



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95717 (13) C2

(51) МПК

G01N 33/18 (2006.01)

G01N 21/01 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТІ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

1

(21) а201004569

(22) 19.04.2010

(24) 25.08.2011

(46) 25.08.2011, Бюл.№ 16, 2011 р.

(72) ГОНЧАРУК ВЛАДИСЛАВ ВОЛОДИМИРОВИЧ,  
ВЕРГОЛЯС МАЙЯ РОЗМЕТІВНА, БОЛТІНА ІРИНА  
ВОЛОДИМИРІВНА(73) ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ  
ІМ. А.В.ДУМАНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-  
МІЇ НАУК УКРАЇНИ(56) Rodriguez-Cea A, Ayllon F, Garcia-Vazquez E.  
Micronucleus test in freshwater fish species: an  
evaluation of its sensitivity for application in field  
surveys. Ecotoxicol Environ Saf. 2003, Vol.56, N 3,  
P.442-8.Roche, H., and Boge, G., 1996, Fish blood  
parameters as a potential tool for identification of  
stress caused by environmental factors and chemical  
intoxication: Marine Environmental Research, vol. 41,  
p. 27-43.Al-Sabti K. Fish micronuklei for assessing  
genotoxicity in water / K.Al-Sabti, C. D. Metcalfe //  
Mutation Res. - 1995. - vol. 23. - p. 121-135.Zhou X. Chemical and biological evidence for base  
propenals as the major source of the endogenous  
MldG adduct in cellular DNA / X.Zhou, K. Taghizadeh,  
P. C. Dedon // J. Biol. Chem. - 2005. - Vol. 280. - P.  
253-258.ГОСТ 4165-78 Реактивы. Медь II сернокислая 5-  
водная. Технические условия. [он-лайн], [знайде-  
но 2011-03-29]. Знайдено в Інтернет: <URL:  
<http://vsegost.com/Catalog/40/40271.shtml>ГОСТ 4330-76 Реактивы. Кадмий хлористый 2,5-  
водный. Технические условия. [он-лайн], [знайде-  
но 2011-03-29]. Знайдено в Інтернет: <URL:  
<http://vsegost.com/Catalog/25/25389.shtml>

2

РУКОВОДСТВО по определению методом биотес-  
тирования токсичности вод, донных отложений,  
загрязняющих веществ и буровых растворов РЭ-  
ФИА, НИИ-Природа Москва-2002. [он-лайн], [знай-  
дено 2011-03-29]. Знайдено в Інтернет: <URL:[http://www.complexdoc.ru/ntdpdf/541963/rukovodstvo\\_po\\_opredeleniyu\\_metodom\\_biotestirovaniya\\_toksichnosti\\_vod\\_donny.pdf](http://www.complexdoc.ru/ntdpdf/541963/rukovodstvo_po_opredeleniyu_metodom_biotestirovaniya_toksichnosti_vod_donny.pdf)ДСанПіН №383 Про затвердження Державних са-  
нітарних правил і норм "Вода питна. Гігієнічні ви-  
моги до якості води централізованого господарсь-  
ко-питного водопостачання". [он-лайн], [знайде-  
но 2011-03-30]. Знайдено в Інтернет: <URL:[http://ecounit.com.ua/artikle\\_88.html](http://ecounit.com.ua/artikle_88.html)  
Guidelines for drinking-water quality. Second edition.  
Volume 3. World Health Organization Geneva 1997.  
Surveillance and control of community supplies.,  
P.51-72. [он-лайн], [знайде-но 2011-03-30]. Знайде-  
но в Інтернет: <URL:[http://www.who.int/water\\_](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwqvol32ed.pdf)[sanitation\\_health/dwq/gdwqvol32ed.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwqvol32ed.pdf)  
Shen L. et al. The mutagenic potentials of tap water  
samples in Shanghai. Chemosphere 52 (2003),  
1641-1646.

UA35317 C2, 15.11.2006.

UA67315 C2, 15.02.2006.

UA71783 C2, 15.12.2004.

