



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79271** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: а 2011 14504</p> <p>(22) Дата подання заявки: 07.12.2011</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2013</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.09.2012, Бюл.№ 18</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2013, Бюл.№ 8</p>	<p>(72) Винахідник(и): Шевцова Наталія Леонідівна (UA), Гудков Дмитро Ігоревич (UA), Каглян Олександр Євгенович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, пр. Героїв Сталінграда, 12, м. Київ, 04210 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ ЦИТОГЕНЕТИЧНОЇ ОЦІНКИ РАДІАЦІЙНОЇ МУТАГЕННОЇ НЕБЕЗПЕКИ ВОДОЙМ

(57) Реферат:

Спосіб цитогенетичної оцінки радіаційної мутагенної небезпеки водойм за допомогою цитогенетичних показників рослин включає дослідження частоти та спектра хромосомних аберацій клітин кореневих меристем. Дослідження проводиться на референтних видах вищих водяних рослин досліджуваної водойми за кількісними показниками генетичних ушкоджень хромосом. На основі порівняння з контролем узагальнених даних та по збільшенню величини отриманих показників визначають радіаційну мутагенну небезпеку водойми.

UA 79271 U

Корисна модель належить до області екології навколишнього середовища та гідробіології, а саме до методів контролю екологічного стану водойм за допомогою показників генетичної стабільності рослин, і може бути використана для визначення мутагенного ефекту дії хронічного іонізуючого опромінення в низьких дозах на біоту водойм в умовах довготривалого
5 радіонуклідного забруднення.

При визначенні екологічного стану водойм, що зазнали радіоактивного забруднення радіонуклідами техногенного походження, особливої уваги потребує оцінка мутагенного потенціалу водного середовища. Облік цитогенетичних порушень є одним з ефективних методів оцінювання мутагенної небезпеки навколишнього середовища. При хронічному опроміненні
10 біоти, виникають такі ушкодження генетичного апарату, що не елімінуються - вони накопичуються і зберігаються у генофонді протягом багатьох поколінь. Також дія на біоту іонізуючого опромінення в діапазоні низьких доз не має чіткого дозового порогу - при збільшенні дози зростає лише частота прояву цих ефектів. Як відомо, зміни на цитогенетичному рівні здатні впливати на такі важливі для існування біоти параметри як здоров'я та репродуктивна
15 здатність. Тому саме цитогенетичні тест-системи мають використовуватися для ранньої та сталої діагностики мутагенної небезпеки навколишнього середовища.

На відміну від біотестування водного середовища та донних відкладів на мутагенні властивості, проблема цитогенетичної біоіндикації мутагенної небезпеки водойм, забруднених
20 радіонуклідами внаслідок техногенної діяльності, практично не розроблена. Більшість загальноприйнятих рослинних тест-організмів таких як цибуля ріпчаста *Allium cepa* L., салат посівний *Lactuca sativa* L. та представники родів традесканція *Tradescantia*, пшениця *Triticum*, віка *Vicia*, тощо, застосовують для визначення мутагенних властивостей водного середовища чи донних відкладів при експрес-оцінці на певний момент, під час якої рослина культивується у розчині, що тестується, від декількох годин до 7-14 діб (Kihlman B.A. Root-tips for studying the effect of chemicals on chromosomes // Hollaender A. (Ed.) Chemical mutagens.- N.Y. London, Plenum Press, 1971. - V.2. - P. 489-504 (1); Grant W.F. Chromosome aberrations on plants as a monitoring system // Environ.Health Prot. 1978. - V.27. - P. 37-43 (2); Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных веществ Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. - ВОЗ. Женева, 1989.- С. 86-97 (3); Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод. За ред... В.Д. Романенко - НАН України Ін-т гідробіології. - К.: Логос, 2006. - С. 332-339 (4)). Недоліком цих способів є те, що дослідження проводяться на рослинах, що штучно додаються до досліджуваного середовища (вода чи водні розчини донних відкладів) на нетривалий час, що призводить до реєстрації лише тих цитогенетичних пошкоджень, що викликані гострим опроміненням під час тестування. Зазвичай,
35 у природному середовищі до якого потрапили техногенні радіонукліди, біота знаходиться під впливом іонізуючого опромінення місяцями, роками, а цитогенетичні порушення накопичуються. Тому при біотестуванні водойм, що забруднені радіонуклідами, виникає велика розбіжність в оцінці мутагенної небезпеки, що викликана нехтуванням тривалості впливу радіаційного чинника та тривалості існування генетичних пошкоджень.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі по технічній сукупності й ефекту, що досягається, є спосіб оцінки мутагенної небезпеки водного середовища та донних відкладів за допомогою цитогенетичних порушень у кореневих меристемах цибулі ріпчастої *Allium cepa* L. (Н.М. Рашидов, Н.К. Куцоконь Ефекти хронічного опромінення рослин зумовленого радіонуклідами техногенного походження // В кн. Радіобіологічні ефекти опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи. За ред. Д.М. Гродзинського. - К.: Наук. Думка, 2008. - С. 7-135 (5)). За допомогою частоти та спектра хромосомних порушень оцінюються мутагенні властивості радіоактивного розчину. Недоліком є недостатня чутливість цього способу, яка пояснюється тим, що потужність поглиненої дози, яку отримує тест-рослина від води та/чи розчинів донних відкладів протягом часу тестування не відповідає величині, що отримує рослина у водоймі та не враховує кумулятивний ефект накопичення цитогенетичних порушень.
50

