

ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ВОДНИХ ЗРАЗКІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ РИБ

Проблема забруднення водного середовища набуває все більшої гостроти у більшості країн світу включно з Україною. Зміни екологічних чинників, викликані зростаючим антропогенним впливом, призводять до загрозливої ситуації щодо виживання живих організмів і здоров'я людини. Тому в комплексі заходів, спрямованих на запобігання негативним впливам на здоров'я, пов'язаних із чинниками водного середовища, важливе місце повинна займати оцінка якості води, зокрема її безпечність для людини [1].

Нітрати характеризуються досить широким спектром токсичної дії. Токсична дія нітратів полягає у тому, що в травному тракті вони частково відновлюються до нітритів (більш токсичних), і останні при надходженні в кров можуть викликати метгемоглобінемію, захворювання на метгемоглобінемію (MtHb). Під впливом деяких видів шлункових мікроорганізмів нітрати відновлюються до нітритів, які блокують утворення гемоглобіну тим, що, відновлюючись, переводять залізо з двовалентного в тривалентне [2], а також пригнічення активності ферментних систем, що беруть участь у процесах тканинного дихання. Крім того, встановлено, що з нітритів у присутності амінів можуть утворюватись N-нітрозаміни, які виявляють канцерогенну активність. Джерелами нітратів в довкіллі є: природним шляхом, при окисленні органічних сполук; азотні добрива і перегній; великі сільськогосподарські комплекси; міські звалища, транспорт і промисловість. Джерелами попадання нітратів в організм людини є: овочі, фрукти та вода (особливо у системах забезпечення населення водою із відкритих водойм, річок). Що ж до кип'ятіння забрудненої нітратами води, то воно не зменшує, а навпаки, збільшує її токсичність. Забруднена нітратами вода навіть в смертельних дозах – чиста, прозора, без запаху і видимих домішок, звичайна за смаком. Найбільший вміст нітратів, що часто в десятки разів перевищує допустиму норму в питній воді сільської місцевості. Активне використання в сільському господарстві мінеральних добрив призводить до підвищення вмісту нітратів у ґрунтах, водах і рослинах.

У зв'язку з цим розробка ефективних методів оцінки як прямого, так і опосередкованого впливу техногенних та інших забруднювачів на живі організми стає все більш актуальною. Антропогенні зміни водних екосистем не можуть не відобразитись на фізіологічному стані гідробіонтів, зокрема риб.

Використання цито- та генотоксичних способів оцінки якості водного середовища за допомогою тест-організмів риб є короткостроковим, одночасно технічно простим, універсальним та важливим біотестом для виявлення токсичних факторів і речовин, забруднюючих оточуючих середовище, зокрема для оцінки якості природних і питних вод [3]. Поширеність тестів з рибами пов'язана з одного боку зручністю їх утримання в лабораторних умовах та тим, що тест-організм перебуває безпосередньо в досліджувальній розчині, а також риби реагують на токсичний вплив подібно до ссавців [4, 5].

Для визначення токсичності води використовували організм риб та їх клітини, а саме, досліджували периферичну кров, які були в контрольній воді та у забрудненій нітратами воді.

Аналіз мікроядер, як метод дослідження генотоксичності та біомаркер генотоксичного ризику для людини, останнім часом набуває все більшої популярності. В порівнянні з тестом на хромосомні аберації, підрахунок мікроядер є більш простим але не менш важливим методом, займає менше часу, тобто, мікроядерний тест в силу своєї простоти та можливостей швидкого аналізу стає методом скринінгу хімічних з'єднань на генотоксичність. Ще однією перевагою цього методу є те, що він дозволяє проводити оцінку рівня хромосомних порушень по аналізу інтерфазного ядра, тобто не вимагає наявності клітин у мітозі, на відміну від тесту на індукцію хромосомних аберацій [3, 6, 7].

За допомогою хімічного аналізу води, повітря й ґрунту практично неможливо визначити повний спектр забруднювачів й, тим більше, визначити їх сумарний біологічний вплив [8, 9]. Тому все більшого значення набуває не аналітичний, а інтегративний підхід при оцінці антропо-

генних забруднень. Вивчення змін у живих організмах дозволяє оцінити сукупну дію всіх факторів у конкретному біоценозі і їх можливий вплив на людину. У ролі тест-систем бажано використати види з високою чисельністю й швидкістю розмноження, переважно еврібіонтні, щоб можна було порівнювати результати, отримані в різних дослідженнях. Із цього погляду деякі види риб виглядають надзвичайно перспективно й мають ряд переваг, наприклад:

- риб відрізняє висока швидкість розмноження, що дозволяє відбирати масовий матеріал. Їх відносно легко враховувати й відловлювати;
- спосіб життя риб ідеально підходить для моніторингу водних забруднень;
- у порівнянні із ссавцями й птахами, риби є зручним об'єктом для гістологічних, гематологічних і цитогенетичних досліджень.

