

УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ ГІГІЄНИЧНИЙ ЦЕНТР

На правах рукопису

СЛУЧИК ВІКТОР МИКОЛАЙОВИЧ

**КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА МУТАГЕННОГО ФОНУ, ЗУМОВЛЕНОГО
МАЛОІНТЕНСИВНИМИ ФАКТОРАМИ ХІМІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО - ПОПУЛЯЦІЙНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

03.00.15 - генетика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі
паразитології Івано-Франківської
академії

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00754302 (L)

Наукові керівники: професор, доктор медичних наук
Ковальчук Лариса Євгенівна
професор, доктор медичних наук
Баркич Ігор Романович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Горова Алла Іванівна
кандидат медичних наук
Кривчук Олександр Павлович

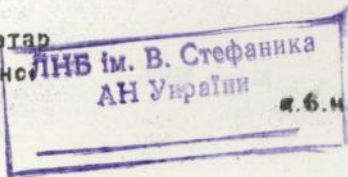
Провідна установа:
Львівський Державний університет ім. І. Франка

Захист відбудеться 28 03 1996р. о _____ годині
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.37.03 при
Українському науковому гігієнічному центрі (253660,
м.Київ, вул.Попудренка,50).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці
Українського наукового гігієнічного центру.

Автореферат розіслано 27 лютого 1996р.

Вчений секретар
спеціалізованої
вченої ради



я.б.ч. Стефанович Г.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми

Однією з найістотніших проблем, що постала перед людством у зв'язку з розвитком науковотехнічного прогресу є забруднення середовища його існування. Процес надходження продуктів антропогенної природи у довкілля набув глобальних масштабів. На думку вчених найсерйознішими наслідками техногенних змін біосфери є генетичні (Лекавичус Р.К., 1983; Агаджанян Н.А., 1989; Бариліак І.Р. та ін., 1993). Наявність у зовнішньому середовищі великої кількості генотоксикантів і постійне розширення їх арсеналу безпосередньо веде до збільшення інтенсивності мутагенного тиску довкілля на людську популяцію (Дубинин Н.П., Пашин Ю.В., 1977; Савченко М.Ф. і др., 1989). Невідповідність філогенетично детермінованої швидкості адаптації зростаючому темпу мутаційного процесу може призвести до кризового стану і реальної загрози існуванню людини як біологічного виду (Агаджанян Н.А., 1988; Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., 1989). Останнє виявляється у збільшенні кількості генетично зумовлених патологій, частоти вроджених вад розвитку, мимовільних викиднів, онкологічних захворювань та реальних цитогенетичних ефектах, і як наслідок - погіршенні стану здоров'я населення. Особливо це характерно для районів України з високим рівнем техногенного забруднення (Звиняцьковський Я.І. та ін., 1991; Сердюк А.М., 19...; Пилинская М.А. і др., 1994) і лише від своєчасного і комплексного вирішення проблем генофонду значною мірою залежатиме найближче майбутнє нашого народу.

В реальних умовах на організм людини діє величезний комплекс фізичних, хімічних і біологічних чинників природного та антропогенного походження (Бариліак І.Р. і др., 1989; Литвинов Н. М. і др., 1990). Комбінована та комплексна дія цих факторів на спадковий апарат вивчена недостатньо. Остаточнo не розроблені також методологічні і

методичні підходи щодо оцінки їх впливу на біологічні об'єкти в умовах виробничого, а особливо навколишнього середовища (Бонашевская Т.И., 1993; Горова А.І., Скворцова Т.В., 1995). У зв'язку з цим стала пріоритетною оцінка сумарного впливу забруднювачів довкілля і мутагенів, зокрема, на загальний стан організму і функціонування спадкового апарату (Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., 1989).

Ступінь дослідженості тематики дисертації

Надмірна концентрація хімічної промисловості, особливо в рекреаційних зонах України, створює напружену екологічну ситуацію. Цю точку зору підтверджують дослідження про мутагенні властивості відносно малотоксичних сполук, здатних викликати у кілька разів більший ефект, ніж радіація (Рапопорт І.А., 1966).

