

В.В. Гончарук¹, М.Р. Верголяс¹, И.В. Болтина²

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОСТИ И ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

¹ Институт коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского
НАН Украины, г. Киев;

² Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И. Медведя,
г. Киев, Украина

Проведен анализ генотоксических мутагенных свойств фасованной питьевой воды с использованием клеток различных тест-объектов. Показана эффективность применения комплексных исследований для более точной оценки качества воды.

Ключевые слова: двойные ядра, качество воды, мутагенная активность, микроядра, токсичность, формула крови, частота aberrаций.

Введение. Биотестирование (комплексное использование оптимальных наборов как тест-организмов, так и клеточных параметров) объективно характеризует биологическую составляющую качества воды. Биомониторинг питьевой воды, включая разные этапы ее приготовления, очистки, обеззараживания, должен проводиться по токсикологическим (острая и хроническая токсичность), гено- и цитотоксическим, мутагенным параметрам [1].

Цель данной работы – исследование фасованных вод на культуре лимфоцитов периферической крови (ЛПК) человека, рыбах *Danio rerio* (L.) и луке *Allium Cepa*.

Мутагенную активность фасованных вод изучали при помощи теста на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*.

Основу культивирования ЛПК и приготовления препаратов хромосом составлял стандартный полумикрометод, но с модификациями, принятыми в лаборатории мутагенеза. Отбор метафазных пластинок для цитогенетического анализа, классификация и учет aberrаций хромосом были общепринятыми [2]. Статистическую обработку получен-

© В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс, И.В. Болтина, 2013

ных данных проводили с использованием критерия Стьюдента, при этом учитывали частоту aberrаций хромосом, количество анеуплоидных клеток (возможный канцерогенный риск) и мультиабберрантных клеток (возможные нарушения системы репарации ДНК). Классификация исследуемых вод по категориям показана в табл. 1 [3].

Таблица 1. Категории фасованных вод в тесте на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека in vitro

Категория/ подкатегория вод	Токсичность		Частота клеток, %		Кол-во МАК
			с aberrациями	анеуплоидных	
Безопасные	0	Отсутствует	0 – 3,0	до 12,0	0
Небезопасные	1	Отсутствует или наблюдается полутоксический эффект без м/а	Недостовверное превышение без или с м/а		< 2
	2	Полутоксический или токсический эффект при нативном добавлении без и/или с м/а			
Условно опасные	3	Обнаружена не во всех разведениях без м/а	Достовверное превышение без или с м/а		> 3
	4	Обнаружена не во всех разведениях без и с м/а			
Опасные	5	Токсичность во всех разведениях без и с м/а			

Примечание. МАК – мультиабберрантные клетки, м/а – метаболическая активация.

В результате проведенных исследований на культуре к безопасным отнесена только одна вода – "Моршинская".

К "небезопасным 1" отнесены следующие воды: "Вонагва" (обнаружен токсический эффект в варианте эксперимента без метаболической активации); "Vittel" (повышенное содержание количества анеуплоидных клеток); "Старый Миргород" (полутоксический эффект в варианте эксперимента без метаболической активации и повышенное содержание количества анеуплоидных клеток).

К "небезопасным 2" отнесены воды НІРР и "Ордана". Они характеризуются полутоксическим эффектом в варианте эксперимента без метаболической активации, токсическим эффектом – с метаболической активацией и повышенным содержанием количества анеуплоидных клеток.

Категорию "опасные 5" составляют воды "Доктор" (Росинка), "Humana", "Калипсо", "Contrex" из-за токсического эффекта в трех разведениях (последнее – до 50 раз).

Согласно различным цитогенетическим показателям (увеличение частоты aberrаций хромосом, количества анеуплоидных клеток и др.) остальные исследуемые воды заняли промежуточные варианты – "условно опасные 3 или 4": "София Киевская", "Bebivita", "Пушкарская живая", SPA, "Знаменивская", "Аква Арел", "Пилигрим", "Демидовская", "Сенежская", "Новотерская горная", "Ватерхол + Селен", "Ватерхол", "Bebivita", "Вода питна".

Рыбы Danio rerio (L.) Материалом для экспериментов послужили 40 экземпляров рыб *Danio rerio (L.)*, выращенных в лаборатории биомаркеров и биотестирования Института коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского НАН Украины.

Для определения влияния питьевой фасованной воды на частоту возникновения ядерных нарушений в клетках различных тканей и изменения лейкоцитарной формулы крови рыб помещали на четверо суток в емкости с исследуемой водой. От каждой особи отбирали образцы тканей хвостового плавника, жабр и крови. Процесс регенерации хвостового плавника индуцировали перед началом эксперимента путем резекции небольшой краевой зоны (шириной 1 – 2 мм). Кровь отбирали из хвостовой вены, приготовленные мазки фиксировали в 96 %-ном растворе этанола в течение 30 мин и окрашивали по Романовскому-Гимза. Фрагменты жабр и хвостового плавника фиксировали смесью глицерина, уксусной кислоты и воды (1:1:10). Полученные отпечатки тканей рыб окрашивали по Романовскому-Гимза. Препараты анализировали под световым микроскопом при общем увеличении $\times 1000$ [4].