Проведений вище на прикладі, огляд літератури дозволяє зробити висновки, щодо перспективності використання аналізу клітинного складу білої крові риб та мікроядерного тесту в оцінці токсичної дії різноманітних хімічних сполук. Комплексне дослідження вказаних гематологічних показників структурно-морфологічних порушень ядра дозволить з одного боку, оцінити вплив водної проби на загальний фізіологічний стан тест-організмів (риб), а з іншого отримати інформацію про можливі генотоксичні властивості даної проби.

Таким чином, дослідження цитоморфологічних параметрів клітин крові дозволить одержати інформацію про стан імунітету особини, рівня її впливу стресових чинників й стабільності геному (по частоті мікроядер та ядерних аномалій в еритроцитах), що в сукупності з іншими параметрами, одержуваними при популяційних дослідженнях (генотип, особливості морфології) може дати відомості, надзвичайно корисні у практичному й у теоретичному відношенні.

Матеріали і методи

Для оцінки цитотоксичності водних зразків досліджують вплив токсичних речовин на тест-організм (рибу), а саме на її клітини крові лейкоцитів. У визначенні цитотоксичності водного середовища, як біомаркер використовують формені елементи крові риб, визначають кількість формених елементів (лейкоцитів), та за їх співвідношенням в контрольному і дослідному зразках здійснюють оцінку цитотоксичності водного середовища [4].

В експерименті використовували водний зразок, який містив нітрати 45 мг/л. (ГСанПиН 2.2.4-171-10), також другий зразок води очищеної від нітратів. Дослідження впливу нітратів проводили на рибках виду *Danio rerio* (L.). Риби втримувались в акваріумах з постійною температурою (20 ± 2 °C) і аерацією. У досліджуваних риб, що вижили, відбирали кров із хвостової вени, робили мазки, висушували та фіксували 96 % етиловим спиртом 30 хв, фарбували протягом 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 (2Я), а саме величина відхилення від контролю була використана для оцінки генотоксичності води. Кількість клітин, проаналізованих для кожної риби, складала 3000. Статистична обробка проводилася стандартними методами, токсичний ефект вважається дійсним при статистично достовірній різниці із контролем [10]. Для визначення формули крові в різних ділянках мазка підраховували 250 клітин, ідентифікуючи їх за класифікацією, запропонованою Н.Т. Івановою [11], а потім вираховували відсоток кожного типу клітин. Також визначили цитотоксичності та специфічності формули крові у риб як біомаркер [4, 12].

Результати та обговорення

Досліджені зразки вод, отриманих після очистки від нітратів з використанням цитогенетичних підходів, з'ясовано принцип їх впливу на тест-організм (риби) та на їх клітини крові – структурні і функціональні зміни генома (генота цитотоксичність). А саме, було показано зміни у лейкоцитарної формули крові риб Даніо ре-ріо та генетичні зміни за мікроядерним тестом на клітинах крові – еритроцитів. Використання цих методів дає можливість визначення цитотоксичності та генотоксичності водного зразка на клітинному рівні.

Результати дослідження впливу зразків вод до і після очистки від нітратів на еритроцити крові та результати дослідження лейкоцитарної крові риб відображено в таблицях 1 і 2.

Зразок води до очищення від нітратів негативно впливає на організм риби та її клітини. Спостерігалася у лейкоцитарної формули кро-

Таблиця 1

Зміна складу формених елементів крові *Danio rerio* (L.), після експозиції (96 годин) у досліджуваних зразках води до і після очистки від нітратів

	Лімфоцити		Сегментоядерні нейтрофіли		Моноцити		Паличкоядерні нейтрофіли		Базофіли		Еозинофіли		Σ клітин
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Контроль	219	86,7	10	4	13	5,2	4	1,6	2	0,8	2	0,8	250
До очистки	171	68,4	23	9,2	14	5,6	6	2,4	19	7,6	17	6,8	250
Після очистки	213	85,2	10	4	13	5,2	4	1,6	6	2,4	4	1,6	250

Таблиця 2

Генотоксичний вплив досліджуваних вод до і після очистки від нітратів на клітини крові *Danio rerio* (L.)

	мЯ	2N	всього кл-к	мЯ, ‰	2N, ‰
Контроль	0	0	3000	0	0
До очистки	3	3	3000	1	1
Після очистки	0	0	3000	0	0

ві зменшення лімфоцитів за рахунок підвищення кількості лейкоцитів. Виявили аномалії ядер в еритроцитах, зустрічались мікроядра та подвійні ядра в крові досліджуваних риб. Спостерігали порушення процесів життєдіяльності у хребетних тварин (риби), відбувалася 30 % загибель тест-організмів. На клітинному рівні спостерігались морфофункціональні зміни клітин крові та відхилення у лейкоцитарній формулі крові риб. Також часто спостерігались поліморфноядерні клітини. Отримані дані в зразках води після очистки від нітратів були на рівні контролю.