На Прикарпатті понад 30 років функціонує Калуське виробниче об'єднання "Хлораніл", тепер - акціонерне товариство "Оріана" (АТО). Вплив екологічних чинників даного регіону на здоров'я населення вивчається співробітниками Івано-Франківської Державної медичної академії (Бабенко Г. О., 1992; Нейко Є.М. та ін., 1992; Волосянко Р.П. та ін., 1992). Однак генотоксичність комплексу хімічних сполук, що входять до складу викидів підприємств АТО, не досліджувалась.

Мета та основні завдання роботи

Для реалізації зазначеної мети були поставлені такі завдання:

- 1) Визначення мутагенної дії комплексу середників природної питної води у цибулі ріпчастої;
- 2) Вивчення генетичної та репродуктивної активності антропогенних чинників оточуючого середовища для ссавців;
- 3) Встановлення цитогенетичних ефектів сумарної дії забруднювачів довкілля у людини (дітей 3-х вікових груп);

4) Загальна оцінка мутагенного фону, існуючого на територіях з різною інтенсивністю техногенного навантаження, за допомогою комплексу цитогенетичних і гістологічних методів дослідження.

Теоретична цінність дослідження

Вивчені закономірності дії комплексу хімічних забруднювачів доквілля на спадковий апарат біологічних видів з різним ступенем організації в реальних умовах біосфери. Доведена істотна генетична небезпека антропогенного забруднення оточуючого середовища для застосованих у дослідженнях рослин, тварин, а також людей, що перебувають на територіях з підвищеним мутагенним фоном.

Практична цінність роботи

Показана необхідність поєднаного аналізу результатів популяційних та експериментальних досліджень для з'ясування інтенсивності мутагенного фону та його віддалених наслідків на конкретній території.

Запропонований інтегральний показник визначення функціонального стану геному людини.

Результати досліджень можуть бути використані як вихідні дані при подальшому вивченні динаміки мутагенного фону на досліджуваних територіях.

Наукова новизна

Вперше на підставі популяційних та експериментальних досліджень встановлено рівень пошкодження спадкового апарату біологічних видів, що знаходились на територіях, які піддаються впливу викидів комплексу хімічних підприємств АТО.

Вперше для визначення генетичної активності комплексу факторів доквілля стосовно людини використано показники каріограми її соматичних клітин. З'ясовано критерії оцінки функціонального стану

геному останніх. Показана його залежність від рівня забрудненості сточуючого середовища та віку і статі.

Рівень реалізації та впровадження наукових розробок

Отримані результати про цитогенетичні ефекти комплексу факторів довідля в окремих зонах Калуського району застосовувались екологічною комісією при Івано - Франківській Обласній Раді народних депутатів для окладання актів про екологічну ситуацію в області.

Спрацьований спосіб визначення функціональної активності геному людини атілений в роботу генетичної лабораторії Івано - Франківської Державної медичної академії.

Інформація про принципи тестування комплексу потенційних мутагенів довідля в реальних умовах біосфери та розроблені методи оцінки генетичної небезпеки антропогенного забруднення знайшли застосування в педпроцесі Івано - Франківської Державної медичної академії, Прикарпатського університету.

На основі результатів роботи опубліковано дві раціоналізаторські пропозиції.

Положення, що виносяться на захист

1. Запропонована у роботі тест - система з високим ступенем достовірності характеризує мутагенний фон та його небезпеку для іонуючих на досліджуваних територіях геноценозів.
2. У тест - об'єкті, на яких оцінювали рівень мутаційної мікливості в районах з підвищеним рівнем антропогенного забруднення навколишнього середовища відмічається зростання ступеня пошкодження спадкового апарату соматичних і статевих клітин та виражений гонадотоксичний ефект. Зсув спектру перебудов каріому у *Allium* сера

та *Mus musculus* в бік хроматидних, вказує на хімічну природу мутагенезу.

