



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53942** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/00
G01N 33/18
G01N 33/24

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТІ КОМПОНЕНТІВ АГРОЛАНДШАФТУ

1

(21) u201004112
(22) 08.04.2010
(24) 25.10.2010
(46) 25.10.2010, Бюл. № 20, 2010 р.
(72) КОЗЕРЕЦЬКА ІРИНА АНАТОЛІЇВНА, КОРСУН
СВІТЛАНА ГЕОРГІЇВНА
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-
ТУТ ЗЕМЛЕРОБСТВА УААН"
(57) Спосіб визначення генотоксичності компонен-
тів агроландшафту, що включає відбір наважок

2

зразків досліджуваних ґрунту, води, рослинницької
продукції, кожен з яких додають до живильних се-
редовищ, який **відрізняється** тим, що на них ви-
рощують самців *Drosophila melanogaster*, яких в
подальшому схрещують із самками тестерної лінії,
в потомстві яких, у свою чергу, за співвідношенням
самців/самки встановлюють факт збільшення (або
ні) частоти зчеплених зі статтю летальних мутацій
у порівнянні з контролем.

Корисна модель відноситься до галузі сільсь-
кого господарства, зокрема до сфери моніторингу
екотоксикологічної ситуації агроландшафтів.

Одним з результатів антропогенного
пресингу на біосферу є забруднення довкілля хімі-
чними елементами та сполуками, більшість з яких
є токсичними для біоти, в тому числі і самої люди-
ни. Частина цих забруднюючих речовин потрапляє
безпосередньо на поверхню ґрунту, природних
вод, надходить з елементами живлення до рос-
линних організмів, включаючись таким чином до
трофічного ланцюга екосистеми.

Надходження до оточуючого середовища кри-
тичних кількостей ксенобіотиків та полютантів, чи
навіть понадприродних кількостей біогенних еле-
ментів призводить до зміни характеристик ґрунтів,
природних вод, фітоценозу, як основних compone-
нтів агроекосистеми, порівняно з аналогами неза-
бруднених біогеоценозів. Частково такі зміни мож-
на виявити при проведенні агрохімічного та
екотоксикологічного аналізів, оснований на хіміч-
них, біологічних, фізичних та фізико-хімічних ме-
тодах досліджень, які визначають рівень деграда-
ваності чи забрудненості компонентів
агроекосистеми. Проте такі дослідження можуть
надати інформацію лише про небезпеку для живих
організмів, що існує на сучасному етапі. Тоді як в
ряді випадків є необхідність виявлення дії конкре-
тного чинника, а тим більше комплексного впливу
групи чинників на біоту прийдешніх поколінь у аг-
роекосистемі.

В контексті вищезазначеного встановлення
генетичного статусу процесів, що відбуваються в
ґрунті, природних водах, рослинницькій продукції
за сучасного техногенного навантаження у біос-
фері є необхідним. Адже процеси спадковості і
мінливості є загальними властивостями всього
живого, порушення яких призводить як до наслід-
ків на рівні окремого організму, так і до змін у низці
поколінь. З огляду на це, визначення саме генети-
чної активності різних компонентів агроекосистеми
залишається важливим.

Серед проявів генетичної активності вирізня-
ють генотоксичність, при цьому генотоксичними
вважають чинники, які здатні викликати у організ-
му, що зазнає їх впливу, мутації, хромосомні абе-
рації та пошкодження в молекулах ДНК [1].

Для визначення сумарного генотоксичного
ефекту окремих компонентів агроекосистеми ви-
користовують біологічне тестування [2]. Біотесту-
вання визначають як дослідження впливу біотич-
них та абіотичних чинників на тест-організми, які
перебувають в стандартних умовах [3].

Для біотестування на генотоксичність сьогодні
застосовують, як *in vitro* так і *in vivo* експерименти.
В експериментах *in vitro* зазвичай застосовують
мікроорганізми (*Salmonella typhimurium*, так званий
тест Еймса; *Escherichia coli*). З однієї сторони для
постановки таких експериментів вимагається ная-
вність відповідного обладнання, яке забезпечує
проведення мікробіологічних експериментів, з ін-
шої в цих експериментах можна врахувати тільки

(19) **UA** (11) **53942** (13) **U**

певну частину мутаційних подій, так звані мутації типу «зсуву рамки зчитування» та «заміни пар основ» [1]. Зрозуміло, що пошкодження генетичного апарату не вичерпуються тільки цими двома типами порушень, а отже роздільна здатність цього методу не стовідсоткова. Крім того, проукаріотичні та еукаріотичні організми значно відрізняються один від одного своєю системою метаболізму, а отже і шляхами сприйняття та повними картинами відповіді на вплив одного і того самого чинника. Іншими словами, результат, отриманий на мікроорганізмах, не може бути прямо перенесений на багатоклітинні види.

