



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 71793

(13) C2

(51) МПК (2006)  
G01N 33/18МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

1

(21) 20031212364

(22) 25.12.2003

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 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) RU C1 2237914 18.03.2003.

UA A 55842 15.04.2003.

UA A 71783 22.12.2003.

UA A 61648 17.11.2003.

(57) Спосіб оцінки цитотоксичності водного сере-  
довища, що включає введення в досліджуване  
середовище тест-організму і визначення токсично-  
сті водного середовища, який відрізняється тим,

2

що використовують рослинний тест-організм, ви-  
тримують його в досліджуваному середовищі про-  
тягом 30-90 хвилин, потім використовують клітини  
цього організму для цитогенетичного аналізу за  
кількісними показниками різних типів порушень в  
морфології ядерця, який включає підрахунок клі-  
тин, що мають: ядерця неправильної кутащої або  
вигнутої витягнутої форми, або структури з непов-  
ним злиттям-поділом ядерця, або основне ядер-  
це, оточене декількома супутниками або уламка-  
ми, або великі ядерця, гіпохромні у порівнянні з  
нормальними ядерцями, або ядерця, що не мають  
цілісної структури, і на основі порівняльних уза-  
гальнених даних для дослідних і контрольних ва-  
ріантів отримують показник цитотоксичності вод-  
ного 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 речовин-  
забруднювачів, токсичності водного середовища  
на клітинному рівні.

Використання клітинних біомаркерів самих по  
собі або ж у поєднанні 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.

Актуальність досліджень ядерцевих характе-  
ристик, їхніх змін під впливом різних факторів по-  
яснюється особливою важливістю ядерця у жит-  
тєдіяльності кліток і цілого організму. Багато  
експериментальних даних визначають кількісні  
параметри ядерця і ядерцеутворюючих районів  
як корисний прогностичний і діагностичний інди-  
катор ракових захворювань різного типу. Також яде-  
рця характеризують як ключовий фактор, що конт-  
ролює механізми старіння.

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] [1]. Підвищена частота  
клітин із мікроядрами є біомаркером цитогеноток-  
сичних ефектів, що можуть виникнути унаслідок  
впливу кластогенних або анеугених агентів.

Найбільш близьким аналогом (прототипом)  
винаходу по технічній сутності й ефектові, що до-  
сягається, є спосіб оцінки цитотоксичності водного  
середовища (розчинів) за ядерцевим біомаркером  
(Спосіб оцінки (діагностики) качества водных  
образцов с использованием ядрышкового биомар-  
кера а) [Архипчук В.В.// Цитология и генетика. -  
1995. - 29 - с.6-12] [2]

Ядерцевий біомаркер характеризує ядерцеву  
активність клітин і об'єктивно відображає функціо-  
нальні зміни геномної активності. Ядерця являють  
собой комплекс функціонуючих рибосомних генів і  
їх продуктів, що обумовлює їх високу чутливість до  
зовнішніх впливів. Найбільш інформативними по-  
казниками, що застосовуються для оцінки впливу  
різних факторів на геном клітин рослин і тварин, є:  
розмір поодиноких ядерця і відсоток гетеромор-  
фних парних ядерця (ГПЯ) - для клітин з малою  
кількістю ядерця, і число ядерця - для багаторе-  
дерцевих клітин.

Набір ядерцевих параметрів, що пропонується

(13) C2

(11) 71793

(19) UA

для аналізу, а саме: кількість ядерців у клітці, розмір поодинокого ядерця, частка клітин із гетероморфними парними ядерцями - найбільше об'єктивно характеризує біосинтетичну активність клітин із малим числом ядерців (найбільш розповсюджена серед тваринних і рослинних кліток ядерцева конституція) і в той же час відображає різні механізми її регуляції.

Винахід направлено на розробку способу діагностики якості водного середовища за допомогою біотестування, що має порівняно низьку собівартість і технічну простоту при збереженні високої інформативності щодо оцінки водного зразка, підвищення чутливості способу.

Сутність способу полягає в наступному. Для оцінки токсичності водних зразків досліджують їх вплив на тест організми, у якості яких використовують рослини. Після витримування тест організмів у досліджуваному середовищі протягом 30-180 хвилин, зразки рослинного матеріалу фіксують у спирт-оцтовій суміші, фіксують принаймні двічі, наприклад, через 30 і 180хв. експозиції. Потім готують повітряно-сухі цитологічні препарати, пофарбовані 50% водним розчином азотнокислого срібла. Аналіз препаратів проводиться при максимальному збільшенні світлового мікроскопа (під іммерсійним об'єктивом 100<sup>x</sup>). Результати порівнюють в дослідних і контрольних варіантах. Як контроль використовують артезіанську воду, що є також розчинником у дослідних варіантах. При цьому проби дослідного матеріалу, тобто рослин, які культивуються у контрольному зразку, також фіксуються двічі в тому ж часовому інтервалі, що й у досліді.

