

## К вопросу ускоренного выявления токсических продуктов в объектах внешней среды и биологических пробах

**В** распоряжении исследователей и практических лабораторий имеется большой арсенал методов оценки наличия в исследуемом материале токсичных для человеческого организма веществ и их идентификации.

ФБУН ГНЦ ПМБ в своей практической работе по расшифровке вспышек инфекционных болезней и проявлений токсических состояний, вызванных токсинами биологического происхождения, использует многие из этих методов, что приносит в большинстве случаев положительный результат.

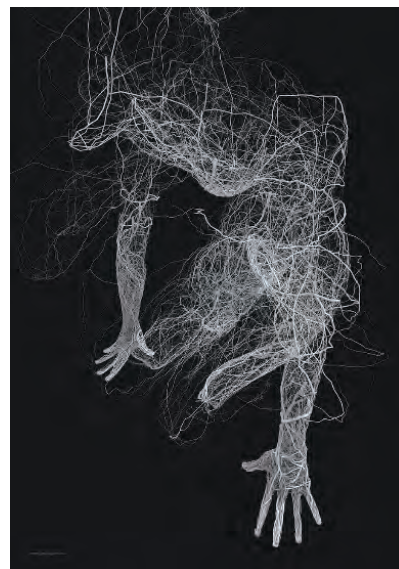
В 2010 г., при разработке проблемы оценки безопасности наноматериалов в рамках кампании по развитию нанотехнологий, большим количеством учреждений был создан документ: «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов» Методические указания МУ 1.2.2635–10, 122 с. В нем были собраны практически все известные и используемые на практике методы оценки токсичности различных молекул и объектов, которые предлагалось применять при оценке наноматериалов. По существу, эти методики были разработаны ранее и применяются сейчас для оценки любых объектов (проб), предположительно содержащих токсические продукты для людей. Появились также новые высокоэффективные подходы.

Для индикации наличия токсинов в пробах, предполагающей ускоренное, в течение одного часа, определение факта токсичности, из этих методов на сегодняшний день можно использовать только 2–3, и то при целенаправленной доработке и апробации.

По прошествии более 12 лет с момента выхода данных методических указаний появилось крайне мало новых подходов к идентификации и индикации токсинов. В частности, развился метод масс-спектрометрии, позволяющий идентифицировать токсины по структуре молекулы не только в чистом виде, но и в загрязненных пробах и даже срезах тканей. Существующие международные базы данных являются основой для такой идентификации. ГНЦ ПМБ располагает таким суперсовременным оборудованием и взаимодействует с НИУ РАН в г. Пущино, где также есть необходимые приборы и базы. Однако такое оборудование может быть использовано только для финальной идентификации, а не индикации.

Из имеющихся и освоенных в свое время в ГНЦ ПМБ методов определения фактора острой токсичности для индикации могут быть использованы только два: метод биопроб на лабораторных животных и метод с использованием живого биообъекта (инфузория туфелька). Инфузории типа *Tetrahymena piriformis*, *Paramecium caudatum*, *Stylonychia mytilus* имеют сходство с высшими животными по ряду основных параметров обмена веществ, поэтому используются для ускоренного выявления токсинов (ГНЦ ПМБ проводил ранее такие работы). Преимущества их перед другими живыми организмами заключается в том, что агент в водной среде воздействует на инфузорию не только изнутри, вследствие его заглатывания и переваривания, но и снаружи, так как частично, в отличие от высших животных, инфузория питается путем всасывания через свои мембраны, покрытые многочисленными порами, простых пищевых веществ (аминокислоты, соли, витамины). На эти же оболочки действуют и токсины, присутствующие в исследуемом продукте. В результате не только резко сокращается время выявления токсического действия образца, но и возрастает чувствительность к минимальным концентрациям агента, не улавливаемым организмом высших животных, имеющих более мощные механизмы защиты от многих вредных факторов внешней среды.

Инфузории хорошо существуют в среде, где есть плотные частицы, в связи с чем стерилизованное и ультрапастеризованное молоко является хорошей питательной средой ввиду того, что в процессе высоко-



температурной обработки продукта происходит коагуляция белка, имеющего вид плотных частиц. Липиды, витамины, глюкоза такими стимулирующими свойствами не обладают. Основные методические подходы при оценке токсичности на инфузориях описаны в Методических указаниях к проведению биологической оценки кормов и пищевых продуктов (А.Д.Игнатьев и др., Москва, 1980).