3. Метод оцінки функціонального стану геному за комплексом показників каріограми соматичних клітин (нуклеоллярний індекс, статевий хроматин, кількість нормальних і морфологічно змінених ядер та індекс хроматизації) є об'єктивним критерієм для встановлення генетичної активності факторів довкілля стосовно людини.
4. Комплекс факторів малої інтенсивності хімічного виробництва зумовлює підвищений мутагенний фон у зонах, які зазнають впливу викидів АТО, за відношенням до його спонтанного рівня в екологічно "чистих" районах

Апробація роботи

Основні положення роботи доповідались на обласних і міжвузівських конференціях молодих вчених (Івано-Франківськ, 1993, 1994), на науково - практичній конференції "Здоров'я та відтворення народу Прикарпаття" (Івано-Франківськ, 1993), і Національному конгресі анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів (Івано-Франківськ, 1994), і Міжнародному конгресі молодих вчених українців (Івано-Франківськ, 1995), II з'їзді медичних генетиків України (Львів, 1995).

За матеріалами дисертації опубліковано 8 друкованих праць.

Особиста участь автора

Автором особисто проведена оцінка генетичної активності питної ґрунтової води за допомогою ана-телофазного аналізу на А. оера. Вивчена генотоксичність комплексу факторів довкілля для самців мишей у тестах на хромосомні аберації і домінантні летальні мутації та з'ясовані гонадотоксичні ефекти. Проведена оцінка каріограми дітей 3-х вікових груп. на основі цих даних встановлений функціональний стан їх геному.

Крім того, дисертант виконав статистичну обробку отриманих результатів з наступним кореляційним та факторним математичним аналізом.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, розділів, що містять матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їх обговорення, висновки, практичних рекомендацій і вказівника цитованої літератури. Робота викладена на 118 сторінках машинопису, ілюстрована 14 таблицями та 17 рисунками. Бібліографічний вказівник налічує 308 джерел.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали, методи та об'єкт досліджень

При визначенні зон дослідження керувались Європейською регіональною сіткою постійного радіоекологічного спостереження та даними екологічної комісії при Обласній Раді народних депутатів і обласній санітарно - епідеміологічній станції. Крім того, враховували відстань зон до АТО і розу вітрів. Таким чином було встановлено: села Завій і Гразівка - умовно екологічно чисті території (контроль), село Верхнє і місто Калуш - зони, які піддаються впливу викидів хімічного виробництва АТО. Серед 143-х складників, що входять до викидів вказаного промислового комплексу, за відповідним каталогом (Сьякте Т.Г., Сьякте Н.И., 1991) ідентифіковано 20 потенційно генетично активних чинників.

Всі експерименти виконували в умовах *in vivo* у весняні періоди 1993 / 94 років, синхронно на всіх визначених територіях.

При роботі з таст - об'єктами керувались рекомендаціями групи експертів, які працюють в межах Міжнародної програми по хімічній безпеці (ВОЗ, 1989).

Для експрес - оцінки цитогенетичної активності комплексу факторів оточуючого середовища обрали ґрунтову воду як акумулятор сумарної забрудненості біогфери (Одум Ю., 1986; Савченко М.Ф. и др., 1989). На цьому етапі використали ана-телофазний аналіз клітин апікальної меркостеми первинних корінців цибулі ріпчастої. Препарати хромосом готували загально прийнятим методом (Дарлінгтон С., Ла Кур Л., 1980). Фарбування проводили фуксінорчистою кислотою за методом "холодний Шифф" (Пушева З.П., 1980). Усього проаналізовано 3406 ана - телофаз.

Після 2-х місячного перебування експериментальних тварин з досліджуваних населених пунктах їх застосовували в наступних тестах:

1. На хромосомні аберації в клітинах кісткового мозку (препарати хромосом готували загально прийнятим методом (Макгрегор Г., Варлі Дж., 1986)) і фарбували по Уна - блю. Загалом досліджено 2000 метафаз.
2. На домінуючі летальні мутації в статевих клітинах самців мишей (застосували загально визнану схему (ЕОЗ, 1989)). Використано 45 самців і 135 самок.
3. На гонадотоксичність (підготовку матеріалу, зрізи сім'яників та їх фарбування гематоксиліном і еозином проводили за Н.А. Юриною і А.Т. Радостиною (1993)), обчислення індексу сперматогенезу та середньої кількості нормальних сперматогоніїв здійснювали загально визначеним способом (Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф., 1993), усього 1600 сім'яних канальців.