Задача корисної моделі - це розробка способу оцінки радіаційної мутагенної небезпеки водойм за допомогою показників цитогенетичної стабільності референтних видів вищих водяних рослин, що має високу чутливість, підвищену якість визначення та інформативність для водойм, де біота зазнає впливу дії хронічного іонізуючого опромінення в низьких дозах.

Поставлена задача вирішується тим, що цитогенетичні дослідження проводяться на референтних видах вищих водяних рослин досліджуваної водойми за кількісними показниками генетичних ушкоджень хромосом, що включає підрахунок клітин з хромосомними аберациями, спектр цих абераций та кількість абераций на одну ушкоджену клітину, і на основі порівняння з контролем узагальнених даних, оброблених за статистичними методами та по збільшенню
55

величини отриманих показників визначається радіаційна мутагенна небезпека досліджуваної водойми.

Для досліджуваної водойми визначають референтні види вищих водяних рослин, цитогенетичні показники яких можуть бути використані як біомаркери радіаційної мутагенної небезпеки водойми. Референтні види досліджуваної водойми вибирають за показниками розповсюдженості, домінування та особливостями цитогенетичного апарату (кількість хромосом та їх розміри). Потім відбирають проби цитогенетичного матеріалу, готують давлені препарати та аналізують за допомогою мікроскопічних та статистичних методів. Отримані усереднені результати порівнюють з величиною спонтанного мутаційного рівня та по збільшенню величини визначають радіаційну мутагенну небезпеку водойми.

Приклади реалізації способу.

Приклад 1

У 2011 р. проводили дослідження радіаційної мутагенної небезпеки озера Вербне, що знаходиться в межах Оболонського району м. Києва.

Як референтний вид для досліджуваного озера був вибраний очерет звичайний *Phragmites australis* (Trin) Ex. Steud. Вибір саме цього виду як референтного обумовлений домінуючим положенням цього виду у ценозі повітряно-водних рослин досліджуваної водойми та порівняно великими розмірами хромосом на стадії ана- телофази мітотичного циклу клітин кореневих меристем.

Були відібрані цитогенетичні проби коренів рослин, вимірний гама-фон та взяті зразки води, донних відкладів і рослин для визначення питомої радіоактивності і в подальшому потужності поглиненої дози опромінення. Радіаційне дозове навантаження на рослину - потужність поглиненої рослиною дози, визначали з урахуванням зовнішнього та внутрішнього опромінення, яке розраховували, виходячи з радіаційного фону, питомої радіоактивності води, донних відкладів та вмісту радіонуклідів ^{90}Sr і ^{137}Cs в очереті за допомогою дозових перерахункових коефіцієнтів (Handbook for assessment of the exposure of biota to ionising radiation from radionuclides in the environment / (Eds.) J. Brown, P. Strand, A. Hosseini, P. Borretzen. - Project within the EC 5th Framework Programme, Contract № FIGE-CT-2000-00102. - Stockholm, Framework for Assessment of Environmental Impact, 2003.-395 p.; B.D. Amiro, Radiological dose conversion factors for generic non-human biota used for screening potential ecological impacts. J. Environ. Radioactivity, 1997. - P. 35(1), 37-51).

Для мікроскопічного аналізу готували давлені препарати коренів згідно із загальноприйнятою методикою (Методические указания по цитологическим и цитозмбриологической технике (для исследования культурных растений) / Под ред. Л.И. Орел. - Ленинград, 1982. - С. 9, 10, 14). Аналіз препаратів проводили при збільшенні світлового мікроскопа у 1000 та з масляною імерсією. Проводили статистичну обробку даних (Закс Л. Статистическое оценивание. - М.: Статистика, 1976.-530 с.). Отримані результати відображені в табл.1.

