



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93964 (13) C2  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/18

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ПИТНОЇ ВОДИ І КУЛЬТУРАЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ЙОГО РЕАЛІЗАЦІЇ

1

(21) а201000606

(22) 22.01.2010

(24) 25.03.2011

(46) 25.03.2011, Бюл.№ 6, 2011 р.

(72) ГОНЧАРУК ВЛАДИСЛАВ ВОЛОДИМИРОВИЧ,  
БОЛТІНА ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА, ВЕРГОЛЯС  
МАЙЯ РОЗМЕТІВНА

(73) ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ  
ІМ. А.В. ДУМАНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-  
МІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA 53244 A, 15.01.03.

UA 14663 U, 15.05.06.

UA 34652 U, 26.08.08.

RU 2228521 C2, 10.05.04.

Maron D.M., Ames B.N. Revised for the Salmonella  
mutagenicity test. /Mat. Res. - 1983. - V. 113. - P.  
172-215.

Jaylet A, Gauthier L, Fernandez M. Detection of  
mutagenicity in drinking water using a micronucleus  
test in newt larvae (Pleurodeles waltl). Mutagenesis.  
1987 May;2(3):211-214 (abstract).

Van der Gaag MA, Van de Kerkhoff JF. Mutagenicity  
testing of water with fish: a step forward to a reliable  
assay. Sci Total Environ. 1985 Dec;47:293-298  
(abstract).

Дуган О. М. Сумарна мутагенна активність як інте-  
гральний показник оцінки еколого-генетичного  
стану довкілля: Автореферат дис. ... докт. біол.  
наук. - Київ - 1998.

Болтіна І.В. Частота аберацій хромосом в культурі  
лімфоцитів периферичної крові хворих на гліоми  
головного мозку при дії модельних мутагенів міто-  
міцину та диметаноату: Автореферат дис. ... канд.  
біол. наук. - Київ - 2005.

Верголяс М.Р. Морфофункціональні зміни клітин  
крові, зябер і хвостового плавця риб при оцінці  
якості водного середовища і дії токсичних чинни-  
ків: Автореферат дис. ... канд. біол. наук. - Львів -  
2010.

Руководство по краткосрочным тестам для выяв-  
ления мутагенных и канцерогенных химических  
веществ: ВОЗ, Женева. - 1989, С. 26-37, 62-86.

(57) 1. Спосіб визначення мутагенної активності  
питної води, що полягає у визначенні мутагенів і  
промутагенів, та включає використання тест-

2

об'єкта, який **відрізняється** тим, що як тест-об'єкт  
використовують культуру лімфоцитів периферич-  
ної крові людини, для визначення мутагенів в тест-  
об'єкт вводять досліджувану пробу води і культи-  
вують протягом 24 годин, центрифугують, в отри-  
маний осад вводять 0,56 % розчин хлориду калію,  
підігрітий до 37 °С, центрифугують, в осад вводять  
суміш крижаної оцтової кислоти та етилового  
спирту (КОіЕС) при об'ємному співвідношенні 1:3,  
відповідно, витримують при температурі 5-8 °С  
протягом 1 години, центрифугують, в осад повтор-  
но вводять суміш КОіЕС, витримують при темпе-  
ратурі 5-8 °С протягом 24 годин, центрифугують, в  
осад знову вводять суміш КОіЕС, витримують при  
температурі 5-8 °С протягом 24 годин, центрифугу-  
ють, отриманий осад по каплях переносять на  
два предметних скельця, охолоджених до -15÷-18  
°С, випалюють суміш КОіЕС, витримують 24 годи-  
ни при кімнатній температурі, забарвлюють 2,5 %  
розчином барвника Гімза, і в отриманому препара-  
ті підраховують мітотичний індекс та визначають  
мутагенність води за цитогенетичними показника-  
ми, а для визначення промутагенів використовують  
тест-об'єкт з попередньо введеною сумішшю  
кофакторів та фракції гомогенату печінки щурів S-  
9, в отриманому препараті знов підраховують мі-  
тотичний індекс та визначають мутагенність води  
за цитогенетичними показниками.

