



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 71783

(13) C2

(51) МПК (2006)
G01N 33/18МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ЗА МОРФОЛОГІЧНИМИ ЗМІНАМИ
ЯДЕР І ЯДЕРЕЦЬ КЛІТИН ТВАРИННИХ ТЕСТ-ОРГАНІЗМІВ

1

2

(21) 20031212052

(22) 22.12.2003

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Архипчук Віктор Володимирович, Гончарук
Владислав Володимирович(73) ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ
ІМ. А.В. ДУМАНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-
МІЇ НАУК УКРАЇНИ(56) Архипчук В.В. Использование ядрышковых
характеристик в биотестировании // Цитология и
генетика. - 1995. - т. 29, N 3 - с. 6-12Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Варгунова Н.И.,
Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогене-
тическая нестабильность. - Томск: Изд-во Томск.
Ун-та, 1991.

UA A 55842, 15.04.2003

SU A1 1748060, 15.07.1992

(57) Спосіб визначення цитотоксичності водних
розчинів, що включає введення в досліджуване
середовище тест-організму і визначення токсично-
сті водного середовища, який відрізняється тим,
що використовують тваринний тест-організм, ви-
тримують його в досліджуваному середовищі про-
тягом 30-90 хвилин, потім використовують клітини
цього ж організму для цитогенетичного аналізу за
кількісними характеристиками порушень в морфо-
логії ядер і ядерець, і на основі порівняльних уза-
гальнених даних для дослідних і контрольних ва-
ріантів здійснюють оцінку цитотоксичності водного
середовища.

Винахід відноситься до області екології навко-
лишнього середовища, а саме до методів біотес-
тування водних середовищ і може бути використан-
ний для визначення різних компонентів-
забруднювачів, рівня токсичності водного середо-
вища на клітинному рівні.

Використання клітинних біомаркерів самих по
собі або ж у сполученні з традиційними методами
на організмовому рівні вкрай необхідно на сучас-
ному етапі біотестування природних, у тому числі і
питних, вод. Універсальність клітинної організації
відкриває широкі можливості для токсикологічних
досліджень із застосуванням різних груп тварин і
рослин, і наступною екстраполяцією отриманих
результатів на клітини й організм людини.

Мікроядра являють собою невеликі округлі
внеядерні тельця, що формуються при конденсації
ацентричних хромосомних фрагментів або цілих
хромосом, не включених в основне ядро по заве-
ршенню клітинного розподілу. Утворення мікроя-
дер може бути обумовлено порушеннями різних
клітинних механізмів. Так, мікроядра, що несуть
хромосомні фрагменти, виникають після прямих
розривів нитки ДНК, реплікації на ушкодженій ДНК-
основі, репресії синтезу ДНК (кластогенні ушко-
дження). Мікроядра, що включають цілі хромосо-
ми, утворюються внаслідок порушень веретена
розподілу, кинетохора або інших частин мітотично-

го апарата (анеугені ушкодження). Отже, підвище-
на частота клітин із мікроядрами є біомаркером
цитогенотоксичних ефектів, що можуть виникнути
унаслідок впливу кластогенних або анеугених аге-
нтів (аналог) [Al-Sabti K. and Metcalfe CD. 1995.
Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water.
Mutat. Res. 343, 121-135] (1).

Відомий спосіб оцінки (діагностики) якості вод-
них зразків із використанням клітинних біомаркерів
- мікроядерного тесту для визначення генотоксич-
ності [Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Варгунова
Н.И., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и ци-
тогенетическая нестабильность. - Томск: Изд-во
Томск. Ун-та, 1991. - 272с.] (2).

Мікроядерний тест (2) об'єктивно характеризує
частоту хромосомних порушень у ході мітотичного
процесу (розриви хромосом, відставання окремих
хромосом при розподілі клітин), тобто мікроядер-
ний тест фіксує структурні порушення генома клі-
тини. Основний показник тесту - частота виник-
нення клітин із мікроядрами (мЯ). Іншим
показником є частота виникнення клітин із подвій-
ними ядрами (2Я), що вказує на порушення утво-
рення дочірніх клітин з материнської.

Відомий також спосіб оцінки (діагностики) яко-
сті водних зразків із використанням ядерець біо-
маркера для визначення цитотоксичності (прото-
тип) [Архипчук В.В. Использование ядрышковых

(13) C2

(11) 71783

(19) UA

характеристик в біотестуванні// Цитология и генетика. -1995.-т. 29, N 3-с.6-12] (3).

Сутність способу полягає в тому, що для визначення токсичності використовується ядерцевий біомаркер, який оцінює ядерцеву активність клітин, тобто характеризує функціональні зміни їх геномної активності. Ядерця являють собою комплекс функціонуючих рибосомних генів і їх продуктів, що обумовлює їх високу сприйнятливості до зовнішніх впливів. Найбільш інформативними показниками, що застосовуються для оцінки впливу різних факторів на геном клітин рослин і тварин, є: розмір поодиноких ядерця і відсоток гетероморфних парних ядерця (ГПЯ) - для клітин з малою кількістю ядерця, і число ядерця - для багатоядерцевих клітин.