У ході проведених експериментальних досліджень, присвячених вивченню токсичного впливу на рослинний організм і його клітини, виявлені нові специфічні морфологічні порушення ядерців, крім змін їх кількісних характеристик (число і розмір),

Зокрема, для ядерців уперше виявлено 6 типів порушень їхньої морфології, організації: 1) тип "кристал", коли виявляють ядерця неправильної кутащої форми; 2) тип "з'єднані" ядерця, коли під мікроскопом спостерігають неповний процес злиття-поділу ядерцевих структур, найчастіше двох; 3) тип "личинка", коли ядерця стають вигнутої, витягнутої форми; 4) тип "супутники", коли одне основне ядро оточене декількома супутниками або уламками; 5) тип "роздуті" ядерця, що є великими, гіпохромними в порівнянні з нормальними ядерцями, вони гомогенні за своєю організацією; 6) тип "рихлі" ядерця, якщо вони не мають цілісної структури, тобто відбувається порушення їхньої внутрішньої організації, і як наслідок спостерігається гетерогенна внутрішня структура в порівнянні з нормальними ядерцями.

Обґрунтування того факту, що виявлені типи ядерцевих порушень відбивають правдиві зміни в структурі цього клітинного компонента, а не є артефактами методу, було доведено експериментально.

Приклади реалізації способу

Приклад 1

В якості рослинного тест організму використовували цибулю *Allium* сера.

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 біотесту використовували ємності у відповідності із нормами біотестування.

Частину цибулин *Allium* сера культивували в артезіанській воді (контроль негативний), іншу частину - в двох розчинах  $Al(OH)_3$  із концентрацією іонів  $Al^{3+}$  0,5 і 2,0 мг/л (дослідні розчини), протягом 90хв. Потім корінці рослин фіксували в спирт-оцтовій суміші. Проби корінців фіксували двічі, через 30 і 90хв. експозиції. Для мікроскопічного аналізу готували повітряно-сухі цитологічні препарати, пофарбовані 50% водним розчином азотнокислого срібла. Аналіз препаратів проводили при максимальному збільшенні світлового мікроскопа (під іммерсійним об'єктивом 100<sup>x</sup>). Отримані результати порівнювали в дослідних і контрольних варіантах. Результати тестування наведені в Таблиці 1.

Наведені дані тестування в таблиці 1 свідчать, що вплив іонів алюмінію в концентрації 0,5 мг/л на клітини корінців цибулі після 30хв експозиції приводить до значного росту зруйнованих ядерців, насамперед за рахунок двох типів порушень: «рихлих» ядерців, а також ядерців-«супутників». Досліди протягом 90хв. інтервалу показали, що зміни ядерцевої морфології, які виникли унаслідок впливу 0,5 мг/л концентрації іонів алюмінію оборотні: наприкінці експерименту рівень ядерцевих порушень відновився до контрольного.

При більш високій концентрації іонів алюмінію (2,0 мг/л) рівень порушень ядерцевої структури зростає у ході експерименту. Зокрема, збільшувалася частка клітин з ядерцями-супутниками і найбільш істотно - відсоток клітин з «рихлими» ядерцями. У цілому іони алюмінію в інтервалі концентрацій 0,5-2,0 мг/л протягом перших півтори годин експозиції приводили до істотного росту частки клітин, що мають аномалії в морфології ядерців, що відображає рівень цитотоксичності досліджуваного розчину.

Приклад 2

В якості рослинного тест організму використовували також цибулю *Allium* сера.

В якості об'єкта дослідження був використаний розчин лікарського препарату, що містив аспірін (або ацетилсаліцилову кислоту), концентрація якого визвала 50% пригнічуючий ефект на рівні організму ( $EC_{50}$ ), тобто зменшувала вдвічі довжину корінців протягом 120 годин експозиції. Дані концентрації для *Allium* сера складали 0,08 мг/мл для водного розчину аспірину (ацетилсаліцилової кислоти).

Цибулини пророщували в артезіанській воді протягом 3-4 діб до появи корінців достатньої довжини. Потім корінці однієї і тієї ж цибулини фіксували в спирт-оцтовій суміші 4 рази:  $\frac{1}{4}$  частина корінців фіксували на початку досліджень (0 точка - контроль негативний),  $\frac{1}{4}$  частина корінців після їхнього культивування протягом 90хв в артезіанській воді (90хв - контроль негативний),  $\frac{1}{4}$  частина корінців після їхнього культивування протягом 30хв у розчині ацетилсаліцилової кислоти (30хв - дослідний варіант) і останню  $\frac{1}{4}$  частину корінців після їхнього культивування протягом 90хв у роз-

чині аспіріну (90хв - дослідний варіант).

