



УДК 504.5:620.3:546.56/.57:597.2/.5

ОЦІНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТІ НАНОАКВАЦИТРАТІВ СРІБЛА ТА МІДІ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОЯДЕРНОГО ТЕСТУ НА КЛІТИНАХ КРОВІ РИБ *Danio rerio*

О.О. Кравченко*, аспірант

М.Р. Верголяс**, кандидат біологічних наук

В.І. Максін*, доктор хімічних наук

*Національний університет біоресурсів і природокористування України

**Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України

Проаналізовано вплив наноаквацитратів срібла та міді на клітинному рівні за допомогою мікроядерного тесту на *Danio rerio*. Зроблено висновки щодо доцільності використання цих препаратів у рибництві та акваріумістиці.

Вступ. При застосуванні нових речовин у навколишньому середовищі, гостро стоїть питання щодо їх токсичності.

Наноаквацитрати металів знайшли своє застосування в багатьох галузях сільського господарства, ветеринарії та біології [2]. Одним із перспективних напрямків є використання цих препаратів для лікування антибактеріальних хвороб риб, однак актуальним залишається питання щодо оцінки впливу цих речовин на клітинному рівні.

Фізико-хімічні методи аналізу не здатні в багатьох випадках виявляти нестійкі сполуки або визначати вплив на живі організми малих концентрацій екотоксикантів [5]. Тому останнім часом, завдяки простоті, універсальності та експресності, великої популярності набули методи біотестування.

У той же час більшість методик полягає в реєстрації смертності особин, личи-

нок чи ембріонів [1,6,8]. При цьому велика кількість токсикантів, потрапляючи в навколишнє середовище, особливо у водну екосистему, може не призводити до летальних ефектів, але викликати необротні зміни на клітинному рівні.

Найпопулярніший тест-об'єкт для мікроядерного аналізу серед водних організмів — риби. Мікроядерний тест на них є чутливим методом оцінки генотоксичності і перспективним для виявлення токсичних речовин у воді. Оскільки риби зазвичай реагують на полутанти подібно до вищих хребетних [9], вони можуть бути використані для виявлення сполук, що потенційно викликають канцерогенний ефект. Риби можуть стати "контролем" потенційного генотоксичного впливу шкідливих речовин у питній воді на людину [10].

Утворення мікроядер, фрагментація хромосом часто виникає в пухлинах, за вірусної інфекції, а також при дії на клі-

*Науковий керівник — професор В.І. Максін.

тини іонізуючого опромінення та різних мутагенів [11].

Оцінка токсичності на клітинному рівні дозволить одержати інформацію про стан імунітету біоти та рівень впливу стресових чинників [3–4].

Тому метою роботи було проаналізувати вплив суміші наноаквацитратів міді та срібла на клітинному рівні за допомогою мікроядерного тесту та оцінити перспективи використання препаратів для лікування бактеріальних хвороб риб.

Матеріали і методи дослідження. При дослідженні впливу суміші наноаквацитратів міді та срібла використовували тест-організми *Danio rerio* та клітини їх крові для оцінки генотоксичності.

Експерименти проводили на базі лабораторії біомаркерів та біотестування вод ІКХХВ ім. А.В. Думанського НАН України.

Піддослідні групи *D. rerio* масою 1–2 г та довжиною 35–45 мм утримувалися в розчинах, отриманих додаванням до ставкової та штучної води середньої твердості (до дистильованої води додавали солі натрію, калію, кальцію та магнію) наноаквацитратів суміші срібла і міді з концентрацією 0,01–0,05 мг/дм³. Таке розведення не викликало критичних змін у тест-об'єктів. Умови утримання під час процедури біотестування контрольних і піддослідних груп тест-організмів не відрізнялися за фізико-хімічними параметрами за винятком відсутності або наявності наноаквацитратів. Для кожної концентрації відбирали по 5 особин. Досліди проводили в 3-кратній повторюваності за температури води 20–22°C та рН = 6,5–8.