Цитогенетичні показники очерету звичайного *Phragmites australis*, оз. Вербне, м. Київ

Водойма	Біомаркери радіаційної мутагенної небезпеки водойми				Число аберацій на одну аберантну клітину, б/р
	Частота аберантних клітин, %	Типи хромосомних порушень, %			
		Одинарні фрагменти та мости	Парні фрагменти та мости	Множинні аберації	
Оз. Вербне, м. Київ	1,02±0,02	96,0±0,2	4,0±0,04	0	1,0±0,04
Спонтанний рівень мутагенезу для гідробіонтів*	≤ 2,00-2,50	>50,0	<50,0	0-1	1,0

*(Polikarpov, G.G., Conceptual model of responses of organisms, populations and ecosystems in all possible dose rates of ionising radiation in the environment. Radiation Protection Dosimetry, 1998. - V. 1-4. - P. 181-185.; Tsytsugina, V.G., An indicator of radiation effects in natural populations of aquatic organisms. Radiat. Protect. Dosim, 1998. - V. 1-4. - P. 171-173; D. Woodhead, I Zinger, Radiation Effects on Plants and Animals // FASSET 2, A project within the EC 5th Framework Programme, Del.4, Contract No FIGE-CT-2000-00102. - P.147-150, 144-153.; IAEA. International Atomic Energy Agency. Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards // Technical Reports Series № 332. Vienna: IAEA, 1992).

Наведені усереднені дані тестування в таблиці 1 свідчать про те, що показники генетичної стабільності клітин кореневих меристем очерета звичайного з оз. Вербного знаходяться на рівні значень спонтанного мутагенезу для гідробіонтів. Це свідчить про те, що досліджувана водойма - оз. Вербне є безпечною з точки зору радіаційної мутагенної небезпеки. За даними гама-фону та виміряної питомої активності води, донних відкладів та рослин розрахована потужність поглиненої вищими водяними рослинами дози, яка становить 0,3 мГр/рік, що знаходиться у діапазоні потужностей поглиненої дози для біоти водойм з природним радіаційним фоном (DOE. A graded approach for evaluation radiation doses to aquatic and terrestrial biota. DOE-STD-1152-2002. Washington. US Dep. Energy. 2002).

Таким чином, низькі величини запропонованих показників генетичної стабільності референтного виду вищої водної рослинності досліджуваної водойми свідчать про відсутність радіаційної мутагенної небезпеки та підтверджені значенням потужності поглиненої дози, що одержана шляхом розрахунків за даними гама-спектрометричного та радіохімічного визначення вмісту радіонуклідів у абіотичних та біотичних компонентах досліджуваної водойми.

Приклад 2

Як об'єкт дослідження був вибраний Янівський затон р. Прип'ять, який знаходиться на території Зони відчуження та зони безумовного (обов'язково) відселення.

Як референтні види були вибрані очерет звичайний *Phragmites australis* та лепешняк великий *Gluceria maxima* (C. Gartm.). Вибір саме цих видів обумовлений їх широким розповсюдженням у досліджуваній водоймі, домінуючим та субдомінуючим положенням у ценозах повітряно-водяних рослин та досить великими розмірами хромосом на стадії ана-телофази мітотичного циклу клітин кореневих меристем.

Протягом вегетаційного періоду 2011 р. відбирали проби кореневих меристем очерету звичайного та лепешняка великого. Одночасно відбирали проби для розрахунку потужності поглиненої дози. Аналіз препаратів проводили при збільшенні світового мікроскопа у 1000 разів та з масляною імерсією. Проводили статистичну обробку даних (Закс Л. Статистическое оценивание. - М.: Статистика, 1976.-530 с.). Отримані результати відображені у табл.2.

