

**М.Р. Верголяс, В.В. Гончарук**

## **ОЦЕНКА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВОДЫ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-ОРГАНИЗМОВ И ИХ КЛЕТОК**

Институт коллоидной химии и химии воды  
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев  
vergolyas@meta.ua

*Исследовано использование биотестирования для оценки качества вод разного назначения. Метод заключается в определении действия токсикантов на специально выбранные организмы в стандартных условиях с регистрацией изменений на поведенческих, физиологических, клеточном и субклеточном уровнях. В качестве оптимального набора для определения некоторых структурных и функциональных изменений генома клетки вследствие токсического воздействия предложен микроядерный тест и лейкоцитарная формула крови как биомаркер. Особое внимание уделено оценке риска для здоровья человека тех факторов и веществ, генотоксичность и цитотоксичность которых выявляются с помощью биомаркеров растительных и животных клеток.*

**Ключевые слова:** генотоксичность, лейкоцитарная формула крови, микроядерный тест, питьевая вода, цитотоксичность.

**Введение.** Методические возможности изучения токсичности различных веществ на тест-организмах за последние двадцать лет существенно расширились. Ведется интенсивный поиск наиболее чувствительных тест-объектов и показателей, отрабатываются инструментальные методы анализа, применяются различные способы оценки качества водной среды, изменения параметров физиологических систем и биохимического статуса тест-организмов.

Биотестирование – это биологический контроль, который предполагает целенаправленное использование стандартных тест-организмов и методов для определения степени токсичности водной среды, основанный на измерении тест-реакции организма, его отдельной функции или системы. [1, 2].

Полученные нами данные после проведенных многократных исследований показали, что биотестирование на организменном и клеточном

© М.Р. Верголяс, В.В. Гончарук, 2016

уровнях целесообразно применять для комплексной оценки качества водной среды, критериями которой служат стандартные показатели выживаемости, развития и размножения животных и растительных тест-организмов, а также структурные (по микроядерному тесту) и функциональные (по лейкоцитарной формуле крови) параметры их клеток.

Использование экотоксикологических биотестов (растительных и животных тест-организмов) и их клеточных биомаркеров крайне важно для объективного и комплексного контроля за все увеличивающимся числом ксенобиотиков, загрязняющих водную среду, большинство из которых не нормируются существующими стандартами, однако обладают способностью вызывать разнообразные токсические, цитотоксические, генотоксические или мутагенные эффекты. Универсальность клеточной организации открывает широкие возможности для токсикологических исследований с применением различных групп животных и растений и последующей экстраполяцией полученных результатов на клетки и организм человека [3].

Проблемы биотестирования водных образцов на клеточном уровне достаточно подробно освещены в работах [4,5]. В них описываются исследования, проводящиеся на субклеточном и молекулярном уровнях, где эксперименты трудоемки и дорогостоящи, вследствие чего их широкое применение практически ограничено.

Цель данной работы – определение и обоснование наиболее оптимальных подходов по технической простоте и универсальности к изучению качества водных образцов на организменном и, особенно, клеточном уровнях.

Исследования подобного рода необходимы, так как в окружающей среде общее количество химических соединений достигло  $> 75$  млн. Они имеют ряд преимуществ перед физико-химическим анализом, при помощи которого зачастую не удается обнаружить неустойчивые соединения или количественно определить ультранизкие концентрации экотоксикантов. Биотестирование же дает возможность быстрого получения интегральной оценки токсичности.

В наших исследованиях комплексный подход заключается в том, что разные виды токсичности изучают как на организменном, так и клеточном уровнях. В результате получаем комплексную оценку токсического воздействия. В частности, на уровне организма можно анализировать реакции представителей разных систематических групп и трофических уровней (острая и хроническая токсичность), на уровне клетки – структурные и функциональные изменения генома (гено- и цитотоксичность).