2. Культуральне середовище для отримання куль-  
тури лімфоцитів периферичної крові людини як  
тест-об'єкта щодо визначення мутагенної активності  
питної води за п. 1, що включає венозну кров,  
гепарин, натрієву сіль пеніциліну, мітоген і пожив-  
не середовище, яке **відрізняється** тим, що куль-  
туральне середовище додатково містить колхіцин,  
як мітоген - фітогемаглютинін (ФГА-Р), а як пожив-  
не середовище - RPMI-1640, і компоненти беруть в  
наступній кількості, розрахованій на 100 мл куль-  
турального середовища, мл:

венозна кров	12±0,5
гепарин	1,25-1,75
пеніциліну натрієва сіль	1,12-1,35
колхіцин	2,0-4,0
ФГА	23,7-26,2
RPMI-1640	решта.

(13) C2

(11) 93964

(19) UA

Винахід відноситься до області екології навколишнього середовища, зокрема, до методів біотестування водних середовищ і може бути використаний для визначення якості водного середовища, а саме мутагенної активності водних зразків на рівні клітини.

Спосіб визначення мутагенної активності води оснований на оцінці впливу питної води на культуру клітин, зокрема - лімфоцитів периферичної крові.

Відома оцінка мутагенної активності хімічних речовин, яка проводиться із використанням батареї короткострокових тестів [Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ: ВОЗ, Женева. - 1989. - 212 с.] [1].

Відомий тест з використанням мікроорганізмів, зокрема, тест Еймса, суть якого полягає в використанні двох основних компонентів: реєструючого (набір індикаторних штамів) та активуючого (постмітохондріальний супернатант гомогенату печінки щурів - фракції S-9 та ко-фактори) [1, ст. 26-37].

Відомі також цитогенетичні методи для оцінки мутагенності хімічних речовин [1, ст. 62-86], наприклад, метод обліку хромосомних аберацій в соматичних клітинах людини та тварин *in vitro* (культура клітин) та *in vivo* (кістковий мозок мишей) - про мутагенний ефект роблять висновки за частотою аберацій хромосом, що перевищують спонтанний рівень в нормі. Також для визначення мутагенної активності використовують вивчення сестринських хроматидних обмінів, принцип яких заключається у дії на клітини таким чином, щоб дві сестринські хроматиди відрізнялись одна від одної. Це досягається введенням в культуру клітин, яка зростає 5-бромдезоксиридин (БДУ) з подальшим забарвленням - це один із додаткових методів оцінки генетичної активності хімічних сполук.

Як випливає із суті відомих способів визначення мутагенності, останні використовуються, в основному, для дослідження мутагенної активності хімічних речовин, а не для питної води.

Найбільш близьким аналогом до винаходу за технічною суттю і результатом, що досягається, є спосіб визначення мутагенної активності води в тесті Еймса [Дуган А.М. Суммарная мутагенная активность вод из артезианских скважин и смешанного водопровода г. Киева // Проблемы экологической та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. Наук. Праць. - Київ, Луганськ. - 1998. - Вип. 9. - с. 18-21.] [2]. Тест Еймса використовується для скринінгу, коли потрібно дуже швидко проаналізувати велику кількість проб. Суть методу полягає в реєстрації здатності досліджуваної речовини та її метаболітів індукувати генні мутації від аутокотрофності до прототрофності по гістидину у індикаторних штамів *S. typhimurium* (тест-об'єкт), які несуть *his*<sup>-</sup>-мутації і не здатні синтезувати гістидин. З метою аналізу можливих промутагенів досліджувану воду піддають процесу біотрансформації за допомогою ферментів мікросомального окислення, що містяться в мітохондріальному супернатанті гомогенату печінки щурів - фракції S-9. Для цього бактерії *S. typhimurium* інкубують разом з досліджуваною водою, а також мікросомальною активуючою

сумішшю - S-9 міх (фракція S-9 + Ко-фактори: НАДФ і глюкозо-6-фосфат). Мутагенний ефект визначається за кількістю ревертантних колоній.