В експерименти з тестування на генотоксичність *in vivo* залучають так звані модельні організми. Серед рослинних організмів найбільш поширеним є так званий *allium-test* [4]. Насінню цибулі *Allium* *sepa* дають проростати на фільтрувальному папері, змоченому розчинами, приготовленими за участі досліджуваних факторів. Аналіз хромосомних аберацій проводять на давлених препаратах меристеми цих корінців. Таким чином даний метод дає змогу враховувати частоту хромосомних перебудов, тоді як всі інші мутації та пошкодження ДНК залишаються поза межами його роздільної здатності.

Одним з методів визначення мутагенної активності факторів зовнішнього середовища є мікроядерний тест, суть якого полягає у визначенні частоти інтерфазних клітин з мікроядрами [4]. Мікроядра - це вторинні ядра, що утворилися під час телофази мітозу з хроматину, що затримався в анафазі внаслідок хромосомних поломок або дисфункції веретена поділу. У першому випадку мікроядра містять ацентричні фрагменти, у другому - цілісну хромосому. У мікроядерному тесті застосовують різні об'єкти від риб до людини. Звичайно, в таких дослідженнях людина може виступати лише біомаркером. Що ж стосується різних видів риб (короп, наприклад) то у них для аналізу зазвичай беруть тканини плавників, зябер або кров [5,6]. Таким чином даний метод дозволяє врахувати тільки втрати певної частини хроматину, тоді як увесь спектр пошкоджень, який не пов'язаний з таким явищем, залишається поза увагою дослідника.

Крім того, всі описані способи визначення генотоксичності за допомогою живих організмів, надаючи переконливі результати, потребують високого рівня технічного забезпечення та кваліфікаційного рівня, значної кількості часу та фінансових затрат.

З погляду на вищезазначене в нашій країні не розроблено універсального, доступного у використанні методу для визначення сумарної генотоксичності компонентів агроландшафту.

На нашу думку найбільш перспективним модельним організмом для тестування генотоксичності в агроландшафті є *Drosophila melanogaster* - плодова або овцова муха. Цей вид є космополітом, тобто зустрічається у всіх кутках земної кулі, де їй дозволяє температурний режим [7]. Отже слід визнати, що вона є звичним компонентом екосистем, в тому числі і антропогенно-перетворених. Дрозофіла є об'єктом генетичних,

досліджень вже більше 100 років, як в силу біологічних особливостей цього виду, так і, особливо останні десятиліття, з причини всебічної вивченості цього організму аж до сиквенування геному. Крім того, *Drosophila melanogaster* є зручним об'єктом для тестування генотоксичності в силу її дешевизни в утриманні, простоти в роботі, можливості отримання достатньої кількості потомків для аналізу.

Найближчим аналогом є спосіб визначення генотоксичності за допомогою тесту "Частота абераційних хромосом" в меристематичних клітинах фітоіндикаторів, серед яких найчастіше застосовують *Allium* *sepa* L., наведений в Методичних рекомендаціях, затверджених наказом МОЗ України 13.03.2007 № 116 [4].

Згідно цього способу насіння цибулі пророщують протягом 72 годин за температури 25°C при безпосередньому контакті з досліджуваним ґрунтом чи водою. В якості контролю використовують дистильовану воду. При появі первинних корінців довжиною 7-9 мм їх фіксують в ацетоалкоголі за Карнуа [4] і зберігають до остаточного приготування препарату у розчині етанолу 70-відсоткової концентрації. Фарбування препаратів для подальшого дослідження шляхом мікроскопування проводять реактивом Шиффа за Фольгеном [4]. Під час мікроскопування препаратів враховують клітини з абераційними (патологічними) хромосомами. Частота патологічних анафаз і телофаз розраховується у відсотках від переглянутих аналогічних фаз мітозу.

Значним недоліком цього способу є можливість врахування тільки мутацій типу хромосомних перебудов, які в живих організмах у більшості випадків елімінуються і не передаються наступним поколінням. А увесь інший спектр мутацій, який дійсно складає генетичний тягар виду, а саме кількість та генетичний зміст накопичених видом мутацій в низці поколінь, і визначає можливість його виживання в мінливих умовах оточуючого середовища, не може бути врахованим за допомогою цього способу. Крім того, застосування *allium*-тесту дає можливість враховувати генетичні події, які відбуваються в поколіннях соматичних клітин, які забезпечують виживання конкретного організму (соми), а для виду в цілому визначальними є події, які відбуваються в генеративних клітинах і саме тому успадковуються з покоління в покоління, і означає, що пошкодження, яке виникло в одному організмі під впливом певного чинника, може зашкодити багатьом особинам, представникам наступних поколінь.