Винахід направлено на розробку способу діагностики якості водного середовища за допомогою біотестування, що має порівняно низьку собівартість і технічну простоту, з одної сторони, і інформативність щодо комплексної оцінки зразка, з іншої сторони, підвищення чутливості способу.

Для вирішення поставленої задачі запропонований спосіб визначення цитотоксичності водного середовища, що включає використання для тестування тваринного тест організму, його експозицію в досліджуваному водному середовищі протягом 30-180 хвилин, а також послідовний цитогенетичний аналіз клітин цього організму за кількісними характеристиками порушень в морфології ядер і ядерця; на основі порівняльних узагальнених даних дослідних і контрольних варіантів отримують оцінку цитотоксичності водного середовища.

Сутність способу полягає в наступному. Для оцінки якості водних зразків досліджують вплив токсичності на тваринні тест організми, представником яких була прісноводна безхребетна гідра *Hydra attenuata*. Після витримання гідр в аналізованому середовищі протягом 30-90хв., тварин фіксують в спирт-оцтовій суміші. Проби тварин фіксують принаймні двічі, наприклад, через 30 і 180хв. експозиції гідр в досліджуваному середовищі. Потім готують повітряно-сухі цитологічні препарати, пофарбовані 50% водним розчином азотнокислого срібла.

Аналіз препаратів виконується при максимальному збільшенні світлового мікроскопа (під імерсійним об'єктивом 100^x). Результати порівнюють в дослідних і контрольних варіантах. Як контроль використовують артезіанську воду, що є також розчинником у дослідних варіантах. При цьому гідри, що витримуються в контролі, також фіксуються двічі в тому ж часовому інтервалі, що й у досліді.

В ході експериментального дослідів, де проводився аналіз токсичного впливу на тваринний організм та його клітини, крім змін кількісних характеристик ядер і ядерця (число і розмір), були вперше виявлені їх специфічні морфологічні порушення.

Зокрема, для ядер виявлене їх повне (тип «цілком зруйноване ядро») або часткове (тип «частково зруйноване ядро») руйнування, деструктуризація. На цитологічних препаратах у випадку змін типу «цілком зруйноване ядро» спостерігається тільки «голе» ядерце, без будь-яких структурних

компонентів ядра. Для порушень типу «частково зруйноване ядро» характерне неповне руйнування, деструктуризація ядра, у цьому випадку навколо ядерця зберігаються фрагменти ядерного матеріалу.

Для ядерця уперше виявлено 4 типи порушень їхньої морфології, організації: 1) тип «супутники», коли на препараті спостерігають основне ядерце з декількома супутниками, уламками цього або іншого ядерця; 2) тип "намисто", коли під мікроскопом не виявляється основне ядерце, а тільки уламки, фрагменти ядерцевого матеріалу; 3) тип "рихлі", у цьому випадку ядерце не має цілісної структури, відбувається внутрішнє порушення його організації; 4) тип "вакуоль" визначається, якщо ядерце має усередині світлу пляму - вакуоль.

Обґрунтування того факту, що виявлені типи ядерно-ядерцевих порушень відбивають реальні зміни в структурі клітинних компонентів, а не є артефактами експерименту, було проведено в декількох серіях експериментів.

Приклади реалізації способу.

Приклад 1

В якості тест організмів використовували прісноводних безхребетних тварин - гідр *Hydra attenuata*.

В якості об'єкта дослідження був використаний розчин, що містив іони металу -трьохвалентного алюмінію, в якості розчинника застосовували артезіанську воду. В якості контрольного зразка також застосовували артезіанську воду.

Для кожного біотеста використовували ємності у відповідності із нормами біотестування.

Частину гідр витримували в артезіанській воді протягом 90 хвилин (контроль негативний), другу частину в аналізованому середовищі, розчині $Al(OH)_3$ із концентрацією іонів Al^{3+} 2мг/л (дослідний розчин), також протягом 90 хвилин. Потім тварин фіксували в спирт-оцтовій суміші. Проби тварин фіксували двічі, через 30 і 90 хв. експозиції. Для мікроскопічного аналізу готували повітряно-сухі цитологічні препарати, пофарбовані 50% водним розчином азотнокислого срібла. Аналіз препаратів проводили при максимальному збільшенні світлового мікроскопа (під імерсійним об'єктивом 100^x). Отримані результати порівнювали в дослідних і контрольних варіантах. Результати такого тестування приведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Зміна морфології ядер і ядерця у клітинах гідр, що витримувались в артезіанській воді і водному розчині іонів Al^{3+} (концентрація 2мг/л)

Тип ядерно-ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин іонів Al^{3+}	
	0хв.	90хв.	30хв.	90хв.
Цілком зруйноване ядро	3,3	0,9	9,6	33,7
Частково зруйноване ядро	4,4	1,8	21,8	10,0
«Супутники»	2,4	3,9	4,1	7,4
«Намисто»	0,5	1,7	0	2,0
«Рихлі»	2,9	2,8	11,3	1,9
«Вакуоль»	4,2	2,5	1,2	4,7
Сумарні порушення морфології ядер (% від числа досліджених клітин)	7,7	2,7	31,4	43,6
Сумарні порушення морфології ядерця (% від числа досліджених клітин)	10,0	10,9	16,6	16,1

Очевидно, що вплив іонів алюмінію на клітини

тварини насамперед призводить до значного росту зруйнованих ядер: спочатку експозиції за рахунок частково зруйнованих, а наприкінці експерименту - цілком зруйнованих ядер. Також незначно збільшується частка клітин із морфологічно зміненими ядрами: на 5,2-5,7%.

