto [23]. Аналогичные данные были получены для *E. coli* uvrA, разброс среднего числа спонтанных ревертантов при использовании ДМСО составил 6 (агар-агар Oxoid № 1) – 88 (Gibco Select) [24].

Сведения о влиянии объёма селективной среды на УСМ бактерий *S. typhimurium* в доступной литературе ограничены. В работе De Raat с соавт. [21] изучено влияние объёма нижнего минимального агара и типа используемого желирующего агента (Difco, Oxoid, Kober) на спонтанный фон. Наиболее заметные отличия были также установлены для штаммов с высоким спонтанным числом ревертантов.

Как следует из полученных нами данных, объём селективной среды и марка используемого желирующего агента могут оказывать влияние на число ревертантных колоний в отрицательном контроле у штаммов, характеризующихся наличием высокого УСМ: TA102, TA97, TA100. У штаммов TA1535 и TA98 с низким фоновым уровнем мутирования колебания спонтанных мутаций не зависели от изученных факторов.

Хотя найденные изменения числа спонтанных ревертантов в зависимости от тех или иных причин находились в пределах колебаний исторического контроля, такие изменения могут служить источником большого разброса получаемых результатов.

Для веществ с доказанной мутагенной активностью показана вариабельность индуцированного фона ревертантов в зависимости от объёма нижнего агара. В случае 2-NF наблюдали увеличение числа индуцированных ревертантов при уменьшении объёма среды, в то время как проявление мутагенной активности бенз(а)пирена слабо коррелировало с увеличением объёма среды. Отмечаемые эффекты авторы связывали со способностью соединений диффундировать в агар [25].

Аналогичные результаты были получены на штамме TA98 при тестировании 2-NF на минимальной среде, приготовленной по классическому протоколу. При добавлении гистидина в состав не только верхнего, но и нижнего агара отмечали обратный эффект: рост числа индуцированных ревертантов при увеличении объёма среды. Наблюдаемое проявление мутагенной активности 2-NF авторы связывали с вероятным процессом диффузии гистидина из верхнего агара, не рассматривая тот факт, что вероятность возникновения мутаций увеличивается за счёт большего числа делений бактерий при дополнительном внесении гистидина [26].

Наши исследования с применением известных мутагенов также показали, что использование чашек с разным объёмом селективной среды приводит к колебаниям числа индуцированных ревертантов, что в свою очередь может быть источником не только значимой вариабельности результатов при постановке повторов на одной и той же концентрации, но и исказить анализ при оценке наличия дозовой зависимости.

В основе эффекта уменьшения числа индуцированных ревертантов TA100, TA97, TA98 и TA1535 при увеличении объёма нижнего агара, возможно, лежат процессы диффузии. Например, следствием увеличения объёма среды является уменьшение концентрации диффундируемого вещества, обладающего мутагенной активностью, и как следствие — снижение числа индуцированных ревертантных колоний. Кроме того, следует принимать во внимание физи-

ко-химические свойства мутагенов, в частности их стабильность, растворимость и т. д. Например, летучесть азида натрия показана в работе [25].

Исследований, посвящённых изучению влияния типа использованной посуды и срока хранения готовой селективной среды на УСМ индикаторных культур, в доступной литературе не найдено. Наши исследования показали, что не происходила потеря качества среды после 6-недельного хранения нижнего минимального агара при 4 ± 2 °C.

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании проанализированы данные о УСМ, полученные в 2016–2020 гг., установлены пределы колебания числа спонтанных ревертантных колоний по каждому штамму и выявлены факторы, влияющие на УСМ. Поскольку для штаммов, позволяющих выявлять мутации сдвига рамки считывания, выявлена статистически достоверная зависимость числа спонтанных ревертантов от наличия системы метаболической активации, представляет целесообразным формирование отдельного исторического контроля для двух вариантов (+S9/–S9) по каждой культуре.

Показано, что важным фактором, приводящим к вариабельности исторического отрицательного контроля, является объём селективной среды, и подтверждено влияние на этот показатель марки желирующего агента. Присутствующие на рынке в Российской Федерации марки агар-агара средней ценовой категории могут быть использованы при проведении теста. Пробирки из полипропилена или полистирола являются приемлемой альтернативой стеклянным, и их использование позволяет снизить трудозатраты при подготовке посуды.

Для обеспечения качества экспериментов согласно принципам надлежащей лабораторной практики и достоверности данных, получаемых с использованием метода оценки обратных генных мутаций, необходима стандартизация операций, предвещающих постановку теста Эймса.

Литература

(п.п. 1–8, 10–26 см. References)