Из всего массива литературы по данному вопросу видно, что есть множество модификаций и подходов к реализации этих методов, однако универсального, широко распространенного подхода нет.

Множество других методов определения токсичности, связанных, например, с использованием культур клеток, макрофагов, тестов на цитотоксичность типа «анализ нейтрального красного», «МТТ-тест», «активность лактатдегидрогеназы» и прочих, не подходят для индикационных исследований в широкой практике в силу высокой сложности и длительности процедур.

В связи с этим разработка направления по индикации и дальнейшей идентификации возможного токсичного агента в различных пробах (вода, пища, биологические жидкости) может быть связана с разработкой общей, доступной для практических лабораторий аналитической схемы. Эта схема должна базироваться на стандартизованных методах первичного определения острой токсичности исследуемого материала, причем не исключена возможность разработки принципиально новых методов детекции токсичности при использовании других биомоделей, что потребует интенсивных поисковых исследований.

Одним из направлений выявления токсинов в пробах является использование микроорганизмов, «обличителей токсинов», которые реагируют на очень низкие концентрации содержания токсинов в пробах. Такие разработки проводились за рубежом, и в ГНЦ ПМБ испытывалась канадская тест-система для выявления токсинов в воде, основанная на нескольких индикаторных микроорганизмах, которая показала хорошие результаты. Однако отсеять эти культуры для дальнейшего использования не удалось, так как они росли только в одной генерации. Проблема сложная, но современными генетическими методами может быть решена.

Следует также иметь в виду, что токсины могут вызывать хронические поражения клеток и тканей организма и методами биопроб в экстренных индикационных экспериментах их выявить не удастся.

Проблемы, связанные с дальнейшей идентификацией самого токсина, могут быть решены только на основе определения химической или биологической природы токсина.

В отношении идентификации биологических токсинов ГНЦ ПМБ имеет все возможности для создания линейки препаратов и методов их выявления на основе моноклональных антител (в различных вариантах биодетекции) и масс-спектрометрического анализа. Количество моноклональных антител по видам токсинов может быть существенно увеличено, так как технология их получения поставлена и работает в постоянном режиме.

Из наиболее важных для биологической безопасности токсинов следует отметить холерный токсин, шигатоксин второго типа, ботулотоксин, рицин, пять стафилококковых токсинов, летальный токсин сибирской язвы и другие хорошо известные токсины.

Следует иметь в виду, что в террористических или военных целях могут быть использованы и другие, отличные от этих распространенных, пищевые токсины из природных источников (растения, грибы, моллюски, рыбы и др.), которые могут быть в настоящее время достаточно легко клонированы и получены в больших количествах с использованием микробных штаммов-продуцентов. К таким природным токсинам относятся: Ciguatoxin, Shellfish toxins (PSP, DSP, NSP, ASP, AZP), Scombrototoxin, Tetrodotoxin, Mushroom toxins, Aflatoxins, Gempylotoxin, Pyrrolizidine alkaloids, Venomous fish, Grayanotoxins, Phytohaemagglutinin. Для этих групп токсинов в нашей стране практически отсутствуют тест-системы для идентификации, а тем более средства купирования вызванных ими состояний.

Сравнение токсичности (по медиане смертельной дозы – LD<sub>50</sub> в мкг/кг для лабораторных мышей) более 20 известных токсинов различного происхождения, включая протеотоксины, а также низкомолекулярные токсины, показывает, что токсичность варьирует в широком диапазоне: 0,001–0,002 (ботулотоксин, шигатоксин 2, тетанус, SEB), 0,1 (дифтерийный токсин), 0,1–5 (*Clostridium perfringens*), 0,7 (абрин), 3,0 (рицин), 8,0 (Tetrodotoxin), 100,0 (аконитин), 1200 (Т-2). Механизмы действия токсинов и мишени клеток млекопитающих также сильно отличаются.

Вследствие этого задача по индикации токсинов (без использования животных моделей) в окружающей среде и пищевых продуктах представляется чрезвычайно сложной. Новые разрабатываемые методы индикации токсинов должны отличаться высокой чувствительностью, специфичностью, автономностью, быстротой, удобством в применении, производительностью и низкой себестоимостью.