Категории классификации вод для рыб представлены в табл. 2

Таблица 2. Категории классификации вод, используемых для тестов на рыбах *Danio rerio* (L.)

Категория / подкатегория		Генотоксические показатели		Индекс цитотоксичности
		Микроядра	Двойные ядра	
Безопасные	0	0	0 – 0,33	0 – 3,0
Небезопасные	1	0,33	0,66	3,01 – 10,0
	2	0,67	0,99	10,01 – 15,0
Условно опасные	3	0,99	1,0 – 2,0	15,01 – 20,0
	4	>1,0	>2,01	>20,0
Опасные	5	Гибель рыб		

В табл. 3. представлены воды, категории которых совпадают в вышеупомянутых тестах.

Таблица 3. Оценка качества фасованных вод (при совпадении результатов)

Вода	Качество воды	
Моршинская	Безопасные	0
Старый Миргород	Небезопасные	1
Вопарва		2
Ордана		
Vittel		
НІРР	Условно опасные	3
Пушкарская живая		
София Киевская		
Демидовская		
Сенежская		4
Пилигрим		
Знаменивская		
Аква Арел		
SPA		
Новотерская горная		

Проведена сравнительная оценка фасованных вод с использованием тест-объектов – рыб и культуры ЛПК человека. При исследовании 24 фасованных вод у 15 из них полностью совпала оценка качества на двух тестах, а остальные отнесены к разным категориям (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительная оценка фасованных вод с использованием тест-объектов

Вода	Рыбы	ЛПК
Ватерхол + Селен	Небезопасные 1	Условно опасные 4
Ватерхол	То же	То же
Bebivita	Небезопасные 2	Условно опасные 3
Вода питна	То же	То же
Сонтрех	Условно опасные 4	Опасные 5
Доктор (Росинка)	То же	То же
Humana	– " –	– " –
Калипсо	– " –	– " –
Горная вершина	Опасные 5	Условно опасные 4

Разница в указанных данных может быть объяснена отличием самих тест-объектов. Рыбы – это организм со своей системой метаболической активации, которую в культуре ЛПК создают искусственно (добавляя фракцию S-9 и ко-факторы). Однако следует отметить, что данная культура не требует экстраполяции на главный субъект, для безопасности которого проводятся подобные эксперименты.

Для уточнения цитогенетических эффектов на рыбах и в культуре ЛПК человека был проведен корреляционный анализ.

По микроядерному тесту рыбы реагируют сходным образом с млекопитающими, в том числе и человеком. Поэтому их 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 [1, 5]. Это подтверждают коэффициенты корреляции между показателями на рыбах и в культуре ЛПК человека (табл. 5).

Таблица 5. Коэффициенты линейной корреляции между показателями телят-объектов рыбоводной культуры лимфоцитов периферической крови

Лимфоциты	Рыбы, %			Кровь, %		Жабры, %		Хвостовой плавник, %	
	МЯ	2N	Индекс цитотоксичности	МЯ	2N	МЯ	2N	МЯ	2N
Аберрации %	б/а	0,60	0,60	0	-0,60	0	0	0,67	0,92
	с/а	0,60	0	0	0,62	0,65	0	0	0
Кол-во ПАК	б/а	0	0	0	0	0	0	0	0
	с/а	0,71	0,70	0,75	0,70	0,64	0,61	0,68	0,62
Кол-во МАК	б/а	0	0	0	0	0	0	-0,73	0
	с/а	0	0,60	0	0	0,62	0	0,80	0

Примечание. МЯ – микроядра; 2N – двойные ядра; б/а – без активации; с/а – с активацией; ПАК – поврежденность аберрантной клетки.

Полученные значения коэффициентов линейной корреляции свидетельствуют о взаимосвязи почти всех показателей, определяемых на рыбах (кроме показателей двойных ядер, определяемых в хвостовом плавнике), и количества поврежденных абберрантных метафаз с метаболической активацией,

Лук Allium Cepa (L.). Использование ростового теста для оценки качества питьевой воды позволяет эффективно и быстро определить наличие в ней токсикантов. Согласно [6] были изучены длина и масса корешков растений *Allium Cepa (L.)* (табл. 6).

Таблица 6. Категории классификации вод для *Allium Cepa (L)*

Категория / подкатегория вод		Длина корешков, мм	Масса корешков, г	
Безопасные	0	40,1 – 45,0	551 (король) – 616	Отс.
Небезопасные	1	45,1 – 50,2	617 – 682	551 – 486
	2	50,3 – 55,4	683 – 748	485 – 420
Условно опасные	3	55,5 – 60,6	749 – 814	Отс.
	4	60,7 – 65,8	815 – 880	То же
Опасные	5	> 65,9	> 881	—"–"

В результате к категории "безопасная" отнесена только вода "Моршинская".