Цитогенетичні показники референтних видів, Янівський затон р. Прип'ять

Водойма та референтний вид	Біомаркери радіаційної мутагенної небезпеки водойми				Число аберацій на одну аберантну клітину, б/р
	Частота аберантних клітин, %	Типи хромосомних порушень, %			
		Одинарні фрагменти та мости	Парні фрагменти та мости	Множинні аберації	
Янівський затон р. Прип'ять, очерет звичайний	3,95±0,36	52,55±2,20	20,26±1,40	27,19±0,96	1,28±0,06
Янівський затон р. Прип'ять, лепешняк великий	4,15±0,29	58,42±1,19	34,51±0,69	19,07±0,44	1,23±0,02
Спонтанний рівень мутагенезу для гідробіонтів*	≤ 2,00-2,50	>50,0	<50,0	0-1	1,0

*(Polikarpov, G.G., Conceptual model of responses of organisms, populations and ecosystems in all possible dose rates of ionising radiation in the environment. Radiation Protection Dosimetry, 1998. - V. I-4. - P. 181-185.; Tsytugina, V.G., An indicator of radiation effects in natural populations of aquatic organisms. Radiat. Protect. Dosim, 1998. - V. I-4. - P. 171-173; D. Woodhead, I Zinger, Radiation Effects on Plants and Animals // FASSET 2, A project within the EC 5th Framework Programme, Del.4, Contract No FIGE-CT-2000-00102. - P.147-150, 144-153.; IAEA. International Atomic Energy Agency. Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards // Technical Reports Series № 332. Vienna: IAEA, 1992).

- 5 Наведені усереднені дані показників цитогенетичної стабільності клітин кореневих меристем досліджуваних референтних видів свідчать про те, що у досліджуваній водоймі реєструється деяке підвищення радіаційної мутагенної небезпеки. Незважаючи на те, що спектр хромосомних аберацій - частка одинарних та подвійних мостів та фрагментів, відповідає нормі, звертає на себе увагу збільшення частки клітин з парними мостами та фрагментами, частки клітин з множинними абераціями та числа аберацій на одну аберантну клітину.
- 10 Це свідчить про те, що стан досліджуваної водойми - Янівського затону р. Прип'ять з точки зору радіаційної мутагенної небезпеки викликає занепокоєння. За даними гама-фону та вимірної питомої активності води, донних відкладів та рослин розрахована потужність поглиненої вищими водними рослинами досліджуваної водойми дози, яка становить 36,5 мГр/рік, яка наближається до значень потужності поглиненої дози для біоти, що може викликати зміни гематологічних показників та порушення у функціонуванні імунної системи (DOE. A graded approach for evaluation radiation doses to aquatic and terrestrial biota. DOE-STD-1152-2002. Washington. US Dep. Energy. 2002; UNSCEAR. Effects on non-human biota. Annex to the report of United Nations scientific committee on the effects of Atomic radiation to the General Assembly. New York, United Nations. 2008; Geras'kin SA, Fesenko S.V., Alexakhin RM. Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. - Environ Int. 2008. V. 34(6). - P. 88-97).
- 15 Таким чином, підвищення величини деяких з запропонованих показників генетичної стабільності референтного виду вищої водної рослинності досліджуваної водойми свідчить про те, що дана водойма потребує подальшого контролю і в разі потреби більш поглиблених досліджень з метою визначення потенціалу радіаційної мутагенної небезпеки.

Приклад 3

Як об'єкт дослідження було вибрано озеро Глибоке, що розташовано на лівобережній частині заплави р. Прип'ять, що є найбільш забрудненою територією Української ділянки Зони відчуження ЧАЕС.

5 Як референтні види були вибрані очерет звичайний *Phragmites australis*, лепешняк великий *Gluceria maxima* (C. Gartm.) та стрілолист стрілолистий *Sagittaria sagittifolia* L. Вибір саме цих видів обумовлений їх розповсюдженням у досліджуваній водоймі, домінуючим та субдомінуючим положенням у ценозах повітряно-водних рослин та рослин, що укорінені на дні водойми з листям, що плаває на поверхні, великими розмірами хромосом у стадії ана-телофази мітотичного циклу клітин.

10 Підготовку досліджуваного матеріалу проводили згідно прикладам 1 та 2. Отримані результати відображені у табл.3.

Таблиця 3

Цитогенетичні показники референтних видів, Янівський затон р. Прип'ять

Водойма та референтний вид	Біомаркери радіаційної мутагенної небезпеки водойми				
	Частота аберантних клітин, %	Типи хромосомних порушень, %			Число аберацій на одну аберантну клітину, б/р
		Одинарні фрагменти та мости	Парні фрагменти та мости	Множинні аберації	
Оз. Глибоке, зона відчуження очерет звичайний	7,63±0,41	34,03±1,16	35,76±1,28	30,21±1,06	1,65±0,06
Оз. Глибоке, зона відчуження, лепешняк великий	8,15±0,20	28,02±0,94	44,51±1,22	27,47±0,69	1,51±0,04
Оз. Глибоке, зона відчуження, стрілолист стрілолистий	11,23±0,20	32,58±1,75	25,76±1,28	40,21±1,06	2,32±0,08
Спонтанний рівень мутагенезу для гідробіонтів*	≤ 2,00-2,50	>50,0	<50,0	0-1	1,0