- Ахальцева Л.В., Журков В.С., Сычёва Л.П., Кривцова Е.К. Генетическая оценка контрольных вариантов штаммов *Salmonella typhimurium*, используемых в тесте *Salmonella*/микросомы (тест Эймса). *Гигиена и санитария*. 2015; 94(7): 103–5.
- Eastmond D., Hartwig A., Anderson D., Anwar W., Cimino M., Dobrev I., et al. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*. 2009; 24(4): 341–9. <https://doi.org/10.1093/mutage/gep014>
- 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. *Mutat. Res.* 2019; 848: 403075. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.005>
- Maron D., Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983; 113(3–4): 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Zeiger E. Bacterial Mutation Assays. *Methods Mol. Biol.* 2013; 1044: 3–26. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_1
- Ilyushina N., Egorova O., Rakitskii V. Limitations of pesticide genotoxicity testing using the bacterial *in vitro* method. *Toxicol. in Vitro*. 2019; 57: 110–6. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.018>
- Egorova O.V., Ilyushina N.A., Rakitskii V.N. Mutagenicity evaluation of pesticide analogs using standard and 6-well miniaturized bacterial reverse mutation tests. *Toxicol. in Vitro*. 2020; 69: 105006. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105006>
- 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). *Mutat. Res.* 2019; 848: 403074. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004>
- Schoeny R., Cross K.P., DeMarini D.M., Elespuru R., Hakura A., Levy D.D., et al. Revisiting the bacterial mutagenicity assays: Report by a workgroup of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutat. Res.* 2020; 849: 503137. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503137>
- Akhaltseva L.V., Zhurkov V.S., Sycheva L.P., Krivtsova E.K. Genetic evaluation of control variants of strains *Salmonella typhimurium*, used in the test *salmonella*/microsome (Ames test). *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2015; 94(7): 103–5. (in Russian)
- Kato M., Sugiyama K.I., Fukushima T., Miura Y., Awogi T., Hikosaka S., et al. Negative and positive control ranges in the bacterial reverse mutation test: JEMS/BMS collaborative study. *Genes Environ.* 2018; 40: 7. <https://doi.org/10.1186/s41021-018-0096-1>
- Herbold B.A., Arni P., Driesel A., Engelhardt G., Jäger J., Joosten H.F., et al. Criteria for the standardization of *Salmonella* mutagenicity tests: results of a collaborative study. II. Studies to investigate the effect of bacterial liquid culture preparation conditions on *Salmonella* mutagenicity test results. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1983; 3(2): 187–93. [https://doi.org/10.1002/1520-6866\(1990\)3:2%3C187::aid-tcm1770030211%3E3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/1520-6866(1990)3:2%3C187::aid-tcm1770030211%3E3.0.co;2-u)
- Müller W., Engelhart G., Herbold B., Jäckh R., Jung R. Evaluation of mutagenicity testing with *Salmonella typhimurium* TA102 in three different laboratories. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101(Suppl. 3): 33–6. <https://doi.org/10.1289/ehp.101-1521147>
- Aeschbacher H.U., Friederich U., Seiler J.P. Sensitivity of *S. typhimurium* TA97a to the type of agar used for preparation of Vogel-Bonner plates. *Mutagenesis*. 1983; 3(2): 195–203.
- Mortelmans K., Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 2000; 455(1–2): 29–60. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6)
- Kamath G.H., Rao K.S. Genotoxicity guidelines recommended by International Conference of Harmonization (ICH). *Methods Mol. Biol.* 2013; 1044: 431–58. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_24

Original article

16. Diehl M.S., Willaby S.L., Snyder R.D. Comparison of the results of a modified miniscreen and the standard bacterial reverse mutation assays. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 36(1): 72–7. [https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2000\)36:1%3C72::aid-em10%3E3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2000)36:1%3C72::aid-em10%3E3.0.co;2-y)
17. Pant K., Bruce S., Sly J., Laforce M.K., Springer S., Cecil M., et al. Bacterial mutagenicity assays: Vehicle and positive control results from the standard Ames assay, the 6- and 24-well miniaturized plate incorporation assays and the Ames II™ assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 2016; 57(6): 483–96. <https://doi.org/10.1002/em.22014>
18. Friederich U., Würigler F.E. The *Salmonella*/mammalian-microsome assay: variations of the test protocol; results of a questionnaire returned by 87 laboratories. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1983; 3(2): 177–82. [https://doi.org/10.1002/1520-6866\(1990\)3:2%3C177::aid-tcm1770030209%3E3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1520-6866(1990)3:2%3C177::aid-tcm1770030209%3E3.0.co;2-a)
19. Cheli C., DeFrancesco D., Petrullo L.A., McCoy E.C., Rosenkranz H.S. The *Salmonella* mutagenicity assay: reproducibility. *Mutat. Res.* 1980; 74(2): 145–50. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(80\)90239-3](https://doi.org/10.1016/0165-1161(80)90239-3)
20. Maron D., Katzenellenbogen J., Ames B.N. Compatibility of organic solvents with the *Salmonella*/microsome test. *Mutat. Res.* 1981; 88(4): 343–50. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(81\)90025-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(81)90025-2)
21. De Raat W.K., Willems M.I., de Meijere F.A. Effects of amount and type of agar on the number of spontaneous revertants in the Ames test. *Mutat. Res.* 1984; 137(1): 33–7. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(84\)90109-5](https://doi.org/10.1016/0165-1218(84)90109-5)
22. Friederich U., Aeschbacher H.U., Seiler J.P., Würigler F.E. The *Salmonella*/microsome assay: some possible causes for interlaboratory variations. *Mutat. Res.* 1982; 103(2): 133–220. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90018-5)
23. Wilcox P., Wedd D.J., Williams W.R.D., Mee C.D., O'Donovan M.R. Sensitivity of *Salmonella typhimurium* TA97a to the type of agar used for preparation of Vogel-Bonner plates. *Mutagenesis.* 1992; 7(1): 13–8. <https://doi.org/10.1093/mutage/7.1.13>
24. Majeska J.B., Holden H.E., Studwell D. Selection of agar for use in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* mutation assays. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998; 32(2): 192–6.
25. Wilson J.D. Jr., Cariello N.F. The Ames miniscreen assay: volatility of sodium azide can cause an increase in the reversion frequencies of adjacent, untreated wells. *Environ. Mol. Mutagen.* 1997; 29(2): 217–9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1997\)29:2%3C217::aid-em12%3E3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1997)29:2%3C217::aid-em12%3E3.0.co;2-h)
26. Belser W.L. Jr., Shaffer S.D., Bliss R.D., Hynds P.M., Yamamoto L., Pitts J.N. Jr., et al. A standardized procedure for quantification of the Ames *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Environ. Mutagen.* 1981; 3(2): 123–39. <https://doi.org/10.1002/em.2860030204>