

Винахід відноситься до області екології навколишнього середовища, а саме до методів біотестування водних середовищ і може бути використаний для визначення різних компонентів-забруднювачів, рівня токсичності водного середовища на клітинному рівні.

Використання клітинних біомаркерів самих по собі або ж у сполученні з традиційними методами на організмовому рівні вкрай необхідно на сучасному 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.

Мікроядра являють собою невеликі округлі внеядерні тельця, що формуються при конденсації ацентричних хромосомних фрагментів або цілих хромосом, не включених в основне ядро по завершенню клітинного розподілу. Утворення мікроядер може бути обумовлено порушеннями різних клітинних механізмів. Так, мікроядра, що несуть хромосомні фрагменти, виникають після прямих розривів нитки ДНК, реплікації на ушкодженій ДНК-основі, репресії синтезу ДНК (кластогенні ушкодження). Мікроядра, що включають цілі хромосоми, утворюються внаслідок порушень веретена розподілу, кинетохора або інших частин мітотичного апарата (анеугені ушкодження). Отже, підвищена частота клітин із мікроядрами є біомаркером цитогенотоксичних ефектів, що можуть виникнути унаслідок впливу кластогенних або анеугених агентів (аналог) [Al-Sabti K. and Metcalfe CD. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135] (1).

Відомий спосіб оцінки (діагностики) якості водних зразків із використанням клітинних біомаркерів - мікроядерного тесту для визначення генотоксичності [Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Варгунова Н.И., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. - Томск: Изд-во Томск. Ун-та, 1991. - 272с.] (2).

Мікроядерний тест (2) об'єктивно характеризує частоту хромосомних порушень у ході мітотичного процесу (розриви хромосом, відставання окремих хромосом при розподілі клітин), тобто мікроядерний тест фіксує структурні порушення генома клітини. Основний показник тесту - частота виникнення клітин із мікроядрами (мЯ). Іншим показником є частота виникнення клітин із подвійними ядрами (2Я), що вказує на порушення утворення дочірніх клітин з материнської.

Відомий також спосіб оцінки (діагностики) якості водних зразків із використанням ядерцевого біомаркера для визначення цитотоксичності (прототип) [Архипчук В.В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании// Цитология и генетика. -1995.-т. 29, N 3-с.6-12] (3).

Сутність способу полягає в тому, що для визначення токсичності використовується ядерцевий біомаркер, який оцінює ядерцеву активність клітин, тобто характеризує функціональні зміни їх геномної активності. Ядерця являють собою комплекс функціонуючих рибосомних генів і їх продуктів, що обумовлює їх високу сприйнятливості до зовнішніх впливів. Найбільш інформативними показниками, що застосовуються для оцінки впливу різних факторів на геном клітин рослин і тварин, є: розмір поодиноких ядерців і відсоток гетероморфних парних ядерців (ГПЯ) - для клітин з малою кількістю ядерців, і число ядерців - для багатоядерцевих клітин.

Винахід направлено на розробку способу діагностики якості водного середовища за допомогою біотестування, що має порівняно низьку собівартість і технічну простоту, з одної сторони, і інформативність щодо комплексної оцінки зразка, з іншої сторони, підвищення чутливості способу.

Для вирішення поставленої задачі запропонований спосіб визначення цитотоксичності водного середовища, що включає використання для тестування тваринного тест організму, його експозицію в досліджуваному водному середовищі протягом 30-180 хвилин, а також послідовний цитогенетичний аналіз клітин цього організму за кількісними характеристиками порушень в морфології ядер і ядерців; на основі порівняльних узагальнених даних дослідних і контрольних варіантів отримують оцінку цитотоксичності водного середовища.

Сутність способу полягає в наступному. Для оцінки якості водних зразків досліджують вплив токсичності на тваринні тест організми, представником яких була прісноводна безхребетна гідра *Hydra attenuata*. Після витримування гідр в аналізованому середовищі протягом 30-90хв., тварин фіксують в спирт-оцтовій суміші. Проби тварин фіксують принаймні двічі, наприклад, через 30 і 180хв. експозиції гідр в досліджуваному середовищі. Потім готують повітряно-сухі цитологічні препарати, пофарбовані 50% водним розчином азотнокислого срібла.