(57) Спосіб визначення генотоксичності водного  
середовища, що включає мікроядерний аналіз за  
частотою клітин із мікроядрами та подвійними яд-  
рами із використанням як біомаркера еритроцитів  
крові риби, який відрізняється тим, що мікрояде-  
рний аналіз здійснюють при визначенні додатково  
трьох показників аномалій ядер, а саме: частоти  
клітин ядер з брунькою, хвостатих ядер та ядер із  
заглибленням на поверхні і за кількісними показ-  
никами аномалій ядер здійснюють оцінку геноток-  
сичності водного середовища.

Винахід належить до області екології навко-  
лишнього середовища, зокрема, до методів біоте-  
стування водних середовищ, і може бути викорис-  
таний для визначення якості водного середовища,

а саме, генотоксичності водних зразків на рівні  
клітини.

Для оцінки генотоксичності водних зразків до-  
сліджують їх вплив на тест-організми, у якості яких  
використовують риби. Риби - досить численний і

(19) UA (11) 95717 (13) C2

розповсюджений клас, що займає важливе місце в екосистемі, визнані зручним тест-об'єктом для вивчення якісного стану водного середовища. Однією з інтегральних систем, що дозволяють простежити порушення на різних рівнях функціонування, є система крові. Використання показників периферичної крові риб для моніторингу є актуальним. Гематологічні показники добре відображають реакцію декількох систем організму на дію різноманітних фізіологічних та патологічних факторів. [Roche, H., and Boge, G., 1996, Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication: Marine Environmental Research, vol.41, p. 27-43.] [1].

Відомий спосіб визначення генотоксичності водного середовища за допомогою мікроядерного аналізу на клітинах риб [Al-Sabti K. Fish micronuklei for assessing genotoxicity in water / K. Al-Sabti, C.D. Metcalfe // Mutation Res.-1995. - vol.23. - p.121-135.], [2]. Як біомаркер використовують клітини зябер, хвостового плавця, печінки та клітини периферичної крові риб. При здійсненні мікроядерного аналізу із використанням зазначених вище клітин визначають частоту мікроядер та подвійних ядер (аномалій ядер). За одержаними кількісними змінами оцінюють генотоксичність води. Як недолік відомого способу [2] можна відмітити невисоку чутливість до виявлення негативного впливу на організм наявних у воді токсикантів внаслідок визначення недостатньої кількості аномалій ядер.

Найбільш близьким аналогом до винаходу за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб оцінки цитотоксичності водного середовища [Tolga C. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys / C.Tolga, E.-G. Serap // Environmental and Molecular Mutagenesis. - 2002. - Vol.46, №1. - P. 64-70.], [3].

У способі [3] для визначення генотоксичності водного середовища за допомогою мікроядерного тесту, як біомаркер використовували еритроцити периферичної крові риб.

Досліджували кров риб, які були в контрольній воді та у забрудненій токсикантами воді. У досліджуваних риб відбирали кров із хвостової вени, робили мазки, фіксували 96 % етиловим спиртом 30 хв., висушували та фарбували 15 хв. розчином азур-еозину за Романовським. Аналіз препаратів крові проводили під світловим мікроскопом, загальне збільшення  $\times 1000$ , і визначали кількість клітин з мікроядрами та подвійними ядрами в контрольній та досліджуваній групах. Потім проводили порівняльний аналіз кількості утворених мікроядер та подвійних ядер. Частота утворення мікроядер (МЯ) та подвійних ядер (ЗЯ), а саме величина відхилення від контролю була використана для оцінки генотоксичності води.

Для визначення ефективності відомого способу з одержанням кількісних показників, нами були проведені досліді по визначенню генотоксичності водного зразка, що містив, наприклад, мідь в кількості  $0,01 \text{ мг/дм}^3$  та кадмій  $0,001 \text{ мг/дм}^3$ , що відповідає ГДК [ДСанПін-% "Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого

господарсько-питного водопостачання"] [4], а також мідь в кількості  $1 \text{ мг/дм}^3$ ,  $2,5 \text{ мг/дм}^3$  та кадмій в кількості  $1,0 \text{ мг/дм}^3$  і  $0,005 \text{ мг/дм}^3$ . Отримані дані представлені в таблиці, приклади 6-11, де показники аномалій ядер виражені у абсолютній величині і промілях. Проміле (лат. "pro mille" - за тисячу) - одна тисячна частка якої-небудь величини, позначається символом "‰".  $1\text{‰} = 10^{-3} = 0,001 = 0,1 \text{ \%}$ .