Дослідження генотоксичності проводилося паралельно з тестами на токсичність, тобто досліджували кров риб, які знаходились у контрольній воді та у воді з додаванням наноаквацитратів.

Препарати клітин периферичної

крові готували за методикою [7].

Аналіз зразків проводили за допомогою мікроскопу Axio Imager A1 фірми Carl Zeiss, обладнаного диференційно-інтерференційним контрастом (ДІК). У роботі використовували 1000-кратне збільшення та фотовідбитки зроблені камерою AxioCam MRm1.

Результати та їх обговорення. Щоби проаналізувати вплив наноаквацитратів на модельні і природні водні екосистеми і оцінити можливість використання їх у прикладних цілях, дослідження проводили у двох напрямках.

У першому випадку контролем слугувала штучна вода середньої твердості, у другому – досліди проводилися на ставковій воді з водойм навчально-науково-виробничої лабораторії рибицтва в смт Немішаєве Київської області.

На рис. 1–6 представлено цитологічні препарати клітин крові риб *D. rerio* в контрольному та експериментальних варіантах.

На рис. 1 можна спостерігати клітини крові риб, які утримувалися в контрольному розчині без додавання наноаквацитратів. Усі еритроцити з нормальним ядром та цитоплазмою. При додаванні 0,01 мг/дм³ наноаквацитратів до контрольного розчину (рис. 2) помічено поодинокі еритроцити крові риб з мікроядрами в місцях позначених стрілкою; цитоплазма є близькою до норми, тобто додавання такої концентрації препарату не викликає стресових змін у риб. При додаванні ж концентрації суміші препарату 0,025 мг/дм³ (рис. 3) спостерігалася велика кількість клітин з мікроядрами. Крім того, в місцях, позначених стрілкою, відбувалося руйнування клітинної оболонки.

У другій серії експериментів контролем виступали зразки, відібрані зі ставків навчально-науково-виробничої лабораторії рибицтва. Хоч ця вода і викорис-

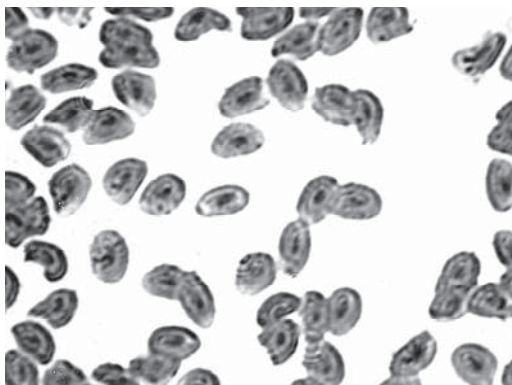


Рис. 1. Еритроцити крові риби, які утримувалися в контрольній штучній воді

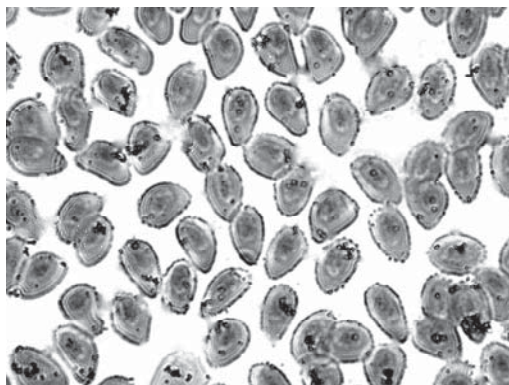


Рис. 2. Еритроцити крові риби, які утримувалися при додаванні до контрольного розчину 0,01 мг/дм³ наноаквацитарів

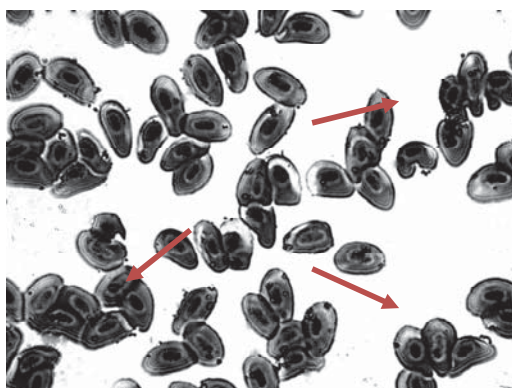


Рис. 3. Еритроцити крові риби, які утримувалися при додаванні до контрольного розчину 0,025 мг/дм³ наноаквацитарів