Аналіз препаратів виконується при максимальному збільшенні світлового мікроскопа (під імерсійним об'єктивом 100^x). Результати порівнюють в дослідних і контрольних варіантах. Як контроль використовують артезіанську воду, що є також розчинником у дослідних варіантах. При цьому гідри, що витримуються в контролі, також фіксуються двічі в тому ж часовому інтервалі, що й у досліді.

В ході експериментальних дослідів, де проводився аналіз токсичного впливу на тваринний організм та його клітини, крім змін кількісних характеристик ядер і ядерців (число і розмір), були вперше виявлені їх специфічні морфологічні порушення.

Зокрема, для ядер виявлене їх повне (тип «цілком зруйноване ядро») або часткове (тип «частково зруйноване ядро») руйнування, деструктуризація. На цитологічних препаратах у випадку змін типу «цілком зруйноване ядро» спостерігається тільки «голе» ядерце, без будь-яких структурних компонентів ядра. Для порушень типу «частково зруйноване ядро» характерне неповне руйнування, деструктуризація ядра, у цьому випадку навколо ядерця зберігаються фрагменти ядерного матеріалу.

Для ядерців уперше виявлено 4 типи порушень їхньої морфології, організації: 1) тип «супутники», коли на препараті спостерігають основне ядерце з декількома супутниками, уламками цього або іншого ядерця; 2) тип "намісто", коли під мікроскопом не виявляється основне ядерце, а тільки уламки, фрагменти ядерцевого матеріалу; 3) тип "рихлі", у цьому випадку ядерце не має цілісної структури, відбувається внутрішнє порушення його організації; 4) тип "вакуоль" визначається, якщо ядерце має усередині світлу пляму - вакуоль.

Обґрунтування того факту, що виявлені типи ядерно-ядерцевих порушень відбивають реальні зміни в

структурі клітинних компонентів, а не є артефактами експерименту, було проведено в декількох серіях експериментів.

Приклади реалізації способу.

Приклад 1

В якості тест організмів використовували прісноводних безхребетних тварин - гідр *Hydra attenuata*.

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 біотеста використовували ємності у відповідності із нормами біотестування.

Частину гідр витримували в артезіанській воді протягом 90 хвилин (контроль негативний), другу частину в аналізованому середовищі, розчині $Al(OH)_3$ із концентрацією іонів Al^{3+} 2мг/л (дослідний розчин), також протягом 90 хвилин. Потім тварин фіксували в спирт-оцтовій суміші. Проби тварин фіксували двічі, через 30 і 90 хв. експозиції. Для мікроскопічного аналізу готували повітряно-сухі цитологічні препарати, пофарбовані 50% водним розчином азотнокислого срібла. Аналіз препаратів проводили при максимальному збільшенні світлового мікроскопа (під імерсійним об'єктивом 100^x). Отримані результати порівнювали в дослідних і контрольних варіантах. Результати такого тестування приведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Зміна морфології ядер і ядерців
у клітинах гідр, що витримувались в артезіанській
воді і в одному розчині іонів Al^{3+} (концентрація 2мг/л)

Тип ядерно-ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин іонів Al^{3+}	
	0хв.	90хв.	30хв.	90хв.
Цілком зруйноване ядро	3,3	0,9	9,6	33,7
Частково зруйноване ядро	4,4	1,8	21,8	10,0
«Супутники»	2,4	3,9	4,1	7,4
«Намисто»	0,5	1,7	0	2,0
«Рихлі»	2,9	2,8	11,3	1,9
«Вакуоль»	4,2	2,5	1,2	4,7
Сумарні порушення морфології ядер (% від числа досліджених клітин)	7,7	2,7	31,4	43,6
Сумарні порушення морфології ядерців (% від числа досліджених клітин)	10,0	10,9	16,6	16,1

Очевидно, що вплив іонів алюмінію на клітини тварини насамперед призводить до значного росту зруйнованих ядер: спочатку експозиції за рахунок частково зруйнованих, а наприкінці експерименту - цілком зруйнованих ядер. Також незначно збільшується частка клітин із морфологічно зміненими ядерцями: на 5,2-5,7%.

