



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106145** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2013 01623	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22)	Дата подання заявки:	11.02.2013		UA 12548 U, 15.02.2006
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.07.2014		Lin Sun P. Morphological Deformities as Biomarkers in Fish from Contaminated Rivers in Taiwan / P. Lin Sun, William E. Hawkins, Robin M. Overstreet, Nancy J. Brown-Peterson // Int. J. Environ. Res. Public Health. - 2009. - V. 6, P. 2307-2331
(41)	Публікація відомостей про заявку:	25.07.2013, Бюл.№ 14		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:	25.07.2014, Бюл.№ 14		Недзвецкий В.С., Тихомиров А.А., Кириченко С.В., Корякина Ж.А., Липка М.В.. Возможности использования молекулярных компонентов с целью сохранения биологического разнообразия в условиях действия неблагоприятных факторов. Екологія та ноосферологія. 2005, - Т.16, 3-4,- С. 215-221
(72)	Винахідник(и):	Сухаренко Олена Валеріївна (UA), Недзвецкий Віктор Станіславович (UA), Новіцький Роман Олександрович (UA)		
(73)	Власник(и):	Сухаренко Олена Валеріївна, вул. Високовольтна, буд. 18, кв. 43, м. Дніпропетровськ, 49107 (UA)		

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

(57) Реферат:

Винахід належить до біології, екології, екотоксикології, зокрема до дослідження реактивного астрогліозу в мозку риб, і може бути використаний для характеристики стану популяцій риб в умовах забруднення середовища. Заявлено спосіб визначення стану популяцій риб в умовах забруднення середовища іонами металів, що включає відбір і проведення аналізу біологічного матеріалу, при цьому попередньо одержують контрольні проби цитоскелетних білків головного мозку риб з умовно чистих водойм, які екстрагують з біологічного матеріалу за допомогою 4-и кратного об'єму трис-буфера, що додатково містить 4М сечовину, ті ж самі проби цитоскелетних білків одержують з головного мозку риб, що мешкають у забруднених іонами металів водоймах - експериментальні проби, проводять імунохімічний аналіз проб для визначення вмісту водонерозчинної (цитоскелетної) форми гліального фібрилярного кислого білка з молекулярною масою 49 кДа і його поліпептидних фрагментів з молекулярними масами від 37 до 49 кДа та виконують порівняльний аналіз за відмінностями інтенсивності забарвлення відповідних поліпептидних зон між контрольними і експериментальними пробами.

UA 106145 C2

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

Найбільш близьким об'єктом того ж призначення до винаходу, що заявляється, є спосіб оцінки вливу забруднювачів водного середовища на стан популяцій риб, який ґрунтується на біологічному аналізі, в ході якого візуально спостерігаються фенотип риб, аналізуються морфологічні характеристики, виявляються екземпляри з різними морфологічними та фізіологічними аберациями. Суттєвим недоліком прототипу є те, що морфологічні аномалії не виявляються на ранніх стадіях дії забруднювачів і не можуть служити біомаркерами ступеня впливу іонів металів на стан популяцій риб в умовах забруднення ними середовища [1, 2].

В основу винаходу поставлено задачу розробити такий спосіб визначення метаболічних порушень, який дозволить диференціювати міру несприятливого впливу іонів металів на стан популяцій риб на різних, у тому числі і ранніх, стадіях інтоксикації.

Поставлена задача вирішується тим, що заздалегідь отримують контрольні проби цитоскелетних білків головного мозку риб, які мешкають в умовно чистих водоймах, проводять імунохімічний аналіз для визначення вмісту ГФКБ з молекулярною масою 49 кДа і його поліпептидних фрагментів з молекулярними масами від 37 до 49 кДа, потім ті ж самі дослідження проводять з біологічним матеріалом, який отриманий з головного мозку риб з водойм, що забруднені іонами металів, виконують порівняльний аналіз, за інтенсивністю забарвлення відповідних поліпептидних зон між контрольними і експериментальними пробами судять про вміст і склад ГФКБ, визначають інтенсивність розвитку астрогліозу, за яким оцінюють міру несприятливого впливу середовища на стан риб.