В последние годы для индикации токсинов используются автономные мультиплексные платформы, основанные главным образом на иммунохимических методах в форматах иммунохроматографии, иммуночипов и различных типов биосенсоров (электрохимические, иммуноферментные и иммунофлуоресцентные).

Завершенной разработкой в области биодетекции токсинов является портативный детектор патогенов фирмы Bruker – pBDi. Это открытая детекционная платформа способная одновременно определять до

6 патогенов/токсинов в концентрациях от 0,1–2 нг токсина/мл или  $10^{2-3}$  вирусных частиц или бактерий в пределах 20 мин с минимальной пробоподготовкой в течении 5 мин. В основе механизма детектирования лежит иммуноферментная реакция, происходящая на аноде и катоде электрохимического чипа, в результате которой генерируется электрический ток. Токсичный чип 1 способен детектировать BoNT/A, BoNT/B, BoNT/F, SEB и ricin, а чип 2 – BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, SEA и abrin. По показателям данный детектор в основном соответствует требованиям к средствам индикации белковых токсинов.

Недостатком этой платформы с точки зрения реализации в современных условиях является необходимость использования слабо освоенных в стране технологий микрофлюидики и электрохимического чипа, а также разработки нового прибора.

Другая весьма перспективная платформа использует наномангнитные частицы и метку в виде редкоземельных металлов с флуоресценцией, разрешенной во времени, в формате иммунохроматографии. Выбранный формат иммунологического анализа на низкомолекулярные токсины – конкурентный иммунологический анализ. Мультиплексирование достигается за счет использования наночастиц разной окраски. Снижение интенсивности цвета при положительном обнаружении наблюдается невооруженным глазом. Например, уровни детекции с использованием этого многоцветного экспериментального иммунохимического анализа определялись как 0,5; 2 и 30 нг/мл для афлатоксина В1, зеараленона или Т-2-токсина соответственно. Включение в процедуру анализа портативного детектора и флуоресцентной TRF-метки позволит увеличить чувствительность на 1–2 порядка. Данная платформа дает возможность при всех прочих одинаковых компонентах повысить чувствительность анализа на токсины на 2 порядка и может быть использована как без приборов, так и с портативными ридерами для увеличения чувствительности определения токсинов. Следует отметить, что образцы подобных ридеров недавно созданы российскими компаниями. Опыт по работе в рамках данной платформы имеется во ФБУН ГНЦ ПМБ и у организаций-партнеров по разработке (Центр фундаментальных основ биотехнологии РАН).

На этих двух платформах (на основе иммунохроматографии с наномангнитными частицами с флуоресценцией, разрешенной во времени, и на основе антительного электрохимического чипа) можно в течение 3–5 лет разработать и внедрить в практику средства быстрого обнаружения и идентификации ряда как белковых, так и низкомолекулярных биотоксинов.

В качестве примера можно привести еще одну нашу разработку. На основании исследований механизма действия эффекторного (протеолитического) компонента сибиреязвенного токсина (летального фактора (ЛФ)), в ГНЦ ПМБ был разработан высокочувствительный метод детекции, позволяющий определить присутствие ЛФ в крови в концентрации  $<5$  пг/мл. Метод базируется на способности ЛФ к эффективному расщеплению искусственного пептидного субстрата, протеолизующегося на три порядка быстрее природных субстратов. Аналогичный метод детекции может быть разработан для быстрого выявления ботулинических токсинов, однако для этого необходима идентификация высокоэффективного пептидного субстрата, расщепляемого протеолитическим компонентом ботулотоксина.

Оценивая весь массив российской и зарубежной информационной базы по выявлению токсинов и общую ситуацию с токсичной проблематикой, следует отметить, что назрела необходимость систематизировать имеющиеся сведения по данному вопросу, создать исследовательскую программу по изучению токсических компонентов, разработке средств их выявления (индикационных и идентификационных препаратов и приборов), а также стандартизованной схемы анализа проб из внешней среды, пищевых продуктов и биологических материалов на наличие данной группы молекул, вызывающих токсические состояния у людей.

С целью формирования национальной системы раннего выявления угроз биобезопасности предлагается разработать и внедрить в практику комплекс высокочувствительных средств полевой и лабораторной индикации и идентификации биотоксинов.

*Главный редактор журнала «Бактериология»,  
директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,  
академик РАН И.А.Дятлов*