Для анализа влияния токсических веществ в водных образцах на организм и его клетки был отобран следующий набор биотестов: растения – лук, *Allium cepa*, пшеница, *Triticum*, салат, *Lactuca sativa*, огурец, *Cucumis sativus*; беспозвоночные – гидра, *Hydra attenuate*, дафния, *Ceriodaphnia affinis*; эмбрионы рыб, *Danio rerio*; позвоночные животные – рыбы, *Danio rerio*, а также карп, *Cyprinus carpio*; карась, *Carassius auratus gibelio*; шпорцевые лягушки, *Xenopus*.

Набор клеточных критериев включает в себя долю клеток с микроядрами и аномальными ядрами (регистрируют структурные нарушения в наследственном аппарате клетки) и количественные характеристики лейкоцитов в периферической крови (отражают функциональные изменения). В клетках корешка растений определяли митотический индекс (изменения в доле делящихся клеток как показатель цитотоксичности) и количество клеток с двойными ядрами и ядерными нарушениями (показатели генотоксичности) [6,7].

Для сравнения данных, полученных на гидробионтах и растениях, с таковыми на теплокровных животных, а также на человеческой культуре клеток лимфоцитов был проведен ряд экспериментов по выявлению токсикантов в различных типах вод (дехлорированная, водопроводная, фасованная, артезианская).

Крысы являются одними из основных экспериментальных животных в биологических и медицинских исследованиях. Нами были изучены влияние различных типов вод на организмы, отдельные органы и клетки крови лабораторной крысы линии Вистар, а также мутагенная активность при помощи теста на индукцию аберраций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* [8].

Гематологические показатели живых организмов являются индикатором не только физиологического состояния организма, но и одним из основных критериев выявления загрязнения питьевых вод (ДСТУ 7387: 2013).

**Методика эксперимента.** В работе использовали артезианскую, фасованную ("Humana") и водопроводную (дехлорированная) воды. Контрольную воду приготавливали в лабораторных условиях согласно рекомендациям ДСТУ 4174:2003. Для цитогенетической оценки на гематологических показателях использовали периферическую кровь рыбы, лягушки, крысы и культуры клеток человека. С отобранной крови делали мазки, фиксировали 96%-ным раствором этилового спирта, высушивали и окрашивали (25 мин) раствором азур-эозина по Романовскому-Гимза. Анализ цитологических препаратов проводили

под световым микроскопом (общее увеличение  $\times 1000$ ), и определяли количество клеток с микроядрами и двойными ядрами в контрольной и исследуемых группах. Затем сравнивали количества образованных микроядер и двойных ядер. Количество клеток, проанализированных для каждой особи, составляло 3000. Статистическую обработку проводили стандартными методами; токсический эффект считается действительным при статистически достоверной разнице с контролем. Для цитотоксичности в различных участках мазка подсчитывали 250 клеток, идентифицируя их по классификации, затем вычисляли процент каждого типа клеток [6].

**Результаты и их обсуждение.** Проведено биотестирование и цитологический анализ исследуемых проб воды. Цитогенотоксическая оценка различных типов вод (артезианская, фасованная, дехлорированная водопроводная) на клетках крови тест-организмов и культуре клетки лимфоцитов человека показана в таблице.

*Сравнительная оценка исследуемых вод на клетках крови*

Тип клеток		Показатели, %	Образцы исследуемых вод			
			Контроль	Артезианская	Фасованная "Humana"	Водопроводная (дехлорированная)
		Эритроциты	Клетки рыб	мЯ ‰	0	0
2N ‰	0			0	3	4
Клетки лягушек	мЯ ‰		0	0	1,33	3,33
	2N ‰		0	0	2,33	3,66
Клетки крыс	мЯ ‰		0	0	0,66	1,66
	2N ‰		0	0	0,99	2,66
Лимфоциты	Клетки рыб	%	9,50	9,60	28,0	35,20
	Клетки лягушек	%	18,30	18,60	30,0	38,20
	Клетки крыс	%	50,70	50,70	60,40	66,60
	Культура клетки человека	%	40,50	40,80	56,60	60,20