Як видно із таблиці, реалізація відомого способу [3] не забезпечує виявлення клітин з аномальними ядрами (МЯ, ЗЯ) при наявності у водних зразках міді  $0,01 \text{ мг/дм}^3$  та кадмію  $0,001 \text{ мг/дм}^3$ , на рівні з ГДК (приклади 6,9, відповідно).

Відомо, що навіть при низьких концентраціях токсикантів (мідь, кадмій) у питній воді, останні накопичуються в організмі і після всмоктування в кров пошкоджують центральну нервову систему, печінку і нирки, порушують фосфорно-кальцієвий обмін, а хронічне отруєння призводить до анемії і руйнування кісток, відзначається підвищений ризик раку легень. Кадмій легко накопичується у клітинах, які швидко проліферують, зв'язується з цитоплазматичним і ядерним матеріалом клітин та пошкоджує їх. Дослідження на тваринах свідчать про тератогенний, канцерогенний ефект токсикантів. Ряд досліджень свідчить про мутагенну активність сполук міді, таких як пригнічення РНК-полімерази, хромосомні аберації й аномальний клітинний поділ у тварин [Zhou X. Chemical and biological evidence for base propenals as the major source of the endogenous Mdg adduct in cellular DNA / X. Zhou, K. Taghizadeh, P.C. Dedon // J. Biol. Chem. - 2005. - Vol.280. - P. 253-258.]. [5].

Таким чином, як недолік способу [3] можна відмітити, що при визначенні аномалій ядер, які характеризуються лише частотами утворення мікроядер та подвійних ядер, не забезпечуються висока чутливість та інформативність щодо оцінки генотоксичності водного середовища, при низьких концентраціях токсикантів. Це особливо важливо при визначенні генотоксичності питної води.

В основу винаходу поставлена задача розробити спосіб оцінки генотоксичності водного середовища, в якому здійснення мікроядерного аналізу з додатково визначеними новими показниками аномалій ядер еритроцитів, забезпечило б підвищення чутливості та інформативності щодо оцінки генотоксичності водного середовища.

Для вирішення поставленої задачі запропоновано спосіб визначення генотоксичності водного середовища, що включає мікроядерний аналіз за частотою клітин із мікроядрами та подвійними ядрами із використанням як біомаркера еритроцитів крові риби, в якому, згідно з винаходом, мікроядерний аналіз здійснюють при визначенні додатково трьох показників аномалій ядер, а саме, частоти клітин ядер з брунькою, хвостатих ядер та ядер із заглибленням на поверхні і за кількісними показниками аномалій ядер здійснюють оцінку генотоксичності водного середовища.

Нами запропонований спосіб визначення генотоксичності водного середовища, який забезпечує виявлення повного набору аномалій ядер в еритроцитах крові риб (мікроядро, подвійне ядро, ядро

з брунькою, хвостате ядро, ядро із заглибленням на поверхні). Це забезпечує виявлення дії токсичних речовин в значно менших кількостях, наприклад, на рівні ГДК, що призводить до підвищення чутливості і інформативності способу і дозволяє одержати більш повну картину впливу токсичних речовин на тест-організм на клітинному рівні. Одержані результати свідчать про необхідність повної відсутності токсикантів у питної води.

Спосіб реалізується наступним чином.

Для визначення генотоксичності водних зразків використовували еритроцити периферичної крові риб і визначали наступні аномалії ядер:

- Мікроядра (МЯ);
- подвійні ядра (2Я);
- ядра з брунькою (ви́п'яченням) (ЯБ);
- хвостаті ядра (ХЯ);
- ядра із заглибленням (ви́імкою) на поверхні (ЯВ).