Приклад 2.

В якості об'єкта досліджень був використаний розчин лікарського препарату - аспірину, із концентрацією, яка викликає летальний ефект (LC_{50}) протягом 96 годин на організмовому рівні. Визначені в серії експериментів дані щодо LC_{50} концентрації для гідр склали 4,2мг/мл для водного розчину аспірину (ацетилсаліцилової кислоти). Частину гідр культивували в артезіанській воді протягом 90хв. (контроль негативний), іншу частину - у водному розчині лікарського препарату, в концентрації 4,2мг/мл (дослідний розчин), також протягом 90хв.

Якість водного зразка визначалась аналогічною технологією, викладеною в прикладі 1.

Результати цього тестування приведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Зміна морфології ядер і ядерець у клітках гідр, що витримувались в артезіанській воді і у водному розчині аспірину (ацетилсаліцилової кислоти) в концентрації 4,2мг/мл

Тип ядерно-ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин ацетилсаліцилової кислоти	
	0хв.	90хв.	30хв.	90хв.
Цілком зруйноване ядро	0	0	0	0
Частково зруйноване ядро	0	0	0,3	0
«Супутники»	6,6	4,2	1,0	6,6
«Намисто»	0	0,6	0	6,6
«Рихлі»	1,0	1,0	7,2	14,4
«Вакуоль»	2,5	0,8	2,6	3,9
Сумарні порушення морфології ядер (% від числа досліджених клітин)	0	0	0,3	0
Сумарні порушення морфології ядерець (% від числа досліджених клітин)	10,1	6,6	10,8	31,5

Короткочасний вплив розчину ацетилсаліцилової кислоти в концентрації токсичної для тваринного організму (після 96 годинної експозиції) приводить на клітинному рівні (після 1,5 годинної експозиції) до істотного збільшення частки клітин з різними порушеннями в морфології ядерець: з 6,6-10,1% до 31,5%. Як у контролі, так і в досліді не знайдено клітин із порушеннями в структурі ядер.

Приклад 3.

Дослідження проводилось подібно із технологією, описаною в прикладі 2. Тільки в якості об'єкта дослідження був використаний розчин лікарського препарату - анальгін (або метамізолу натрію). Частину гідр культивували в артезіанській воді протягом 90хв. (контроль негативний), іншу частину - у водному розчині лікарського препарату, в концентрації 1,4мг/мл (дослідний розчин), також протягом 90хв.

Результати дослідів наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Зміна морфології ядер і ядерець у клітках гідр, що витримувались з артезіанській воді і у водному розчині анальгін (метамізолу натрію) в концентрації 1,4мг/мл

Тип ядерно-ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин метамізолу натрію	
	0хв.	90хв.	30хв.	90хв.
Цілком зруйноване ядро	0	0	10,7	17,2
Частково зруйноване ядро	0,2	0	5,8	12,6
«Супутники»	0,8	0,8	0,4	6,7
«Намисто»	0,8	1,0	0,1	0,9
«Рихлі»	9,3	7,9	19,7	34,5
«Вакуоль»	4,9	6,6	1,5	ІД
Сумарні порушення морфології ядер (% від числа досліджених клітин)	0,2	0	16,5	29,8
Сумарні порушення морфології ядерець (% від числа досліджених клітин)	15,7	16,3	21,6	43,2

Протягом 30-90 хвилинної експозиції розчин анальгін істотно збільшив частку клітин як з порушеннями в морфології ядерець (з 15,7-16,3% до 21,6-43,2%), так і з порушеннями в структурі ядер (з 0-0,2% до 16,5-29,8%). Таким чином, токсичний для тваринного тест-організму після 4 добові культивування розчин даної лікарської речовини виявився високо цитотоксичним для клітин цього ж тест-організму вже після 1,5 годинної інкубації.

Таким чином, сукупність істотних ознак запропонованого способу визначення цитотоксичності водних зразків, а саме визначення токсичних ефектів на клітинному рівні у тваринного тест-організму з використанням нового набору ядерно-ядерцевих морфологічних порушень, є необхідного і достатнього для досягнення забезпеченого винаходом технічного результату - розробки нового методу для тестування токсичності водних зразків, що має порівняно низьку собівартість і технічну простоту, з одної сторони, і інформативність, комплексну оцінку негативного впливу, з іншої сторони, підвищення чутливості способу.