Основним недоліком відомого способу визначення мутагенної активності води [2] є те, що бактерії можуть дати відповідь на лише одне питання: чи може тестуєма речовина - вода - викликати мутації у бактерій, як тест-об'єкту, в присутності чи/або при відсутності екзогенної метаболічної системи, отриманої від ссавців (фракції S9); тобто, є обмеженість можливостей визначення мутагенної активності, яка має відношення тільки до мікроорганізмів. Екстраполяція отриманих даних на людину неможлива в зв'язку з тим, що людський організм є складною системою. Таким чином, отримані дані характеризуються малою інформативністю відносно мутагенної активності питної води, яка діє на людський організм.

В основу винаходу поставлено завдання розробити спосіб визначення мутагенної активності питної води та склад культурального середовища з використанням нового тест-об'єкту та нового порядку введення інгредієнтів культурального середовища, що забезпечило б розширення інформативних даних щодо мутагенної активності води з високою точністю.

Для вирішення поставленої задачі запропоновано спосіб визначення мутагенної активності питної води, що полягає у визначенні мутагенів і промутагенів з використанням тест-об'єкту, в якому, згідно з винаходом, як тест-об'єкт використовують культуру лімфоцитів периферичної крові людини, для визначення мутагенів в тест-об'єкт вводять досліджувану пробу води і культивують протягом 24 годин, центрифугують, в отриманий осад вводять 0,56-% розчин хлориду калію, підігрітий до 37 °С, центрифугують, в осад вводять суміш крижаної оцтової кислоти та етилового спирту (KoiEC) при об'ємному співвідношенні 1:3, відповідно, витримують при температурі 5-8 °С протягом 1 години, центрифугують, в осад повторно вводять суміш (KoiEC), витримують при температурі 5-8 °С протягом 24 годин, центрифугують, в осад знову вводять суміш (KoiEC), витримують при температурі 5-8 °С протягом 24 годин, центрифугують, отриманий осад по каплям переносять на два предметних скельця, охолоджених до (-15) + (-18) °С, випалюють суміш (KoiEC), витримують 24 години при кімнатній температурі, забарвлюють 2,5 % розчином барвника Гімза і в отриманому препараті підраховують мітотичний індекс та визначають мутагенність води за цитогенетичними показниками, а для отримання промутагенів використовують тест-об'єкт з попередньо введеною сумішшю кофакторів та фракції гомогенату печінки щурів S-9, в отриманому препараті знов підраховують мітотичний індекс та визначають мутагенність води за цитогенетичними показниками.

Задача вирішується і складом культурального середовища для отримання культури лімфоцитів периферичної крові людини як тест-об'єкту щодо визначення мутагенної активності питної води, що включає венозну кров, гепарин, натрієву сіль пеніциліну, мітоген і поживне середовище, в якому, згідно з винаходом, культуральне середовище

додатково містить колхіцин, як мітоген - фітогемаглютинін (ФГА-Р), як поживне середовище - RPMI-1640, і компоненти беруть в наступній кількості, розрахованій на 100 мл культурального середовища, мл:

Венозна кров	12±0,5
Гепарин	1,25-1,75
Пеніциліну натрієва сіль	1,12-1,35
Колхіцин	2,0-4,0
ФГА	23,7-26,2
RPMI-1640	решта

Заявником вперше запропоновано спосіб визначення мутагенної активності питної води, суттєві ознаки якого, що надані у формулі винаходу (п.1), дозволяють визначати у воді як мутагени, так і промутагени. Висока результативність способу досягається використанням запропонованого вперше тест-об'єкту - культури лімфоцитів периферичної крові людини, а також складом культурального розчину для одержання тест-об'єкту.

Запропонований спосіб характеризується послідовністю дій та параметрами їх виконання, що дозволяє визначати поряд з широко застосовуваними цитогенетичними показниками - частота метафаз з абераціями, так і додаткові показники - кількість анеуплоїдних клітин, які характеризують можливий канцерогенний ризик для людського організму, та наявність чи відсутність мультиаберагантних клітин, що показують вплив на систему репарації (відновлення) організму.

Приклад виконання за винаходом.

Визначали мутагенну активність питної води марки «Софія Київська», що полягає у визначенні мутагенів та промутагенів.

