



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 106443

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/12 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

| | | |
|--|---|---|
| (21) Номер заявки: | а 2013 05188 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: |
| (22) Дата подання заявки: | 22.04.2013 | Козлова Н.В., Каниева Н.А. Перекисное окисление липидов в мышцах осетровых рыб под влиянием химических веществ. Фундаментальные исследования №9, 2006. Материалы конференции. |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 26.08.2014 | Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // Anal. Biochem. - 1979. - Vol. 95, № 2. - P. 351-358. |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 10.09.2013, Бюл. № 17 | Малік М.Г. Використання гліального фібрилярного кислого білка мозку риб у діагностиці стану природного середовища. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. - 2010. - Вип. 18, т. 1. - С. 92-97 |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 26.08.2014, Бюл. № 16 | Абросимов С.С. Роль минеральных препаратов в функционировании системы антиоксидантной защиты организма (на примере молоди русского осетра) Экспериментальная физиология, морфология и медицина. // Естественные науки. - № 4(33), 2010 |
| (72) Винахідник(и): | Сухаренко Олена Валеріївна (UA), Недзвецкий Віктор Станіславович (UA), Новіцький Роман Олександрович (UA) | Клименко О.Ю., Гассо В.Я. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів у прудкої ящірки з екосистем різного рівня трансформації. Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах: Матеріали VI Міжнародної наукової конференції. - Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2011. - С. 292-294 |
| (73) Власник(и): | Сухаренко Олена Валеріївна, вул. Високовольна, 18, кв. 43, м. Дніпропетровськ, 49107 (UA) | |

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ ПОПУЛЯЦІЙ РИБ В УМОВАХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ СЕРЕДОВИЩА

(57) Реферат:

Винахід належить до біології, екології, екотоксикології, зокрема до дослідження нейроглії риб, і може бути використаний для характеристики стану риб за умов техногенного забруднення водного середовища.

Запропонований спосіб включає відбір і проведення аналізу біологічного матеріалу. Попередньо отримують контрольні проби головного мозку риб з умовно чистих водойм, які гомогенізують (на холоді) у 10-кратному об'ємі 50 мМ трис-буфера рН 7,8, що містить 2 мМ етилендіамінтетраоцетату (ЕДТА). Ті ж самі проби одержують з головного мозку риб, що мешкають у забруднених водоймах. Проводять аналіз вмісту МДА та 4-гідроксіалкенів для визначення рівня перекисного окиснення ліпідів, виконують порівняльний аналіз контрольних та експериментальних проб. За відмінностями роблять висновок про ступінь оксидативного стресу

UA 106443 C2

в мозку риб. За цим показником оцінюють рівень нейротоксичності та ступінь несприятливого впливу забруднювачів середовища на стан риб.

Спосіб дозволяє виявляти структурно-функціональні порушення на ранніх стадіях інтоксикації, а також диференціювати ступінь несприятливого впливу забруднювачів на стан риб.

Оцінка стану риб базується на визначенні рівня окислювальних пошкоджень ліпідів мозку, які викликані порушенням окиснювально-відновного балансу клітин, що індуковані дією забруднювачів водного середовища.

Винахід належить до біології, екології, екотоксикології, зокрема до дослідження нейроглії риб, і може бути використаний для характеристики стану риб в умовах техногенного забруднення.

Найбільш близьким об'єктом того ж призначення до винаходу, що заявляється, є відомий спосіб визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) і 4-гідроксіалкенів у тканинах біологічних об'єктів, за якими судять про перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) [1]. Вміст кінцевих продуктів ПОЛ є одним з основних показників генерації оксидативного стресу, що виникає під впливом забруднювачів водного середовища. Оксидативний стрес може бути локальним, помірним та сильним, який призводить до структурно-функціональних порушень і загибелі клітин. Суттєвим недоліком прототипу є те, що ПОЛ визначають у крові, печінці, м'язовій тканині, тобто в біологічних тканинах з високим антиоксидантним захистом, тому ці показники не можуть служити об'єктивними біологічними маркерами стану риб за умов техногенного забруднення середовища.

Головний мозок є найбільш вразливим для індукованого техногенними забруднювачами посилення перекисного окиснення ліпідів, оскільки клітини нервової тканини характеризуються значною інтенсивністю окиснювального метаболізму, максимальним, відносно інших органів, вмістом субстратів ПОЛ, високим індексом споживання кисню і слабкою системою антиоксидантного захисту.