*(Polikarpov, G.G., Conceptual model of responses of organisms, populations and ecosystems in all possible dose rates of ionising radiation in the environment. Radiation Protection Dosimetry, 1998. - V. 1-4. - P. 181-185.; Tsytsugina, V.G., An indicator of radiation effects in natural populations of aquatic organisms. Radiat. Protect. Dosim, 1998. - V. 1-4. - P. 171-173; D. Woodhead, I Zinger, Radiation Effects on Plants and Animals // FASSET 2, A project within the EC 5th Framework Programme, Del.4, Contract No FIGE-CT-2000-00102. - P.147-150, 144-153.; IAEA. International Atomic Energy Agency. Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards // Technical Reports Series № 332. Vienna: IAEA, 1992).

15 Наведені в таблиці 3 усереднені дані свідчать про те, що у досліджуваній водоймі реєструється значне підвищення радіаційної мутагенної небезпеки. Усі показники генетичної нестабільності значно перевищують величини, що притаманні водоймам з підвищеним або неістотно підвищеним радіаційним фоном. Частота хромосомних аберацій у п'ять разів вище за рівень спонтанного мутагенезу, показники спектра хромосомних аберацій демонструють значне збільшення частки хромосомних типів аберацій (подвійних мостів і фрагментів та множинних аберацій). Кількість аберацій на одну аберантну клітину значно перевищує одиницю.

20 Це свідчить про те, що стан досліджуваної водойми - озеро Глибоке, є небезпечним з точки зору радіаційної мутагенної небезпеки. За даними гама-фону та вимірної питомої активності води, донних відкладів та рослин розрахована потужність поглиненої вищими водними рослинами досліджуваної водойми дози становить 119,5 мГр/рік, що перевищує
25 рекомендований поріг потужності дози хронічного опромінення для біоти - 87,6 мГр/рік (DOE. А

graded approach for evaluation radiation doses to aquatic and terrestrial biota. DOE-STD-1152-2002. Washington. US Dep. Energy. 2002; ERICA/ Environmental risk from ionizing contaminants and management/ Developed under EU 6th Framework Programme/ Contract No F16R-CT-2004-508847. www.ERICA-project.org. 2003).

5 Таким чином, значне перевищення усіх запропонованих показників генетичної нестабільності референтних видів вищої водної рослинності досліджуваної водойми свідчить про те, що дана водойма потребує нагальної уваги та контролю за її станом, і, в разі використання у господарчих потребах, більш поглиблених досліджень.

10 Таким чином, сукупність істотних ознак запропонованого способу визначення радіаційної мутагенності водойми, а саме визначення мутагенних ефектів на генетичному рівні в рослинному організмі-індикаторі, який є референтним видом вищої водної рослинності досліджуваної водойми, є необхідною і достатньою для досягнення забезпеченого винаходом технічного результату - розробки нового методу для визначення мутагенної небезпеки водойми, що має технічну простоту та високу інформативність щодо оцінки радіаційної мутагенності водойми.

15 Показники частоти, спектра та кількості хромосомних аберацій на одну абераційну клітину соматичних клітин кореневих меристем вищих водних рослин характеризують стабільність генетичного матеріалу референтних видів вищих водних рослин водойм, прямо корелюють з дозовим навантаженням на рослину та є одними з найбільш інформативних показників для оцінки мутагенної небезпеки водойми з тривалим радіонуклідним забрудненням.

20 Завдяки використанню запропонованого способу підвищується чутливість, інформативність та якість визначення радіаційної мутагенної небезпеки водойм з довготривалим радіонуклідним забрудненням.

25 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб цитогенетичної оцінки радіаційної мутагенної небезпеки водойм за допомогою цитогенетичних показників рослин, який включає дослідження частоти та спектра хромосомних аберацій клітин кореневих меристем, який **відрізняється** тим, що дослідження проводиться на референтних видах вищих водних рослин досліджуваної водойми за кількісними показниками генетичних ушкоджень хромосом, що включає підрахунок клітин, що мають хромосомні аберації, спектр цих аберацій та кількість аберацій на одну ушкоджену клітину, і на основі порівняння з контролем узагальнених даних та по збільшенню величини отриманих показників визначають радіаційну мутагенну небезпеку водойми.

35

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