Попередньо готували культуральне середовище для отримання культури лімфоцитів периферичної крові людини. Використовували культуру лімфоцитів, отриману від практично здорового донора - жінки 42 років, яка не приймала медичних препаратів та не досліджувалась упродовж року рентгенологічно. Кров відбирали одноразовим шприцом з ліктьової вени, розливали по 1 мл в дві стерильні гепаринізовані (5 Од. в 0,1 мл фізіологічного розчину - 0,9 % NaCl) центрифужні пробірки. До пробірок з кров'ю в стерильних умовах послідовно додавали 0,1 мл розчину колхіцину в концентрації 0,04 мкг/мл і 20 Од. натрієвої солі пеніциліну (в 0,1 мл фізіологічного розчину). Потім в пробірки до об'єму 8 мл додавали готове поживне середовище - RPMI 1640 (Sigma). Як мітоген використовували фітогемаглютинін-Р ФГА-Р (Sigma) в кількості 20 мкг/мл культурального середовища. Одержали культуральне середовище з наступним вмістом компонентів, розрахованим на 100 мл середовища, мл:

Венозна кров	12,5
Гепарин	1,25
Пеніциліну натрієва сіль	1,25

Колхіцин	4,0
ФГА	25,0
RPMI-1640	56,0

Вміст кожної пробірки розподіляли по двом скляним флаконам (4 мл), які герметично перекривали гумовими корками та інкубували в термостаті при +37°C протягом 28 годин.

Визначення мутагенів.

Брали два флакони з культуральним середовищем і вносили по 0,1 мл досліджуваної води. Культивували 24 години при температурі 37°C. Після інкубації вміст кожного флакона переносили в центрифужну пробірку. Центрифугування проводили упродовж 5 хвилин при 1000 об/хв. Надосад видаляли, залишивши шар в 0,5 мл над поверхнею осаду. Гіпотонічну обробку проводили 0,56 % розчином КС1 протягом 5 хвилин при +37°C. Пробірки знову центрифугували, надосад видаляли, як описано вище. Фіксацію осаду проводили свіже приготованим фіксатором об'ємом 4 мл, що містить суміш крижаної оцтової кислоти і охолодженого до +4°C етанолу при об'ємному співвідношенні 1:3, відповідно. Пробірку витримували в холодильнику при температурі +4°C протягом 1 години. Процедуру фіксації, яка описана вище, повторювали ще двічі, при цьому час витримування пробірок в холодильнику для другої і третьої фіксації становив 24 години.

Після третьої фіксації пробірки центрифугували, видаляли надосад, як описано вище. Одержаний після фіксації осад по каплям переносили на два заморожені (при -15°C) предметні скельця. Фіксатор випалювали в полум'ї спиртівки. Препарати забарвлювали 2,5 % розчином барвника Гімза.

Експерименти супроводжували негативним (чиста культура лімфоцитів периферичної крові) і позитивним контролем. У позитивному контрольному варіанті в експерименті без метаболічної активації в культуральне середовище на 28 годині інкубації вносили Мітоміцин-С в концентрації 10,0 мкг/мл. Всі робочі розчини готували безпосередньо перед внесенням в культуральне середовище.

Мітотичний індекс (MI - %), що є показником цитотоксичності проби, підраховували на 1000 клітин згідно з формулою:  $MI = n/1000 \times 100$ , де n - кількість метафаз на 1000 мітозів.

Мітотичний індекс визначали і у пробі, і у негативному контролі. У пробі питної води Софія Київська у варіанті експерименту без метаболічної активації (визначення мутагенів) - мітотичний індекс становив 32,0 %, в контролі - 34,0 %, тобто цитотоксичність в пробі питної води Софія Київська не спостерігалась, тому що показники мітотичного індексу в пробі і контролі достовірно не відрізнялись між собою.

Далі під мікроскопом проводили визначення цитогенетичних показників (табл. 1).