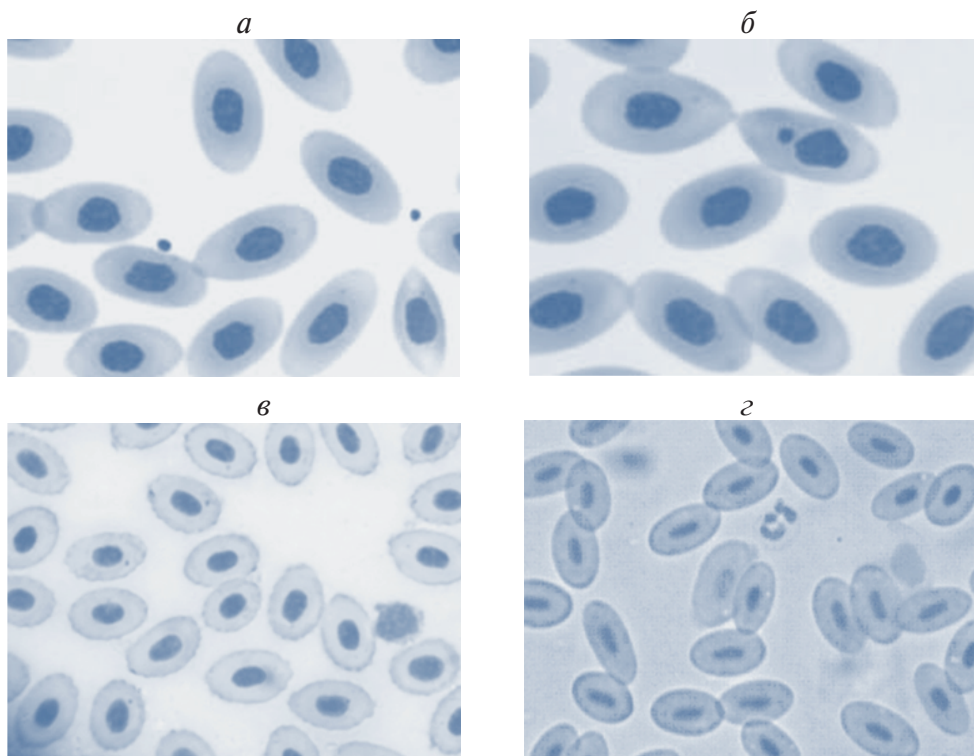
Из полученных данных видно, что по микроядерному тесту и количественной характеристике лимфоцитов рыбы реагируют сходным образом с млекопитающими, в том числе и человеком. Поэтому рыб рекомендуют использовать для скрининга потенциально опасных для человека веществ, вызывающих уродства и раковые заболевания, а также в качестве "стражей" генотоксических веществ, попадающих в питьевую воду. Это подтверждают коэффициенты корреляции между показателями на рыбах и в культуре лимфоцитов периферической крови человека. Полученные значения коэффициентов линейной корреляции свидетельствуют о взаимосвязи почти всех показателей, определяемых на рыбах, и количества поврежденных абберрантных метафаз с метаболической активацией [9].

Образование микроядер, фрагментация хромосом часто возникают в процессе развития онкозаболевания, при вирусной инфекции, бактериальном заражении, а также при воздействии на клетки ионизирующего облучения и различных мутагенов. Стойкая корреляционная связь количества поврежденных абберрантных метафаз с метаболической активацией выявлена между показателями определяемой культуры лимфоцитов периферической крови человека и на луке [9, 10].

Морфологические изменения, которые претерпевают клетки в момент воздействия токсикантов, могут быть выявлены с помощью микроскопии (рис. 1).

Для оценки цитотоксичности водных образцов изучали влияние токсических веществ на тест-организм (рыбу), а именно на клетки крови лейкоцитов. При определении цитотоксичности водной среды в качестве биомаркера использовали форменные элементы крови рыб (лейкоциты), определяли количество последних по их соотношению в контрольном и опытном образцах [6].