В основу винаходу поставлено задачу знайти нові адекватні молекулярні біомаркери, які дозволяють диференціювати стан риб в умовах впливу техногенного забруднення водного середовища.

Поставлена задача вирішується тим, що вміст ПОЛ, який є основним показником генерації оксидативного стресу в клітинах головного мозку риб, використовують як адекватний молекулярний біомаркер метаболічних порушень, і за зростанням кількості продуктів перекисного окиснення ліпідів у порівнянні із контрольними пробами з гомогенатів головного мозку риб, що мешкають в умовно чистих водоймах, визначають наявність оксидативного стресу та ступінь несприятливого впливу забруднювачів водного середовища на стан риб.

Запропонований спосіб полягає в наступному. З початку отримують контрольні проби гомогенатів головного мозку риб, що мешкають в умовно чистих водоймах, проводять визначення в них рівня перекисного окиснення ліпідів, потім проводять відбір екземплярів риб з водного середовища, що містить техногенні забруднювачі. Біологічний матеріал отримують декапітацією за методикою, яка використовується для роботи з дрібними тваринами. Після декапітації головний мозок риб гомогенізують (на холоді) у 10-кратному об'ємі 50 мМ трис-буфера рН 7,8, що містить 2 мМ етилендіамінтетраоцетату (ЕДТА). Рівень перекисного окиснення ліпідів у гомогенатах мозку риб визначають за допомогою тест-наборів (зокрема, LPO-586, Oxis, Int. Inc., USA) методом, що заснований на виявленні малонового діальдегіду (МДА), який утворюється завдяки деградації ліпідів активними формами кисню. Рівень МДА та 4-гідроксіалкенів у мозку риб визначають за кількістю тіобарбітурореактивних речовин (ТБК-активних продуктів), що утворюються в ході реакції з тіобарбітуровою кислотою або N-метил-2-феніліндолом [1]. Обробку отриманих даних: проводять методом математичної статистики для малих вибірок. Відносний вміст ТБК-активних продуктів представляють у вигляді середньої величини \pm стандартна похибка середньої, достовірне розходження між групами оцінюють із застосуванням t-критерію Стюдента ($P < 0,05$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу і відмінностей між генеральними дисперсіями. За вмістом ТБК-активних продуктів визначають інтенсивність перекисного окиснення ліпідів, який вказує на ступінь метаболічних порушень у риб.

Приклад 1. Алюміній є одним з найбільш поширених металів земної кори. Ступінь його акумуляції в живих організмах обмежена нерозчинністю у воді більшості його природних сполук. Однак у випадку, коли нерозчинні сполуки алюмінію солюбілізуються у кислому середовищі шлунка, токсичні іони Al^{3+} можуть надходити у кров, а потім і в мозок. Підвищені концентрації алюмінію в організмі провокують розвиток різних патологій, що викликані, головним чином, порушенням окисно-відновного балансу тканин головного мозку тварин. У дослідженні використовували 10 екземплярів сонячного окуня (*Lepomis gibbosus*) і 10 екземплярів карася (*Carasius*) віком від 3 до 4 років. Риб тримали у двох однакових акваріумах місткістю по 180 літрів. В акваріумах протягом 6 тижнів концентрацію іонів Al^{3+} підтримували на рівні 10 мг/л шляхом підміни $\frac{1}{4}$ частини води розчином хлориду алюмінію ($AlCl_3$). Підміну води проводили 2 рази на тиждень. Контрольні групи сонячного окуня і карася тримали у акваріумах з очищеною водопровідною водою.

Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) - одного з основних показників генерації оксидативного стресу - був достовірно підвищеним у мозку сонячного окуня (42,6 %) і

карася (41,9 %) за умовами забруднення середовища іонами Al^{3+} у порівнянні з рибами тих же видів, що тримали у чистій водопровідній воді (фіг. 1).

Приклад 2. Іони свинцю індують окислювальні пошкодження в багатьох типах клітин і широко використовуються в експериментальних моделях генерації окисного стресу. Дослідження проводили з залученням 10 екземплярів *Lepomis gibbosus* та *Carasius* віком 3-4 роки. Дві групи риб тримали у акваріумах об'ємом по 180 літрів. У акваріумах концентрацію іонів Pb^{2+} підтримували протягом експерименту на рівні 10 мг/л. Підміну води в кожному акваріумі проводили 2 рази на тиждень протягом 6 тижнів оновленням 1/5 частини води розчином ацетату свинцю $(CH_3COO)_2Pb$. Контрольні групи по 10 екземплярів сонячного окуня і карася тримали у акваріумах з очищеною водопровідною водою.