Результати тестування відображені в таблиці 2.

Таблиця 2. Зміна морфології ядерець у клітках корінців цибулі, культивуємих в артезіанській воді й у водному розчині аспіріну (ацетилсаліцилової кислоти) у  $EC_{50}$  концентрації.

З наведених в таблиці 2 даних видно, що короточасний вплив розчину ацетилсаліцилової кислоти в концентрації токсичної для рослинного організму (після 120 годинної експозиції) приводить на клітинному рівні (після 1,5 годинної експозиції) до істотного збільшення частки клітин із різними порушеннями в морфології ядерець: з 16,3-21,8% до 45,1-71,2%. Ріст порушень відбувається за рахунок невеликого збільшення частки клітин із «з'єднаними» і «роздутими» ядерцями, ядерцями-«личинками» і істотного збільшення відсотка клітин з «рихлими» ядерцями.

Приклад 3

В якості рослинного тест організму використували також цибулю *Allium* сера.

В якості об'єкта дослідження був використаний розчин лікарського препарату, що містив анальгін (або метамізол натрію), концентрація якого визвала 50% пригнічуючий ефект на рівні організму ( $EC_{50}$ ), тобто зменшувала довжину корінців протягом 120 годин експозиції. Дані концентрації для *Allium* сера складали 0,8мг/мл для водного розчи-

ну анальгину (метамізол натрію).

Технологія підготовки і проведення тестування аналогічна, як в прикладі 2.

Результати тестування відображені в таблиці 3.

Дані таблиці 3 показують, що протягом 90 хвилинної експозиції розчин анальгину істотно збільшив частку клітин з порушеннями в морфології ядерець (з 28,0-28,3% до 32,8-50,6%). Основним типом ядерцевих порушень, що обумовив такий ріст, були «рихлі» ядерця. Таким чином, токсичний для рослинного тест-організму після 5 добового культивування розчин 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 в рослинного тест-організму з використанням нового набору ядерцевих морфологічних порушень, є необхідною і достатньою для досягнення забезпечуваного винаходом технічного результату - розробки нового методу для тестування токсичності водних зразків, що має порівняно низьку собівартість і технічну простоту при збереженні високої інформативності щодо оцінки токсичності зразка, підвищення чутливості способу.

Таблиця 1

Зміна морфології ядерець у клітинах цибулі, яка культивується в артезіанській воді і водному розчині іонів  $Al^{3+}$

Тип ядерцевих порушень	Контроль негативний	Розчин іонів $Al^{3+}$ - 0,5мг/л		Розчин іонів $Al^{3+}$ - 2,0мг/л	
	90хв	30хв	90хв	30хв	90хв
"Кристал"	3,2	2,5	3,9	3,5	3,4
"З'єднані" ядерця	6,1	1,8	3,3	3,7	2,6
"Личинка"	2,6	0,6	3,5	2,0	2,2
"Супутники"	0	8,5	0	9,2	6,9
"Роздуті" ядерця	0,2	0	0	0,5	1,5
"Рихлі" ядерця	0,2	44,0	0,4	8,7	26,0
Сумарні порушення морфології ядерець (% від числа досліджених кліток)	12,3	57,4		27,6	42,6

Таблиця 2

Зміна морфології ядерець у клітинах корінців цибулі, культивуємих в артезіанській воді й у водному розчині аспіріну (ацетилсаліцилової кислоти) у  $EC_{50}$  концентрації

Тип ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин ацетилсаліцилової кислоти	
	0хв	90хв	30хв	90хв
"Кристал"	1,2	1,2	3,6	4,0
"З'єднані" ядерця	4,1	3,5	10,3	11,0
"Личинка"	3,8	2,9	6,9	8,8
"Супутники"	0,3	0,2	1,5	0,7
"Роздуті" ядерця	2,2	0,5	7,6	8,1
"Рихлі" ядерця	10,3	8,2	15,4	38,7
Сумарні порушення морфології ядерець (% від числа досліджених кліток)	21,8	16,3	45,1	71,2

Таблиця 3

Зміна морфології ядерців у клітинах корінців цибулі, культивованих в артезіанській воді  
й у водному розчині анальгіну (метамізол натрію) у  $EC_{50}$  концентрації

Тип ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин метамізол натрію	
	0хв	90хв	30хв	90хв
"Кристал"	3,3	5,1	3,1	2,8
"З'єднані" ядерця	3,4	3,6	4,9	7,3
"Личинка"	3,1	2,1	3,4	2,9
"Супутники"	2,9	1,1	6,2	6,9
"Роздуті" ядерця	2,6	1,0	1,4	2,6
"Рихлі" ядерця	13,0	15,1	14,0	28,2
Сумарні порушення морфології ядерців (% від числа досліджених кліток)	28,3	28,0	32,8	50,6