Експеримент проводили за наступною схемою: відбирали дві або більш дослідних груп риб (в залежності від кількості дослідних водних зразків), по 6-10 особин. Як об'єкт дослідження брали водні зразки, які містили токсичні речовини (ксенобіотики).

Для кожної дослідної групи використовували ємності (акваріуми) у відповідності із нормами біотестування. Дослідну групу розміщали у водні зразки, які були забруднені токсичними речовинами, а другу групу - у контрольну воду, та витримували протягом 96 годин. Як контрольний зразок використовували підготовлену лабораторну воду (відстояна водопровідна вода), яка відповідала стандартним рівням гідрохімічних показників: вміст  $O_2$  у воді акваріумів становив  $7,52 \pm 0,19$  мг/дм<sup>3</sup>,  $CO_2$  -  $2,34 \pm 0,13$  мг/дм<sup>3</sup>, а значення рН -  $7,64 \pm 0,13$ , температура складала  $20 \pm 2$  °C [Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-90. - М., 1991. - 29 с.]. [6].

Після експозиції риби у водному зразку, через 96 год. у всіх риб відбирали кров для цитологічного аналізу та готували препарати. Кров відбирали з хвостової вени, краплю крові наносили на попередньо знежирене предметне скло. Препарати висушували на повітрі, попереджуючи попадання пилу, фіксували в 96 %-му етанолі 30 хв. і знову висушували. Фіксовані препарати зберігались в сухому місці до проведення цитологічного аналізу. Препарати фарбували безпосередньо перед аналізом: на мазок наливали піпеткою 10-15 крапель готового барвника-фіксатора Мая-Грюнвельда, через 3-5 хвилин додавали по краплинам стільки ж води і продовжували забарвлення іще 1 хвилину, після чого барвник змивали дистильованою водою і мазок висушували на повітрі. На висушений мазок наливали свіжо приготований розчин барвника Романовського 2 % на 8-15 хв. (в залежності від температури в приміщенні), змивали барвник водою і мазок висушували.

Цитологічні препарати аналізували під світловим мікроскопом із загальним збільшенням  $\times 1000$ . Кількість клітин, проаналізованих для кожної риби, складала 3000. Статистична обробка проводилася стандартними методами, токсичний ефект вважається дійсним при статистично достовірній різниці

із контролем [Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высш. шк., 1980. - 293 с.]. [7].

Для визначення аномалії ядер підраховували частоту утворення ядер з брунькою, хвостатих ядер, ядер із заглибленням на поверхні, мікроядер та подвійних ядер на 3000 клітин еритроцитів, а потім підраховували відсоток кожного виду аномалій ядер в промілі (%). Визначені показники - частоти утворення аномалій ядер, порівнювали з контрольними і оцінювали генотоксичність водного середовища.

Для кількісного визначення токсичного ефекту за допомогою цитологічних показників клітин риб, а саме, аномалій ядер, нами були здійснені дослідні з визначення впливу різних токсичних речовин на обрані показники (на ядра еритроцитів крові). У якості токсичних речовин було використано розчини солей міді -  $CuSO_4$  (ГОСТ 4165-78) в концентраціях 0,01 мг/дм<sup>3</sup>, 2,5 мг/дм<sup>3</sup> та кадмію -  $CdCl_2$  (ГОСТ 4330-76) в концентраціях 0,001 мг/дм<sup>3</sup>, 1,0 мг/дм<sup>3</sup>.

Приклади реалізації за винаходом.

Приклад 1

Готували модельний розчин з використанням сульфату міді, що містив іони міді в концентрації 0,01 мг/дм<sup>3</sup>.

Як тест-організм брали карась сріблястий, *Carassius auratus gibelio*, вагою 12-15 гр., довжиною 8-10 см. Відбирали по 6 особин; контрольну групу (6 особин) вміщували у стандартну лабораторну воду та інкубували протягом чотирьох діб. Дослідну групу (6 особин) вміщували у модельний розчин. Після закінчення інкубації у всіх риб відбирали кров із хвостової вени. Готували препарати крові, проводили цитологічні дослідження, як описано вище. В периферичній крові риби виділяли еритроцити з такими аномальними ядрами: мікроядра, подвійні ядра, ядра з брунькою, хвостаті ядра та ядра із заглибленням на поверхні. Дані представлені в таблиці, приклад 2.