К "небезопасным" отнесена вода "Старый Миргород". "Bonagva", "Ватерхол+селен" и НІРР также являются "небезопасными", но занимают промежуточное положение между 1 и 2 подкатегорией. Воды "Архыз", "Vittel", "Ордана", "Ватерхол", "Куяльник", "Вода питна" – отнесены к "небезопасным 2".

К "условно опасным 3" отнесены воды "София Киевская", "Bebivita", "Пушкарская живая", SPA, "Humana", а "Знаменивская", "Доктор (Росинка)", "Аква Ареал", "Пилигрим" – к "условно опасным 4".

Воды "Горная вершина", "Contrex", "Калипсо" принадлежат к категории "опасные 5".

Определены коэффициенты линейной корреляции между изучаемыми показателями растительного теста и показателями остальных тестов (табл. 7).

Таблица 7. Коэффициенты линейной корреляции показателей тест-объектов рыбы *Danio rerio* (L.), культуры лимфоцитов периферической крови человека с луком *Allium Sera* (L.)

<i>Allium Sera</i> (L.)	ЛПК			Рыбы, %			Кровь, %		Жабры, %		Хвостовой плавник, %	
	абerrаций, %	ПАК	МАК	МЯ	2N	Индекс цитоток- сичности	МЯ	2N	МЯ	2N	МЯ	2N
Масса	–	–	–	0,60	0,60	0,62	–	–	–	–	–	0,83
Длина ко- решков	0,81	0,61	0,64	0,90	0,88	0,89	0,71	0,81	0,78	0,84	0,60	0,74

Из указанной таблицы видно, что корреляция между длиной корешков у *Allium Cepa* (L.) и некоторыми цитогенетическими данными на ЛПК существует только в эксперименте с метаболической активацией, что подтверждает выводы о важности последней.

Кроме того, эффективным показателем является длина корешков *Allium Cepa* (L.) – наличие коэффициентов корреляции между данным показателем, а также одиночными и двойными ядрами у рыб *Danio rerio* (L.). Это может свидетельствовать о влиянии токсических веществ именно на длину корешков *Allium Cepa* (L.).

Таким образом, на основании проведенных исследований показано, что только вода "Моршинская" соответствует категории "безопасная". Остальные воды ("Старый Миргород", "Bonagva", "Ордана", "Vittel" и "Нірр") принадлежат к категории "условно опасные" или "опасные".

Выводы. Итак, стойкая корреляционная связь выявлена между большинством показателей, определяемых на рыбах, луке, и количеством поврежденных аберрантных метафаз с метаболической активацией. Корреляция связывает количество мультиаберрантных клеток (повреждено три и более хромосом), которое может указывать на сбой в системе репарации в культуре лимфоцитов периферической крови человека, и наличие двойных ядер у рыб, что свидетельствует об изменении в протекании митоза. Значения коэффициентов линейной корреляции (см. табл. 5) соответствуют данным экспериментов без метаболической активации. То есть система метаболической активации, применяемая при исследованиях на культуре лимфоцитов периферической крови, также играет важную роль в проведении экспериментов.

В результате полученных данных показана эффективность применения клеток как тест-организмов, так и культуры клеток периферической крови человека для более точной оценки качества воды.

Резюме. Проведений анализ генотоксичних та мутагенних властивостей фасованої питної води з використанням кліток різних тест-об'єктів. Показана ефективність застосування комплексних досліджень для більш точної оцінки якості води.

V.V. Goncharuk, M.R. Vergolyas, I.V. Boltina

MUTAGENICITY STUDIES AND GENOTOXICITY OF DRINKING WATER

Summary

Has been analyzed genotoxic and mutagenic packaged drinking water with using cells as test organisms and cell cultures of human peripheral blood. Revealed persistent correlation between the majority of indicators identified on fishes, onions, and the number of aberrant damaged metaphases with metabolic activation. The result shows the effectiveness of the comprehensive research to better assess the quality of water.

Список использованной литературы

- [1] *Arkhipchuk V.V.* //J. Fish Biol. – 1999. – **54**. – P. 513 – 524.
- [2] *Пат. 85493 Україна, МПК G 01 № 33/18 / В.В. Гончарук, І.В. Болтіна, М.Р. Верголяс* – Опубл. 26.01.2009, Бюл. №2.
- [3] *Куринный А.И.* // Тез. докл. II съезда гигиенистов УССР (Львов, 1986 г.). – Львов, 1986 – С. 59.
- [4] *Пат. 93964 Україна, МПК G 01N 33/18 / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс.* – Опубл. 25.03.2011, Бюл. №6.
- [5] *Tsangaris C., Vergolyas M., Fountoulaki E., Goncharuk V.* // Ecotoxicol. and Environ. – 2011. – **74**, N 8. – P. 2240 – 2244.
- [6] *Архипчук В.В., Гончарук В.В., Черных В.П., Малоштан Л.Н., Гриценко И.С., Верголяс М.Р., Мосейчук Т.В.* // Совр. пробл. токсикологии. – 2005. – N2. – С. 17 – 24.

Поступила в редакцию 09.04.2013 г.