На основі проведеного анкетування і безпосереднього обтоження відібрали 393 дітей для цитогенетичного обтоження.

Мазки екофоліативного матеріалу виконували згідно загально прийнятої методики (Ганина К.П., Шевченко И.Т., 1974) і фарбували ацетооросіном (Дышловой В.Д., 1976). Дослідження каріограми поєднували з морфометричним аналізом.

Математичну обробку результатів досліджень проводили на персональному комп'ютері IBM 486-DX2-66 за пакетом програм "Arm stat".

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для адекватної оцінки реальної генетичної ситуації в зонах з різним ступенем антропогенного забруднення біосфери використали комплекс цитогенетичних і гістологічних методів аналізу тест-об'єктів з врахуванням рівня біологічної організації.

1. Дослідження цитогенетичної активності питної води

Для встановлення генотоксичних властивостей питної води застосували метод аналізу клітин апікальної меристеми корінців цибулі. Відбір проб води проводили дворазово в чотирьох різних екологічних зонах Калузького району. Результати, отримані при повторному дослідженні, статистично достовірно не відрізнялись від основних. Тому останні вважали провідними.

Встановлено, що всі вивчені цитогенетичні показники: відсоток аберантних клітин, кількість аберацій на одну досліджену і аберантну клітину у цибулі ріпчастої, яка пророщувалась на ґрунтовій воді із сіл Зав'ї і Грабівка (контрольні території) статистично достовірно між собою не відрізнялись. Аналіз мутагенності води, яка споживається населенням в селі Зав'ї показав, що вказані параметри знаходились в межах спонтанних і становили відповідно: $1,73 \pm 0,28$; $0,028 \pm 0,006$; $1,364 \pm 0,244$.

Не зважаючи на те, що село Грабівка визначене також як контрольне, відсоток аберантних клітин переважав значення такого у селі Зав'ї на 11% і складав $1,92 \pm 0,30$. Кількість аберацій на одну досліджену клітину становила 120% ($0,035 \pm 0,006$) за відношенням до аналогічного параметра, отриманого при дослідженні ґрунтової води із села Зав'ї. Кількість аберацій на одну аберантну клітину складала $1,393 \pm 0,223$, що на два відсотки вище такого показника у першому контрольному населеному пункті. У зв'язку з отриманими результатами за контрольні цифри в подальшому вважали ті, які характеризують генетичні

властивості води із села Завій. За своїми абсолютними значеннями вони були нижчими і у більшій мірі відповідали рівню природного мутагенезу.

Встановлену нами близьку до спонтанної цитогенетичну активність води з контрольних територій можна пояснити тим, що вони знаходяться у відносно "чистих" районах. Проте, в селі Грабівка, де числовий рівень використаних параметрів був вищим, ніж у селі Завій, техногенні зміни оточуючого середовища можна вважати суттєвішими. Останнє узгоджується із сучасними уявленнями про структуру і функціонування екосистем (Білявський Г.О. та ін., 1993; Сьтнік К.М. і др., 1994).

При дослідженні генотоксичності комплексу чинників споживчої води із забруднених територій з'ясували, що показники їх пошкоджуючої дії на опадковий апарат цибулі ріпчастої істотно відрізнялись від прийнятих контрольних. Питна вода із села Верхне підвищувала рівень аберантних клітин у зазначеного тест - об'єкту в 1,6 рази у порівнянні з контролем ($2,79 \pm 0,31\%$, $P < 0,05$). Спостерігалась тенденція до збільшення кількості аберацій на одну досліджену клітину на 61% ($0,045 \pm 0,007$, $P < 0,10$). Кількість аберацій на одну аберантну клітину у рослин, що тестували воду із села Верхне по абсолютному значенню була дещо вищою, ніж у контролі ($1,448 \pm 0,120$), проте така відмінність була статистично недостовірною.