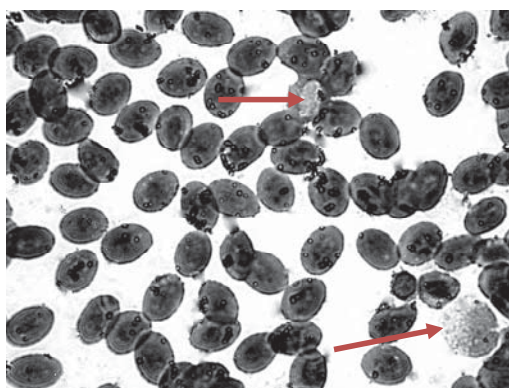


Рис. 4. Еритроцити крові риби, які утримувалися в контрольній ставковій воді

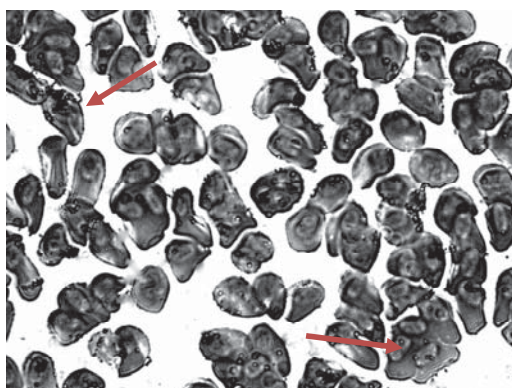


Рис. 5. Еритроцити крові риби, які утримувалися при додаванні до ставкової води 0,01 мг/дм³ наноаквацитарів

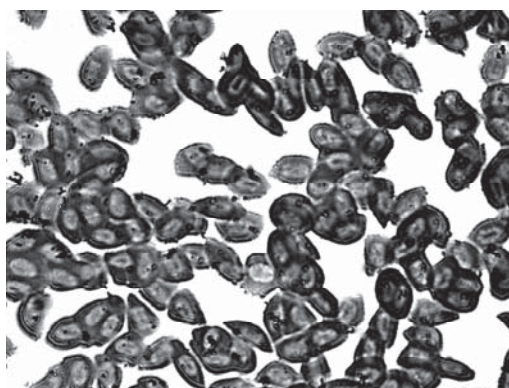


Рис. 5. Еритроцити крові риби, які утримувалися при додаванні до ставкової води 0,05 мг/дм³ наноаквацитарів

товується для культивування риб, при утримуванні тест-об'єктів було помічено значні зміни на клітинному рівні (рис. 4). Зустрічалася значна кількість еритроцитів з мікроядрами та подвійними ядрами, у цитоплазмі клітин збільшились розміри вакуолі та кількість лейкоцитів, що може свідчити про запальні процеси в організмі риб. Зміна цих параметрів у риб, які витримувались у водних зразках з природних водоймищ, говорить про присутність ксенобіотиків у воді.

При дослідженні наноаквацитратів суміші срібла і міді з концентрацією $0,01\text{--}0,05\text{ мг/дм}^3$ (рис. 5–6) спостерігались суттєві зміни цитологічних показників периферичної крові: утворення аномалій ядер, підвищення кількості лейкоцитів у порівнянні з контрольною групою. Тому додавання препаратів наноаквацитратів призводило до посилення запальних процесів та необоротних змін у

клітині, що виявлялося в утворенні конгломератів клітин.

Отже, результати мікроядерного тесту свідчать про його високу чутливість та інформативність і про можливість його сумісного використання зі стандартними тестами. Відзначено, що відповідь на вплив препаратів виявляється на клітинному рівні ще до початку розвитку незворотних процесів деструкції в клітинах.

Висновки

Токсичний ефект наноаквацитратів срібла і міді виявляється в зростанні кількості еритроцитів крові з мікроядрами та порушенні клітинної оболонки.