Запропонований спосіб полягає в наступному. Проводять відбір екземплярів риб з водного середовища, забрудненого іонами металів. Біологічний матеріал отримують декапітацією за методикою, яка використовується для роботи з дрібними тваринами. Після декапітації головний мозок риб гомогенізують (на холоді) в 10-ти кратному об'ємі 50 мМ трис-буфера рН 7,8, що містить 2 мМ етилендіамінтетраоцетат (ЕДТА), 1 мМ 2-меркаптоетанол, 0,1 мМ фенілметилсульфонілфторид (PMSF) і 5 мМ соєвого інгібітору трипсину. Гомогенат центрифугують 50 хв при 60000 g. Після центрифугування відбирають з надосадової рідини фракцію водорозчинних білків. Для екстракції цитоскелетних білків до отриманого осаду додають 4-и кратний об'єм трис-буфера, що додатково містить 4М сечовину. Після центрифугування впродовж 60 хв при 60000 g відбирають фракцію водорозчинних білків. Білки розділяють методом електрофорезу в градієнті поліакриламідного гелю (7-18 %) з 0,1 % додецилсульфатом натрію. Визначення поліпептидного складу гліальних філаментів проводять за допомогою імуноблотингу з використанням поліклональної моноспецифічної антисироватки в розведенні 1:2500. Відносну інтенсивність щільності забарвлення поліпептидних зон виявляють за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу. Кількісний аналіз ГФКБ проводять шляхом порівняння інтенсивності забарвлення відповідних поліпептидних зон між експериментальними і контрольними пробами, які віднесені до кількості загального білка у фракціях. Вміст загального білка, визначають методом Лоурі в модифікації Міллера. Обробку отриманих даних проводять методом математичної статистики для малих вибірок. Відносний вміст ГФКБ виражають у вигляді середньої величини \pm стандартна похибка середньої, достовірну відмінність між групами оцінюють із застосуванням t-критерію Стьюдента ($P < 0,05$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу і відмінність між генеральними дисперсіями. За показниками відносного вмісту ГФКБ визначають інтенсивність астрогліозу, який вказує на характер метаболічних порушень в популяції риб.

Приклад 1.

Досліджували 35 екземплярів плітки звичайної (*Rutilus rutilus*) та бичка-пісочника (*Neogobius fluviatilis*). Проби відбирали в липні в 2009 р. на забрудненій іонами металів ділянці річки Самара Дніпровська - правому припливі р. Дніпро, куди надходять стоки хімічних, металургійних та інших виробництв. Як контроль була вибрана умовно чиста акваторія річки Ворскла в районі існуючого іхтіологічного заповідника. Відносний вміст цитоскелетного маркера астроцитів ГФКБ був достовірно підвищеним в мозку риб *Rutilus rutilus* (58 %), *Neogobius fluviatilis* (83 %) із забруднених районів, відносно груп цих же видів, які були виловлені на чистій ділянці річки Ворскла, (Фіг. 1).

Підвищення вмісту ГФКБ супроводжувалось появою поліпептидних фрагментів ГФКБ з меншою молекулярною масою. Деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ було виявлено більше у придонному виді риб *Neogobius fluviatilis* в порівнянні з *Rutilus rutilus* (Фіг. 2).

Приклад 2.

Досліджували ефект підвищеної концентрації іонів Al^{3+} на вміст і поліпептидний склад ГФКБ в мозку карася (*Carasius*). Концентрацію іонів Al^{3+} підтримували в акваріумі додаванням $AlCl_3$ (10 мг/л) впродовж 28 днів. Хронічна дія іонів алюмінію індукувала появу деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ в межах молекулярних мас від 38 до 47 кДа. Іона алюмінію індукували також збільшення вмісту ГФКБ в 1,87 разу порівняно з контролем (Фіг. 3).

Підвищення вмісту ГФКБ супроводжувалось також появою фрагментів ГФКБ з меншою молекулярною масою (Фіг. 4).

Приклад 3.