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів був достовірно підвищеним у мозку сонячного окуня (52,7 %) і карася (61,5 %) при забрудненні середовища іонами свинцю в порівнянні з екземплярами риб контрольної групи (фіг. 2).

Приклад 3. Більшість промислових органічних сполук не розчиняється у полярних розчинниках, тому в організм гідробіонтів ці сполуки потрапляють шляхом адсорбції в органах дихання завдяки їх здатності формувати у водному середовищі міцели, що утворюються з широким колом інших органічних речовин. Хлорбензол - поширений промисловий розчинник, який здатен викликати порушення процесу клітинного дихання, окисно-відновного балансу і тим самим індукувати в організмі окислювальний стрес. В експерименті використовували 10 дорослих екземплярів сонячного окуня і 10 екземплярів карася. Групи тримали у двох різних акваріумах об'ємом 180 літрів. Хлорбензол в акваріум вносили у складі міцел хлоробензол-диметилсульфоксид-поліетиленгліколь з розрахунку 20 мг хлорбензолу на 1 літр. Концентрацію хлорбензолу в акваріумах підтримували постійною протягом 6 тижнів. Підміну води в акваріумах проводили 2 рази на тиждень.

При визначенні кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у мозку риб, яких тримали у акваріумах з підвищеною концентрацією хлорбензолу, виявлено достовірне збільшення ПОЛ на 57,8 % (сонячний окунь) та 66,8 % (карась) у порівнянні з контрольними групами (фіг. 3).

Оксидативний стрес є одним з найбільш поширених метаболічних порушень за умовами дії несприятливих факторів і одним з головних індукторів структурно-функціональних змін в клітинах центральної нервової системи, тому окислювальні пошкодження розглядають як найбільш ймовірний механізм реалізації токсичних ефектів. Нервова тканина риб, внаслідок значного вмісту поліненасичених жирних кислот і високого рівня утилізації кисню (приблизно 1/5 загального споживання), найбільш схильна до оксидативних пошкоджень.

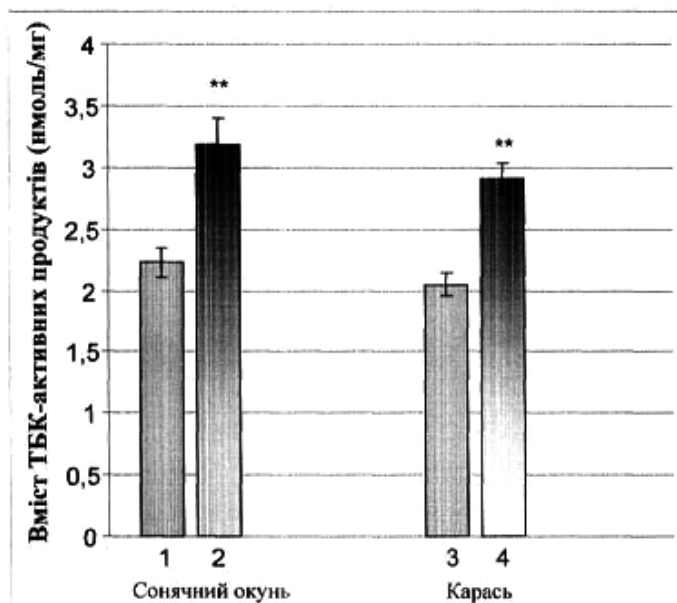
До теперішнього часу генерація оксидативного стресу в клітинах головного мозку не використовувалась як індикатор стану риб за умовами техногенного забруднення водного середовища. Вміст кінцевих продуктів ПОЛ є показником інтенсивності оксидативного стресу і дозволяє використовувати перекисне окиснення ліпідів головного мозку як чутливий і достовірний біомаркер стану риб в умовах забруднення водного середовища ксенобіотиками на різних стадіях інтоксикації.

Джерела інформації:

1. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // Anal. Biochem. - 1979. - Vol. 95, № 2. - P. 351-358.