Невеликі концентрації наноаквацитратів не викликають значних змін у порівнянні з контрольними дослідями на клітинному рівні, що свідчить про можливість використання концентрацій близько $0,01\text{ мг/дм}^3$ наноаквацитратів у рибицтві та акваріумістиці.

Література

1. Балашова С.П., Самонов А.Е., Еремін В.Н. Тяжелые металлы в почвах урбанизированных территорий // Экология и промышленность России. — 2001. — №9. — С. 41–43.
2. Борисевич В.Б., Петренко О.Ф. Нанотехнологія у ветеринарній медицині / За ред. В.Б. Борисевича. — К.: Ліра, 2009. — 232 с.
3. Верголяс М.Р. Гончарук В.В. Використання цитологічних біомаркерів на рибах для оцінки антропогенного забруднення морських і прісних вод // Фактори експериментальної еволюції організмів. Присвячено: 90-річчю від часу заснування Української академії наук. Зб. наукових праць. — 2008. — Т. 4. — С. 60–63.
4. Гаранько Н.М. Аналіз цитогенотоксичної дії водних розчинів органічних та неорганічних речовин за допомогою мікроядерного тесту та ядерцевого біомаркери // Наук. зап. Терноп. держ. пед. ун-ту. Серія біологія: матеріали III з'їзду Гідроекологічного товариства України "Гідроекологія на межі тисячоліть". — 2001. — № 4. — С. 121–122.
5. Губачов О. І. Особливості використання рослин для біотестування ґрунтів з метою визначення рівня екологічної безпеки промислових територій // Наук. вісн. КУЕІТУ. Нові технології. — 2010. — № 3 (29). — С. 164–171.
6. Кіпніс Л.С., Ситник Ю.М., Коновець І.М. Біотестування якості води озер міської зони Києва // Наук. зап. Терноп. держ. пед. ун-ту. — 2001. — 3 (14). — С. 198–200.
7. Патент України № 201004569 МПК (2009) G 01 № 33/18. Спосіб визначення генотоксичності водного середовища / Гончарук В.В., Верголяс М.Р., Болтіна І.В. / 2010.
8. Пескова Т.Ю. Адаптационная изменчивость земноводных в антропогенно загрязненной среде: Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16. — Тольятти, 2004. — 284 с.
9. Al-Sabti K. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water / K. Al-Sabti, C.D. Metcalfe // Mutation Research. — 1995. — 23. — P. 121–135.



10. Cytogenetic analysis of embryos generated from in vitro matured mouse oocytes reveals an increase in micronuclei due to chromosome fragmentation / S.M. Junk, A.R. Murch, A. Dharmarajan, J.L. Yoyich // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2002. – **19**. – P. 67–71.
11. Sari-Minodier I. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay / I. Sari-Minodier, L. Bellon, J. Ompili [et al.] // Mutation Research. – 2007. – **629**, № 2. – P. 111–121.

АННОТАЦІЯ

Кравченко О.А., Верголяс М.Р., Максін В.І. *Оценка генотоксичности наноаквацитратов серебра и меди с помощью микроядерного теста на клетках крови рыб Danio rerio // Биоресурсы и природопользование. – 2013. – 5, № 1–2. – С. 31–35.*

Проаналізовано вплив наноаквацитратів срібла і міді на клітинному рівні з допомогою микроядерного тесту на Danio rerio. Сделаны выводы о целесообразности использования этих препаратов в рыбном хозяйстве и аквариумистике.

SUMMARY

O. Kravchenko, M. Vergolias, V. Maksin. *Evaluation of genotoxicity of silver and copper nanoaquacitrates using micronucleus test on the blood cells of fish Danio rerio // Biological Resources and Nature Management. – 2013. – 5, № 1–2. – P. 31–35.*

The impact of silver and copper nanoaquacitrates at the cellular level by using micronucleus test on Danio rerio has been analyzed. The conclusions about the appropriateness of these substances in the fisheries and aquarian science have been presented.