Таблиця 1

Цитогенетичні показники в культурі лімфоцитів периферичної крові  
при вивченні дії прямих мутагенів (варіант експерименту без метаболічної активації)

Проба	Мітотичний індекс (MI), %	Середня частота, M±m, %		Мультиаберантні клітини, кількість
		метафаз з абераціями	анеуплоїдних клітин	
Контроль негативний	34,0±1,4	1,50±0,86	11,50±2,21	
Контроль позитивний	Не визначається	15,00±3,40 <sup>1</sup>	22,00±4,10 <sup>1</sup>	4
Софія Київська	32,0±1,3	5,50±1,61 <sup>1</sup>	15,50±2,56	

Примітка: <sup>1</sup> - P≤0,05

Далі під мікроскопом вивчалися цитогенетичні показники: частота аберацій хромосом, кількість анеуплоїдних та мультиаберантних клітин.

При дії на культуру лімфоцитів питної води Софія Київська спостерігалось достовірне підвищення частоти аберацій хромосом - 5,5 % проти 1,5 % в негативному контролі. При дії Мітоміцину-С (позитивний контроль) було встановлено достовірне (P<0,05) підвищення частоти аберантних метафаз, що підтверджує адекватність використання даної тест-системи для дослідження цитогенетичної активності питної води.

При дії на культуру лімфоцитів питної води Софія Київська статистично достовірного підвищення кількості анеуплоїдних клітин не спостерігалось. При аналізі дії питної води Софія Київська на культуру лімфоцитів периферичної крові мультиаберантні клітини не знайдені.

З одержаних даних випливає, що досліджувана вода має слабку мутагенну активність при дослідженні прямих мутагенів (варіант експерименту без метаболічної активації), про що свідчить статистичне підвищення частоти аберацій хромосом.

Визначення промутагенів.

Попередньо готували мікросомальну активуючу суміш (S-9 mix) за методичними рекомендаціями D.M. Maron і B.N. Ames [Maron D.M., Ames B.N. Revised for the Salmonella mutagenicity test. /Mat. Res. - 1983. - V. 113. - P. 172-215] [3]. Для приготування 50 мл активуючої суміші (S-9 mix) брали наступні компоненти в зазначених кількостях, мл:

Розчин MgCl <sub>2</sub> / KCl	1,0
1 М глюкозо-6-фосфат (Sigma)	0,25
0,1 MNADF (Sigma)	2,0
0,2 М фосфатний буфер (pH=7,4)	25,0
Стерильна дистильована вода	решта

Брали наступні два флакони з культуральною сумішшю і в кожному флакон додавали по 0,05 мл

мікросомальної активуючої суміші та по 0,05 мл гомогенату печінки щурів.

Після цього додавали по 0,1 мл досліджуваної води. Культивували 24 години при температурі 37°C. Після інкубації вміст кожного флакона переносили в центрифужну пробірку. Центрифугування проводили упродовж 5 хвилин при 1000 об/хв. Надосад видаляли, залишивши шар в 0,5 мл над поверхнею осаду. Гіпотонічну обробку проводили 0,56 % розчином KCl протягом 5 хвилин при +37°C. Пробірки знову центрифугували, надосад видаляли як описано вище. Фіксацію осаду проводили свіже приготованим фіксатором об'ємом 4 мл, що містить суміш охолодженого до +4°C етанолу і крижаної оцтової кислоти при об'ємному співвідношенні 3:1, відповідно. Пробірку витримували в холодильнику при температурі +4°C протягом 60 хвилин. Процедура фіксації, яка описана вище, повторювали ще двічі, при цьому час витримування пробірок в холодильнику для другої і третьої фіксації становив по 24 години.

Після третьої фіксації пробірки центрифугували, видаляли надосад, як описано вище. Одержаний після фіксації осад по каплям переносили на два заморожені (при -15°C) предметні скельця. Залишки фіксатора випалювали в полум'ї спиртівки. Препарати забарвлювали 2,5 % розчином барвника Гімза.

Експерименти супроводжували контролем S-9 (в «чисту культуру» лімфоцитів периферичної крові додавали Ко-фактори та мікросомальну активуючу суміш - S-9 mix) і позитивним контролем. У позитивному контрольному варіанті в експерименті з метаболічною активацією в культуру лімфоцитів на 28 годині інкубації вносили циклофосфан в концентрації 20 мкг/мл. Всі робочі розчини готували безпосередньо перед внесенням в культуру.