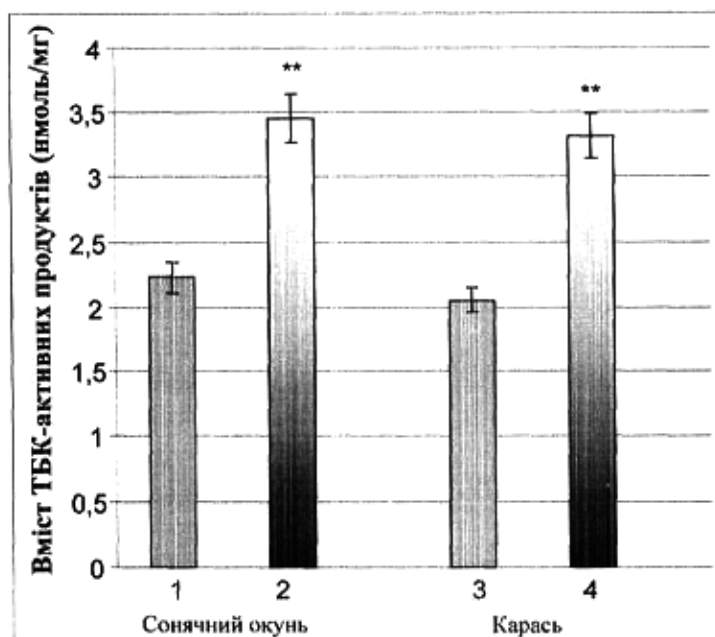
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення стану популяцій риб в умовах техногенного забруднення середовища, що включає відбір і проведення аналізу біологічного матеріалу шляхом вимірювання перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), який **відрізняється** тим, що попередньо отримують контрольні проби головного мозку риб з умовно чистих водойм, які гомогенізують (на холоді) у 10-кратному об'ємі 50 мМ трис-буфера рН 7,8, що містить 2 мМ етилендіамінтетраацетату (ЕДТА), ті ж самі проби одержують з головного мозку риб, що мешкають у забруднених водоймах, проводять аналіз вмісту малонового діальдегіду (МДА) та 4-гідроксіалкенів для визначення рівня перекисного окиснення ліпідів, виконують порівняльний аналіз контрольних та експериментальних проб, за відмінностями роблять висновок про ступінь оксидативного стресу в мозку риб, за цим показником оцінюють рівень нейротоксичності та ступінь несприятливого впливу забруднювачів середовища на стан риб.



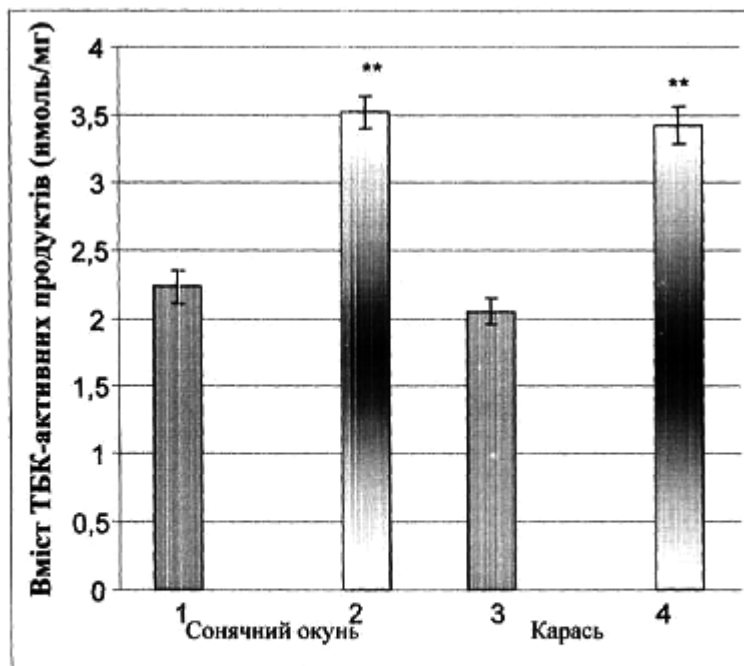
Фіг. 1

Вміст ПОЛ у мозку сонячного окуня (2) і карася (4) за умовами хронічного забруднення іонами алюмінію в порівнянні з контрольними групами риб тих же видів (1 і 3 відповідно)



Фіг. 2

Вміст ПОЛ у мозку сонячного окуня (2) та карася (4) за умовами забруднення іонами свинцю в порівнянні з контрольними групами риб тих же видів (1 і 3 відповідно)



Фіг. 3

Вміст ПОП у мозку сонячного окуня (2) і карася (4) за умовами забруднення середовища хлорбензолом в порівнянні з контрольними групами риб тих же видів (1 і 3 відповідно)

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601