Досліджували ефект підвищеної концентрації іонів Pb^{2+} на вміст і поліпептидами склад ГФКБ в мозку карася (*Carasius*). Концентрацію іонів Pb^{2+} підтримували в акваріумі додаванням ацетату свинцю (10 мг/л) впродовж 28 днів. Хронічна дія іонів свинцю індукувала появу деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ в діапазоні і молекулярними масами від 38 до 47 кДа і збільшення вмісту ГФКБ в 2,15 разу порівняно з контролем (Фіг. 5).

Результати визначення поліпептидного складу ГФКБ в мозку риб, яких утримували в акваріумі з постійною концентрацією ацетату свинцю, показали значне зростання кількості деградованих поліпептидів ГФКБ (Фіг. 6).

Оцінка стану популяцій риб базується на визначенні змін молекулярних процесів, що відбуваються в астроглії у відповідь на зміни довкілля. Виявлення вмісту і складу цитоскелетного маркера астроцитів риб - гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ), є чутливим і достовірним показником, що характеризує міру патогенетичних порушень нервової системи на клітинному рівні, чим більш ушкоджуюча дія іонів металів, тим більш інтенсивна астрогліальна реактивна відповідь і зміни експресії ГФКБ.

Вперше зміни вмісту і складу гліального фібрилярного кислого білка в мозку риб не використовувались для характеристики стану популяцій в умовах забруднення водного середовища іонами металів. Запропоноване рішення задачі дає можливість використовувати ГФКБ у якості чутливого і достовірного біомаркера стану популяцій риб в умовах забруднення водного середовища іонами металів на різних стадіях інтоксикації.

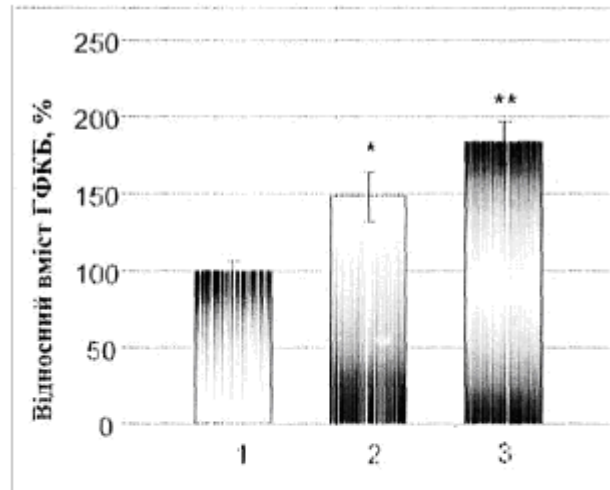
Джерела інформації:

1. Савваитова К.А. Аномалии в строении рыб как показатели состояния природной среды / К.А. Савваитова, Ю.В. Чеботарева, М.Ю. Пічугін, С.В. Максимов // Вопросы ихтиологии. - 1995 - Т. 45 № 2. - С. 182-188.

2. Lin Sun P. Morphological Deformities as Biomarkers in Fish from Contaminated Rivers in Taiwan / P. Lin Sun, William E. Hawkins, Robin M. Overstreet, Nancy J. Brown-Peterson // Int. J. Environ. Res. Public Health. - 2009. - V. 6, P. 2307-2331.

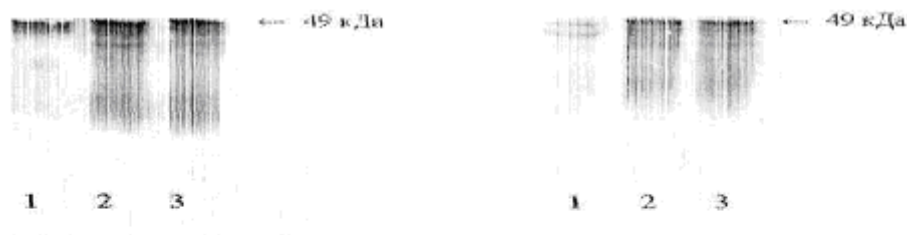
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення стану популяцій риб в умовах забруднення середовища іонами металів, що включає відбір і проведення аналізу біологічного матеріалу, який **відрізняється** тим, що попередньо одержують контрольні проби цитоскелетних білків головного мозку риб з умовно чистих водойм, які екстрагують з біологічного матеріалу за допомогою 4-и кратного об'єму трис-буфера, що додатково містить 4М сечовину, ті ж самі проби цитоскелетних білків одержують з головного мозку риб, що мешкають у забруднених іонами металів водоймах - експериментальні проби, проводять імунохімічний аналіз проб для визначення вмісту водонерозчинної (цитоскелетної) форми гліального фібрилярного кислого білка з молекулярною масою 49 кДа і його поліпептидних фрагментів з молекулярними масами від 37 до 49 кДа та виконують порівняльний аналіз за відмінностями інтенсивності забарвлення відповідних поліпептидних зон між контрольними і експериментальними пробами.