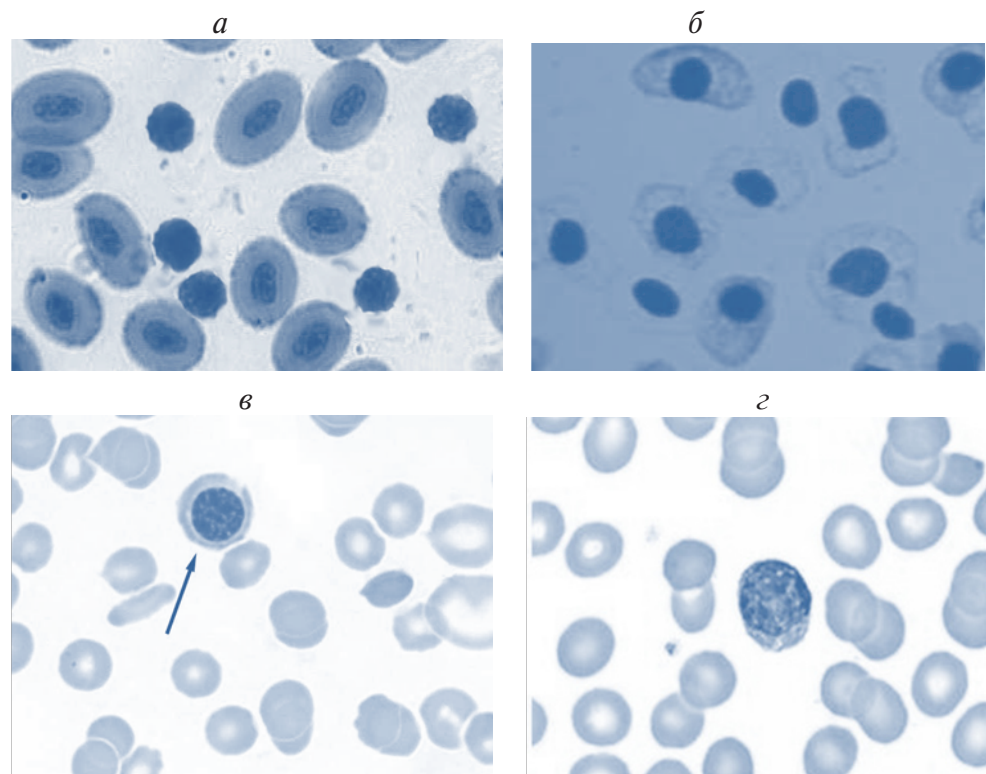
Лейкоциты играют очень важную роль в защите организма от токсических воздействий, бактериальных и грибковых инфекций. Рост количества нейтрофилов в крови – это ответ организма на воздействия токсикантов, бактериальные и многие другие инфекции. Возникновение лимфопении (уменьшение количество лимфоцитов) характерно для начальной стадии инфекционно-токсического процесса и связано с их миграцией из сосудов в ткани к очагам воспаления [11].



*Рис. 1. Образцы цитологических препаратов периферической крови гидробионтов со структурными нарушениями ядер эритроцитов: а – эритроциты крови рыб контрольной группы; б – то же исследуемой группы с микроядром; в – эритроциты крови лягушек контрольной группы; г – то же исследуемой группы с двойным ядром и с сегментированным ядром.*

Воздействия токсикантов на организм сопровождаются с изменениями количественного состава нейтрофилов. С помощью микроскопии определяли цитотоксичность в водной среде (рис. 2).

Количественная оценка лейкоцитов описана как биомаркер клеточного состава организма. Для определения цитотоксичности водных образцов исследовали влияние токсических веществ на периферическую кровь, а именно на лейкоциты крови. В качестве биомаркера использовали форменные элементы крови (лейкоциты) рыб, при этом рассчитывали их количество, и по их соотношению в контрольном и опытном образцах оценивали цитотоксичность водной среды. Этот метод технически прост, быстро выполняем, недорог, легко поддается количественной оценке, информативен [6].



*Рис. 2. Образцы цитологических препаратов периферической крови гидробионтов, крыс и человека для определения цитотоксичности водной среды: а – лимфоциты крови рыб; б – то же лягушки; в – то же крыс; г – то же человека.*

Таким образом, по сравнению с другими тест-объектами рыба является высокоорганизованным видом и стоит выше в экологической нише. Непосредственно из-за обитания ее в воде цикл жизни и химические реакции в организме протекают быстрее, чем у других позвоночных, к которым рыба близка по своим органам и системам (лягушки, крысы, кролики, птицы) [6, 2].