Далі під мікроскопом проводили визначення цитогенетичних показників (табл. 2).

Таблиця 2

Цитогенетичні показники в культурі лімфоцитів периферичної крові при вивченні дії промутагенів (варіант експерименту з метаболічною активацією)

Проба	Мітотичний індекс (MI), %	Середня частота, M±m, %		Мультиаберантні клітини, кількість
		метафаз з абераціями	анеуплоїдних клітин	
Контроль S-9	34,0±1,4	2,00±0,99	11,50±2,30	
Позитивний контроль	Не визначається	17,00±3,80 <sup>1</sup>	24,00±4,27 <sup>1</sup>	4
Софія Київська	14,0±1,1 <sup>1</sup>	6,00±2,37	22,00±4,14 <sup>1</sup>	1

Примітка: <sup>1</sup> - P≤0,05

Мітотичний індекс (MI - %), що є показником цитотоксичності проби підраховували на 1000 клітин згідно з формулою:  $MI = n/1000 \times 100$ , де n - кількість метафаз на 1000 мітозів.

Мітотичний індекс визначали і у пробі і у контролі S-9. У пробі питної води Софія Київська в варіанті експерименту з метаболічною активацією (визначення промутагенів) - мітотичний індекс становив 14,0 %, в контролі - 34,0 %, отже, в пробі питної води Софія Київська в варіанті експерименту з метаболічною активацією спостерігався напівтоксичний ефект.

Далі під мікроскопом вивчалися цитогенетичні показники: частота аберацій хромосом, кількість анеуплоїдних та мультиаберантних клітин.

При дії на культуру лімфоцитів питної води Софія Київська в варіанті експерименту з метаболічною активацією достовірного збільшення частоти аберацій хромосом не спостерігалось через напівтоксичний ефект.

При дії циклофосфану (позитивний контроль) було встановлено достовірне ( $P < 0,05$ ) підвищення частоти аберантних метафаз, що підтверджує адекватність використання даної тест-системи для дослідження цитогенетичної активності питної води.

При дії на культуру лімфоцитів питної води Софія Київська спостерігалось статистично достовірне підвищення кількості анеуплоїдних клітин - 22,0 % в пробі проти 11,5 % в контролі S-9, тобто, є можливість виникнення канцерогенного ризику.

При аналізі дії питної води Софія Київська на культуру лімфоцитів периферичної крові була знайдена одна мультиаберантна клітина, що свідчить про можливість впливу питної води Софія Київська на виникнення змін в системі репарації.

Із одержаних даних видно, що досліджувана вода також має слабку мутагенну активність при дослідженні промутагенів (варіант експерименту з

метаболічною активацією), про що свідчить напівтоксичний ефект, статистично достовірне підвищення частоти анеуплоїдних клітин та наявність мультиаберантних клітин.

Отже, дані по визначенню мутагенної активності питної води «Софія Київська» свідчать про наступне: виявлена слабка мутагенна активність при вивченні як прямих так і непрямих мутагенів. Крім того, можна констатувати, що метаболіти, які виникають при попаданні в організм людини промутагенів, що містяться в пробі питної води «Софія Київська», впливають на систему репарації клітин та викликати можливий канцерогенний ризик.

Як впливає із наведених результатів відображених у прикладі висока результативність заявляемого способу визначення мутагенної активності води досягається і використанням складу культурального середовища, компоненти якого в сукупності забезпечують необхідний перебіг їх взаємодії із одержанням широкої гами цитогенетичних показників з високою точністю.

Переваги запропонованої групи винаходів - способу визначення мутагенної активності питної води та складу культурального середовища для його реалізації, в порівнянні з відомим технічним рішенням [2], полягають в розширенні інформативності одержаних даних за рахунок збільшення кількості отриманих з високою точністю цитогенетичних показників щодо визначення мутагенної активності питної води, які характеризують можливий негативний вплив на організм людини. Одержаний результат не досягається відомим способом.

Достойністю запропонованого способу є доступність матеріалу, синхронність клітинної популяції, низький рівень спонтанного мутування, відпрацьованість техніки культивування та вивчення морфології хромосом.