Фіг. 1

Відносний вміст ГФКБ в мозку плітки звичайної (2) і бичка-пісочника (3) із забруднених ділянок р. Самара Дніпровська в порівнянні з р. Ворскла (колонка 1 прийнята за 100 %)



Фіг. 2

Імуноблотинг ГФКБ фракцій цитоскелетних білків з мозку бичка-пісочника (А) і плітки звичайної (Б). 1 - незабруднена ділянка іхтіологічного заповідника; 2, 3 - забруднені ділянки р. Самари Дніпровської.

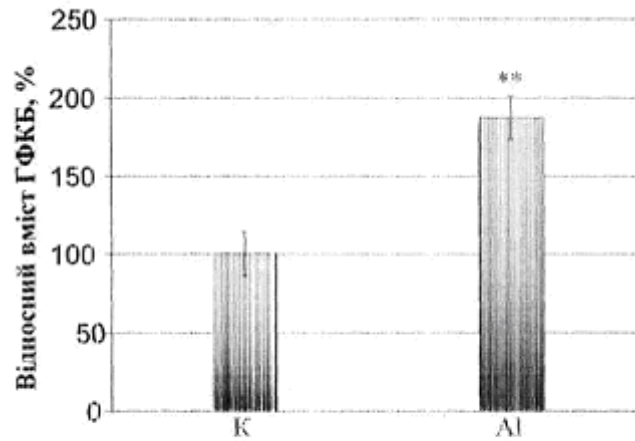


Fig. 3

Відносний вміст ГФКБ в мозку карася контрольної групи (K) та при дії іонів Al^{3+} (Al).



Fig. 4

Імуноблотинг ГФКБ фракцій цитоскелетних білків з мозку карася контрольної групи (K) і при дії іонів Al^{3+} (Al).

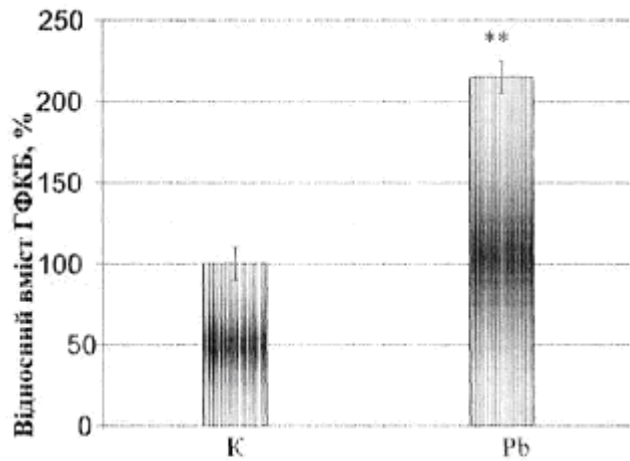


Fig. 5

Відносний вміст ГФКБ в мозку карася контрольної групи (K) і при дії іонів свинцю (Pb).

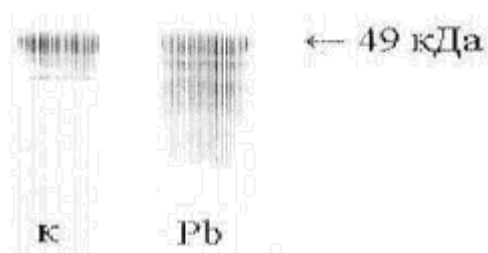


Fig. 6

Імуноблотинг ГФКБ фракцій
цитоскелетних білків з мозку карася
контрольної групи (к) і при дії іонів
свинцю (Рb).

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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