Универсальность клеточной организации рыб открывает широкие возможности для токсикологических исследований с последующей экстраполяцией полученных результатов на клетки и организм человека [12, 13]. В нашей работе для характеристики структурных и количественных изменений важнейших компонентов клеточного ядра (хромосом и генов), являющихся носителями генетической информации, использовали цитогенетический метод – микроядерный тест [6, 13]. До настоящего времени вопрос о том, играет ли формирование

микроядер особую роль в канцерогенезе, остается открытым. В любом случае микроядра указывают на геномную нестабильность [14].

При определении качества питьевых вод методами биотестирования возникает ряд важных вопросов относительно экстраполяции полученных результатов на организм человека, как, например, являются ли данные о токсичности водных проб, полученные с помощью животных и растительных тест-организмов, сигналом опасности и для человека. Перечисленные выше работы дают возможность правильности переноса результатов, полученных на уровне клетки, на более высокие уровни организации.

Наиболее приемлемыми для экстраполяции на организм человека являются методы, оценивающие мутагенность, гено- и цитотоксичность, т.е. (суб)клеточные эффекты. Этот вывод обосновывается результатами нескольких международных программ (Gene-Tox, International Program on Chemical Safety–IPCS), выполненных в 90-х годах. Даже изменения клеточных структур растений, в частности лука, *Allium cepa*, предполагают генотоксические и мутагенные последствия для высших животных, в том числе и человека [15].

В Европейском реестре зарегистрировано свыше 100 000 химических веществ (EINECS). Из них наличие и концентрации только 30 – 40 химических веществ регулярно проверяются в наиболее важных экосистемах европейских стран [16]. Значительная часть веществ не может быть определена в природных и сточных водах вследствие отсутствия соответствующих аналитических методов или высокой стоимости такого анализа.

**Выводы:** Показана перспективность использования гематологических показателей организмов рыб в биотестировании. Кровь – как одна из важнейших систем организма – играет большую роль в его жизнедеятельности. Благодаря широко развитой сети кровеносных капилляров она приходит в соприкосновение с клетками всех тканей и органов, обеспечивая тем самым возможность их дыхания и питания. Находясь в тесном соприкосновении с тканями, кровь обладает всеми реактивными свойствами тканей, ее чувствительность к патологическим раздражениям выше и тоньше, а реактивность – выразительнее и рельефнее. Поэтому всякого рода воздействия на ткани организма отражаются на составе и свойствах крови. Гематологические исследования предсказывают появление первых, неясно выраженных клинических симптомов патологического процесса [6].



В периферической крови животных и человека при нормальных физиологических условиях организма образование форменных элементов и их разрушение находятся в состоянии равновесия. Нарушение взаимоотношений между этими процессами, обусловленное реакцией организма на раздражение токсического или инфекционного характера, проявляется в изменении количественного состава клеток периферической крови.

Перечисленные в нашей работе методы удовлетворяют современным требованиям, предъявляемым к исследованиям качества водных образцов. Они определяют их биологические свойства на (суб)клеточном уровне, регистрируют изменения в наследственном аппарате, объективно характеризуют отдаленные последствия их воздействия. Структурные и количественные изменения клеток и ядер наблюдаются даже при низких концентрациях токсикантов согласно [17].

Биомониторинг природных и питьевых вод — это актуальная задача на современном этапе развития общества, которая проводится научными коллективами во многих странах мира. Химические анализы при определении качества питьевой воды не совсем оправданы, так как химические методы не могут выявить всего набора элементов, присутствующих в водном растворе, оценить их взаимодействие и трансформацию в среде и организме. Биотестирование с использованием оптимальных наборов тест-организмов и их клеточных параметров объективно характеризует биологическую составляющую качества воды.