Отримані нами дані корелюють з результатами інших дослідників, які зафіксували зростання цитогенетичної активності проб води у районах з підвищеним рівнем забрудненості (Guzzella I. et al., 1989; Ferrari Gustavino S., Rizzoni M., 1991; Куринный А.И. і др., 1993).

Цитогенетична активність питної води із міста Калуша значно переважала таку у селі Завій. Так, кількість клітин з абераціями становила $3,69 \pm 0,36\%$, що складало 213% ($P < 0,001$) відносно контрольної цифри. Кількість аберацій на одну досліджену клітину ($0,055 \pm 0,006$) майже у два рази ($P < 0,01$) перевищувала аналогічний показник, який характеризує генетичні властивості ґрунтової води із контрольного села.

а число аберацій на одну аберантну клітину досягало величини $1,500 \pm 0,120$, що в 1,1 рази більше, ніж у контролі.

Виявлений нами факт значної генотоксичності води, при тестуванні проб, відібраних з центральної мережі водопостачання міста Калуша, узгоджується з подібними результатами оцінки мутагенного потенціалу води із системи центрального водозабезпечення міста Будапешт (Sujbet L., 1991) Вище вказані дані можуть бути пояснені недосконалістю існуючої системи водоочищення, на що вказують і інші дослідники (Schenk K. et al., 1992).

Аналіз спектру перебудов спадкового апарату тест - об'єкта показав, що у рослин, які пророщувались на воді із контрольних територій, співвідношення між хромосомними і хроматидними абераціями окладало у селі Завій - 1:1,2, у селі Грабівка - 1:1,3. При тестуванні питної води з екологічно небезпечних зон це співвідношення свідчило про достовірне зростання кількості хроматидних перебудов: у селі Верхнє воно становило 1:2, а в місті Калуші - 1:3.

Таким чином, нами встановлена неоднорідність еколого - генетичної ситуації двох контрольних територій. За даними цитогенетичного аналізу на *Allium* сера ґрунтова опоживча вода, відібрана у селі Завій, характеризується показниками, ближчими до спонтанного рівня мутагенезу, ніж у селі Грабівка. Збільшення кількості аберацій у тест-об'єкта при дослідженні генотоксичності питної води в забруднених районах відбувалось за рахунок аберацій хроматидного типу, що свідчить про підвищений мутагенний фон хімічної природи.

2. Вплив комплексу факторів довкілля на спадковий апарат соматичних клітин мишей

Для встановлення ступеня пошкоджуючої дії навколишнього середовища на каріом соматичних клітин експериментальних особців їх утримували два місяці на визначених територіях. Враховуючи результати попередніх досліджень, як контрольну зону використали тільки село Завій.

З'ясували, що у тварин, які піддавались експозиції на території контрольного населеного пункту, середньогрупова частота аберантних метафаз становила $0,83 \pm 0,31\%$. Кількість аберацій на одну досліджену та аберантну метафазу складала відповідно $0,008 \pm 0,003$ і $1,000 \pm 0,000$. Останні не перевищували спонтанний рівень, характерний для цього виду.

Миші, які протягом вказаного терміну проживали в селі Верхне характеризувались достовірно більшим відсотком метафаз з абераціями. У них цей показник перевищував контрольну цифру в 2,2 рази ($P < 0,05$) і складав $1,83 \pm 0,31\%$. У цих же тварин кількість аберацій на одну досліджену метафазу складала $0,020 \pm 0,004$; ($P < 0,05$), що становило 250% відносно контрольного значення. Кількість аберацій на одну аберантну метафазу хоча і була вища, за такий параметр у контрольній групі тварин на 8,3%, проте ця різниця не була статистично достовірною.