Приклад 2.

В якості об'єкта досліджень був використаний розчин лікарського препарату - аспірину, із концентрацією, яка викликає летальний ефект (LC_{50}) протягом 96 годин на організмовому рівні. Визначені в серії експериментів дані щодо LC_{50} концентрації для гідр склали 4,2мг/мл для водного розчину аспірину (ацетилсаліцилової кислоти). Частину гідр культивували в артезіанській воді протягом 90хв. (контроль негативний), іншу частину - у водному розчині лікарського препарату, в концентрації 4,2мг/мл (дослідний розчин), також протягом 90хв.

Якість водного зразка визначалась аналогічною технологією, викладеною в прикладі 1.

Результати цього тестування приведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Зміна морфології ядер і ядерців у клітках гідр, що
витримувались в артезіанській воді і у водному розчині
аспірину (ацетилсаліцилової кислоти) в концентрації 4,2мг/мл

Тип ядерно-ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин ацетилсаліцилової кислоти	
	0хв.	90хв.	30хв.	90хв.
Цілком зруйноване ядро	0	0	0	0
Частково зруйноване ядро	0	0	0,3	0
«Супутники»	6,6	4,2	1,0	6,6
«Намисто»	0	0,6	0	6,6
«Рихлі»	1,0	1,0	7,2	14,4
«Вакуоль»	2,5	0,8	2,6	3,9
Сумарні порушення морфології ядер (% від числа досліджених клітин)	0	0	0,3	0
Сумарні порушення морфології ядерців (% від числа досліджених клітин)	10,1	6,6	10,8	31,5

Короткочасний вплив розчину ацетилсаліцилової кислоти в концентрації токсичної для тваринного організму (після 96 годинної експозиції) приводить на клітинному рівні (після 1,5 годинної експозиції) до істотного збільшення частки клітин з різними порушеннями в морфології ядерців: з 6,6-10,1% до 31,5%. Як у контролі, так і в досліді не знайдено клітин із порушеннями в структурі ядер.

Приклад 3.

Дослідження проводилось подібно із технологією, описаною в прикладі 2. Тільки в якості об'єкта дослідження був використаний розчин лікарського препарату - анальгін (або метамізолу натрію). Частину гідр культивували в артезіанській воді протягом 90хв. (контроль негативний), іншу частину - у водному розчині лікарського препарату, в концентрації 1,4мг/мл (дослідний розчин), також протягом 90хв.

Результати дослідів наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Зміна морфології ядер і ядерць у клітках гідр, що витримувались з артезіанській воді і у водному розчині анальгін (метамізолу натрію) в концентрації 1,4мг/мл

Тип ядерно-ядерцевих порушень	Контроль негативний		Розчин метамізолу натрію	
	0хв.	90хв.	30хв.	90хв.
Цілком зруйноване ядро	0	0	10,7	17,2
Частково зруйноване ядро	0,2	0	5,8	12,6
«Супутники»	0,8	0,8	0,4	6,7
«Намисто»	0,8	1,0	0,1	0,9
«Рихлі»	9,3	7,9	19,7	34,5
«Вакуоль»	4,9	6,6	1,5	ІД
Сумарні порушення морфології ядер (% від числа досліджених клітин)	0,2	0	16,5	29,8
Сумарні порушення морфології ядерць (% від числа досліджених клітин)	15,7	16,3	21,6	43,2

Протягом 30-90 хвилинної експозиції розчин анальгін істотно збільшив частку клітин як з порушеннями в морфології ядерць (з 15,7-16,3% до 21,6-43,2%), так і з порушеннями в структурі ядер (з 0-0,2% до 16,5-29,8%). Таким чином, токсичний для тваринного тест-організму після 4 добові культивування розчин даної 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 у тваринного тест-організму з використанням нового набору ядерно-ядерцевих морфологічних порушень, є необхідного і достатньою для досягнення забезпеченого винаходом технічного результату - розробки нового методу для тестування токсичності водних зразків, що має порівняно низьку собівартість і технічну простоту, з одної сторони, і інформативність, комплексну оцінку негативного впливу, з іншої сторони, підвищення чутливості способу.