В основу корисної моделі поставлено задачу визначати генетичну токсичність компонентів агроекосистеми шляхом встановлення частоти летальних, зчеплених зі статтю мутацій у *Drosophila melanogaster*. Тобто визначати всі, як рецесивні, так і домінантні летальні мутації, в тому числі хромосомні аберації, які виникають в генеративних тканинах мух за контакту з основними компонентами агроекосистеми: ґрунтом, природними водами, рослинницькою продукцією, що дозволить виявляти негативний вплив трансформації довкілля

у агроландшафтах вже на первинних ланках трофічного ланцюга.

Поставлена задача має реальне рішення, оскільки зменшення кількості самців порівняно з самками залежить від будь-якої з подій в статевій хромосомі, які в гемізиготному стані виявляються летальними.

Генотоксичність ґрунту, природних вод, рослинницької продукції, що є компонентами конкретної агроєкосистеми пропонуємо визначати способом, наведеним нижче.

Для *Drosophila melanogaster* готують поживне середовище за участю досліджуваних чинників. При цьому твердим компонентом є манна крупа, а в якості рідкої основи залежно від різновиду об'єкту дослідження застосовують:

1) відібрані у агроландшафті зразки природних вод - за аналізування природних вод;

2) водну витяжку з відібраних у агроландшафті зразків ґрунту - за аналізування ґрунтів;

3) розчин соку рослин - за аналізування сирого рослинного матеріалу.

Контролем у всіх трьох випадках є поживне середовище на основі з дистильованої води.

При аналізуванні сухого рослинного матеріалу (зерно, сіно тощо) готують поживне середовище, в якому рідкою основою є дистильована вода, а твердим компонентом сухий розмелений рослинний матеріал.

Мух лінії дикого типу розміщують у ємності з поживним середовищем із розрахунку 5 самок та 2 самці на об'єм 100 мл, щільно накриваючи пробірки пробками, виготовленими з вати. Самців, які розвинулись на цьому середовищі, а отже зазнали впливу досліджуваного фактора, разом із самками, які розвивались на контрольному середовищі, схрещують із незайманими самками лінії C(1)DX.

Незайманих самок для схрещування отримують з культур, які підтримуються в лабораторії шляхом видалення із пробірок, в яких почали з'являтися представники нового покоління, всіх дорослих (імаго) особин. Через 7 годин всі дорослі самки, які знову вилупляться з пупаріїв за цей час в цих пробірках, будуть незайманими і можуть бути використанні для схрещування з піддослідними самцями.

Лінія C(1)DX представлена самками із фізично щепленими X-хромосомами. В потомстві таких

самок сини завжди нестинуть X-хромосому батьківського самця. Тому, всі летальні мутації, які виникнуть в цій хромосомі у батька, призведуть до загибелі самців, представників першого покоління, які несуть ці мутації. В наслідок схрещування самок лінії C(1)DX з самцями дикого типу завжди з'являються тільки особини двох типів: самці дикого типу та самки із щепленими X - хромосомами.

Порівнюючи частку самців, які розвинулись у контролі та на досліджуваному середовищі виявляють зміну частоти виникнення летальних мутацій. При порівнянні застосовують статистичний метод критерій Фішера F (для якісних ознак). Розрахунки проводять згідно загальноновизначених методик [8]. Якщо отримане число більше або дорівнює табличному, то різниця вважається вірогідною, а тестований компонент агроландшафту - генотоксичним.

Літературні джерела

1. The International Organization for Standardization (ISO) testing in ISO 10993-3: "Tests for Genotoxicity, Carcinogenicity, and Reproductive Toxicity."

2. Єрмакова Н.Ю. Застосування експресних біологічних методів в еколого-гідрогеологічних дослідженнях // Автореф. дис. канд. геол. наук: 04.00.06.- К., 2000. -20 с.

3. Білявський Г.О., Бутченко Л.І. Основи екології: теорія та практикум: Навч. Посіб. - К.: Лібра, 2004.- 368с.

4. МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ "Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням цитогенетичних методів" // Наказ МОЗ України, 13.03.2007 N116.

5. Архипчук В.В., Гаранько Н.М., Гончарук В.В. Спосіб оцінки генотоксичності водного середовища. Патент України № 67315 від 15.02.2006.

6. Архипчук В.В., Малиновская М.В. Применение комплексного подхода в биотестировании природных вод // Хімія і технологія води. - 2000. - 22. - № 4. С 428-443.

7. Медведев Н.Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1966. 238 с

8. Атраментова О.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. Харків: ХНУ імені В.Н. Карабіна, 2007.-С. 135, 136, 262.