За частоти еритроцитів з подвійними ядрами і мікроядрами в периферичній крові риб *Danio rerio* (L.), генотоксичний ефект проявила вода до очистки від нітратів. У пробі після очистки від нітратів генотоксичний ефект не спостерігався у порівнянні з даними контрольної води.

Висновки

Для визначення токсичності водного зразка до і після очистки води від нітратів запропоновано використання лейкоцитарної формули крові риб як біомаркера. Визначення набору формених елементів крові: паличкоядерні нейтрофіли, сегментоядерні нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, лімфоцити у досліджуваних риб, які перебували у контрольних та токсичних (до очистки від нітратів) водних зразках, дозволяє одержати більш повну картину впливу нітратів на тест-організм, на клітинному рівні. Це, в свою чергу, підвищує чутливість й інформативність методу, щодо оцінки цитотоксичності водного середовища.

При токсичних впливах нітратів на організм риб відбуваються порушення структурної цілісності ядра еритроцитів. Відмічено, що ступінь вираженості даних змін залежить від токсичного впливу нітратів. Показано перспективність використання даного методу для вивчення генотоксичних властивостей проб води.

Отже, у результаті проведених досліджень було встановлено, що клітинні біомаркери визначення формули крові та мікроядерний тест, додатково до стандартизованих методів, можуть бути використані для об'єктивної та всебічної оцінки токсичності забруднюючих речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Левич А.П. Теоретические и методические основы технологии регионального контроля природной среды по данным экологического мониторинга. – М.: НИИ-Природа, 2004. – 271 с.
2. Патики В.П., Макаренко Н.А., Моклячук Л.І. та ін. Агроекологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів: Монографія / За ред. В.П. Патики. – К.: Основа, 2005. – 300 с.
3. Верголяс М.Р., Кучеренко Т.В., Архипчук В.В. Сравнительный анализ частоты проявления клеток с микроядрами и двойными ядрами у карася *Carassius auratus* в природных и лабораторных условиях // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць. – К.: Логос, 2007. – 1 – С. 203–206.
4. Гончарук В.В., Верголяс М.Р. Спосіб визначення цитотоксичності водного середовища. Патент України № 20001532 від 06.02.2008 р. Бюл. № 6.
5. Norppa H., Falck G.C. What do human micronuclei contain? // *Mutagenesis*. – 2003. – 18, N 3. – P. 221–233.
6. Верголяс М.Р., Гончарук В.В. Використання цитологічних біомаркерів на рибах для оцінки антропогенного забруднення морських і прісних вод // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – 2008. – 4. – С. 60–63.
7. Гончарук В.В., Верголяс М.Р., Болтіна І.В. Спосіб визначення генотоксичності водного середовища. Патент України № 201004569 від 19.04.2010 р. Бюл. № 3.
8. Arkhipchuk V.V., Garanko N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2005. – 112. – P. 215–221.
9. Hayashi M., Ueda T., Uyeno K., Wada K., Kinae N., Saotome K. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms // *Mutat. Res.* – 1998. – N 399. – P. 125–133.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
11. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 184 с.
12. Верголяс М.Р., Безруков В.Ф., Манило Л.Г. Цитологічна характеристика периферичної крові дев'яти видів риби // Сучасні проблеми біології, екології та хімії. Запоріжжя. – 2007. – № 2 – С. 217–220.

VERGOLIAS M.R.

A.V. Dumanski Institute of Colloid Chemistry and Chemistry Water of the National Academy of Sciences of Ukraine,

Ukraine, 03680, Kyiv, Vernadsky blvd., 42, e-mail: vergolyas@meta.ua

DETERMINATION OF TOXICITY OF WATER SAMPLES USING FISH HAEMATOLOGIC PARAMETERS

Aims. Developing effective methods for evaluation due to anthropogenic changes of aquatic ecosystems. **Methods.** Using cyto- and genotoxic methods for evaluating the quality of the water environment using test organisms fish, namely their blood cells. **Results.** The investigated samples of water obtained before and after treatment of nitrate with the use of cytogenetic approaches have been shown changes in blood leukocyte formula fish *Danio rerio* (L.), and genetic changes by micronucleus test of blood cells – red blood cells. **Conclusions.** This method is short term, yet technically simple, versatile and important bioassays. Hematological parameters – definition of blood counts and micronucleus test in addition to the standardized methods can be used for an objective and comprehensive assessment of toxic pollutants.

Keywords: hematological parameter, biotesting, cytotoxicity, water.