**Резюме.** Досліджено використання біотестування для оцінки якості вод різного призначення. Метод полягає у визначенні дії токсикантів на спеціально вибрані організми в стандартних умовах з реєстрацією змін на поведінкових, фізіологічних, клітинному і субклітинному рівнях. В якості оптимального набору для визначення деяких структурних і функціональних змін геному клітини внаслідок токсичного впливу запропонований мікроядерний тест і лейкоцитарна формула крові як біомаркер. Особливу увагу приділено оцінці ризику для здоров'я людини тих факторів і речовин, генотоксичність і цитотоксичність яких виявляються за допомогою біомаркерів рослинних і тваринних клітин.

*M.R. Vergolias, V.V. Goncharuk*

## EVALUATION OF WATER QUALITY CONTROL WITH THE TEST ORGANISMS AND THEIR CELLS

### Summary

Investigated the use of bio-testing to assess the quality of water for different purposes. Method is to in determining the action of toxicants on specially selected organisms under standard conditions to the registration of changes in the behavioral, physiological, cellular and subcellular levels. As an optimal set for the determination of some of the structural and functional changes in the genome of the cells as a result of the toxic effects of proposed micronucleus test and WBC blood as a biomarker. Particular attention is paid to assessing the risk to human health of the factors and substances, genotoxicity and cytotoxicity of which are identified by a biomarker of plant and animal cells.

### Список использованной литературы

- [1] *Archipchuk V.V., Goncharuk V.V. // J. Water Chem. and Technol. – 2004. – 26, N 4. – P. 48 – 53.*
- [2] *Пат. 97199 Україна, МПК G 01 № 33/18 / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс. Опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1.*
- [3] *Болтіна І.В., Верголяс М.Р., Повякель Л.І., Злацький І.А., Завальна В.В., Коваленко О.В., Макаров О.О., Засць Є.Р., Семенова А.Ю. // Матеріали ІХ з'їзда укр. тов-ства генетиків селекціонерів ім. М.І. Вавилова (г. Алушта, 24–28 вересня 2012 р.). – К.: ЛОГОС, 2012. – Т.4. – С. 249 – 250.*
- [4] *Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R. et al. // Mutat. Res. – 2000. – P. 111 – 172.*
- [5] *Ravanello S., Clonfero E. // Ibid. – 2000. –P. 285–08.*
- [6] *ДСТУ 7387:2013 ДСТУ 7387:2013. Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби *Danio rerio* (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). – Введ. 2013 г.*
- [7] *Верголяс М. Р., Луценко Т. В., Гончарук В. В. // Цитология и генетика. - 2013. – № 1. – С. 44 – 49.*
- [8] *А.с. 23794 Україна, МПК 01 №1716 / І.В. Болтіна. – Опубл.05.03.2008, Бюл. № 6.*

- [9] *Goncharuk V.V., Vergolias M.R., Boltina I.V. // J. Water Chem. and Technol.* – 2013. – **35**, N 5. – P. 426 – 435.
- [10] *Fiskeşjö G. // Hereditas.* – 1985. – **102**. – P. 99 – 112.
- [11] *Goncharuk V.V., Vergolias M.R.// J. Water Chem. and Technol.* – 2014. – **36**, N 1. – P. 46 – 50.
- [12] *Пат. 201000606 України, МПК G 01 № 33/18 / В.В. Гончарук, І.В. Болтіна, М.Р. Верголяс.* – Опубл. 25.03.2011, Бюл. №6.
- [13] *Пат. 95717 Україна, МПК G 01 № 33/18 / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс, І.В. Болтіна.* – Опубл. 25.08.2011, Бюл. № 16.
- [14] *Inoue A., Yokomori K., Tanabe H. et al. // Int. J. Cancer.* – 1997. – P. 1070 – 1077.
- [15] *Archipchuk V.V., Goncharuk V.V. // J. Water Chem. and Technol.* – 2001. – **23**, N 5. – С. 531 – 544.
- [16] *Postel S. // State of the world 1987.* – New York: W.W. Norton, 1987. – P. 169 – 173.
- [17] *ДСТУ 7527:2014. Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості.* – Введ. 2014 г.

Поступила в редакцію 02.11.2015 г.