Як видно із даних таблиці (приклад 2), при концентрації міді 0,01 мг/дм<sup>3</sup> був виявлений її вплив тільки на наступні показники аномалії ядер: ядра з брунькою, хвостаті ядра та ядра із заглибленням на поверхні. Одержані дані показали генотоксичність водного зразка, навіть на рівні ГДК. Це свідчить про високу чутливість способу, що заявляється.

Слід відмітити, що відомим способом [3] токсичний вплив цього водного зразка не виявлено (таблиця, приклад 6).

Приклад 2

Об'єктом водного середовища був модельний розчин, що містив кадмій в кількості 0,001 мг/дм<sup>3</sup>. Як тест-організм брали карась сріблястий, *Carassius auratus gibelio*, вагою 12-15 гр., довжиною 8-10 см. Відбирали по 6 особин; контрольну групу (6 особин) вміщували у стандартну лабораторну воду та інкубували протягом чотирьох діб. Дослідну групу (6 особин) вміщували у лабораторну воду, яка містила 0,01 мг/дм<sup>3</sup> розчину сульфату міді. Після закінчення інкубації у всіх риб відбирали кров із хвостової вени. Готували препарати крові, проводили цитологічні дослідження, як описано вище. В периферичній крові риб були вияв-

лені еритроцити з такими аномальними ядрами: мікроядра, подвійні ядра, ядра з брунькою, хвостаті ядра та ядра із заглибленням на поверхні.

Як впливає із представлених даних таблиця, приклад 4, при концентрації 0,001 мг/дм<sup>3</sup> визначається вплив кадмію на наступні показники аномалії ядер: ядра з брунькою, хвостаті ядра та ядра із заглибленням на поверхні. При цьому показана генотоксичність водного зразка, навіть на рівні ГДК. Це свідчить про високу чутливість способу, що заявляється.

Слід відмітити, що відомим способом [3] токсичний вплив цього водного зразка не виявлено (таблиця, приклад 9).

Реалізація способу визначення генотоксичності водного середовища, що заявляється, з виявленням повного набору аномалій ядер забезпечує підвищення чутливості організму на клітинному рівні до дії токсичних речовин в низьких концентраціях (на рівні ГДК), тобто забезпечує одержання більш широкої інформації про токсичну дію різних токсикантів на клітинному рівні, а саме, на структуру генетичного апарата організму. Це важливо при визначенні генотоксичності питної води.

Таблиця

Зразки досліджуваної води		Показники аномалій ядер на 3000 клітин									
		МЯ		2Я		ЯБ		ХЯ		ЯВ	
		кількість	‰	кількість	‰	кількість	‰	кількість	‰	кількість	‰
1	Контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
За винаходом											
2	Cu 0,01 мг/дм <sup>3</sup>	0	0	0	0	3	1	6	2	7	2,33
3	Cu 2,5 мг/дм <sup>3</sup>	6	2	7	2,33	8	2,66	7	2,33	9	2,99
4	Cd 0,001 мг/дм <sup>3</sup>	0	0	0	0	5	1,66	3	1	6	2
5	Cd 1,0 мг/дм <sup>3</sup>	1	0,33	2	0,67	13	4,33	5	1,66	9	2,99
За способом [3]											
6	Cu 0,01 мг/дм <sup>3</sup>	0	0	0	0						
7	Cu 1,0 мг/дм <sup>3</sup>	2	0,67	3	1						
8	Cu 2,5 мг/дм <sup>3</sup>	6	2	7	2,33						
9	Cd 0,001 мг/дм <sup>3</sup>	0	0	0	0						
10	Cd 0,005 мг/дм <sup>3</sup>	0	0	1	0,33						
11	Cd 1,0 мг/дм <sup>3</sup>	1	0,33	2	0,67						