Відмінності цитогенетичних характеристик експериментальних ооцитів, які тимчасово перебували у місті Калуші, були максимальними. Питома вага метафаз з перебудовами складала $2,63 \pm 0,38\%$, тобто у 3,2 рази вище від контрольного параметра ($P < 0,01$). Достовірно більшим був і показник кількості аберацій на одну досліджену метафазу. Він перевищував такий у контрольних мишей на 280% ($P < 0,05$) і становив $0,030 \pm 0,004$. Число аберацій на одну аберантну метафазу за своїм абсолютним значенням ($1,198 \pm 0,124$) було більшим за контрольну цифру, однак статистично достовірної різниці не виявлено.

Результати наших досліджень не суперечать існуючим даним літератури. П.П. Халиков (1990) з'ясував, що у диких мишей, які живуть на бавовняних полях (інтенсивне застосування пестицидів) рівень пошкоджень каріому був значно вищим ніж у тих, що знаходяться на полях, засіяних конюшиною (агенти захисту рожлин, не застосовуються), та контрольних (лабораторних) тварин. У щурів і мишей, які протягом 1,5–4,5 місяців експонувались в межах великих промислових підприємств, також

закріплені істотні порушення спадкового апарату соматичних клітин (Дамаков Б. А. і др., 1990).

Дослідження спектру аберацій у використаних в цьому дослідженні ссавців виявило, що у контрольних тварин співвідношення між хромосомними і хроматидними перебудовами складало в середньому 1:2. У мишей, які перебували на забруднених територіях збільшувалась питома вага хроматидних аберацій, а згадане співвідношення становило - 1:3.

Таким чином, підсумовуючи результати цих досліджень можна констатувати, що комплекс факторів довкілля в районах із антропогенним забрудненням біосфери негативно впливає на спадковий апарат соматичних клітин ссавців. Крім того, встановлено зсув спектру аберацій клітин кісткового мозку в бік хроматидних у мишей, що перебували на забруднених територіях. Останній факт вказує на підвищений рівень мутагенного фону в екологічно небезпечних районах за рахунок генотоксикантів хімічної природи.

3. Вплив комплексу факторів довкілля на спадковий апарат статевих клітин самців мишей

Визначаючи характер впливу зовнішнього середовища на геном статевих клітин піддослідних тварин застосували тест на домінантні летальні мутації у самців мишей. Експерименти провели після двохмісячного перебування останніх (цикл сперматогенезу у мишей складає в середньому 8 тижнів) на обстежуваних територіях.

Встановлено, що у тварин, які тимчасово перебували у селі Завій (контроль) проаналізовані показники знаходились в межах спонтанних. Так, постімплантаційна смертність складала $10,14 \pm 1,33\%$. Середня кількість місць імплантації у самок, які використовувались для тестування контрольної групи самців, складала $10,55 \pm 0,31$, а кількість живих і мертвих ембріонів становила відповідно $9,48 \pm 0,25$ і $1,07 \pm 0,11$.

Дані, які ми отримали в результаті проведення описаного тесту у тварин, що перебували у селі Верхнє, істотно відрізнялись від конт-

рельних. Індукована самцями постімплантаційна смертність становила $13,85 \pm 1,05\%$, що на 37% вище ніж у контролі ($P < 0,05$), частота домінантних леталей дорівнювала 0,075, хоча кількість місць імплантації ($10,18 \pm 0,32$) практично не змінена порівняно з аналогічним контрольним показником. Число живих імплантатів у цій групі ссавців було нижчим відносно контролю на 7% і складало $8,77 \pm 0,27$ ($P < 0,10$), а мертвих перевищувало контрольну цифру в 1,3 рази ($P < 0,02$) і було рівним $1,41 \pm 0,09$.

Порівняльна характеристика частоти домінантних леталей, індукованих статевими клітинами самців, що перебували в місті Калуші, і контрольної групи тварин виявила статистично достовірні відмінності. В дослідній групі постімплантаційна смертність перевищувала контрольну цифру в 1,6 рази ($P < 0,001$) і складала $17,38 \pm 1,00$. Частота домінантних леталей підвищувалась до 0,102. Середня кількість місць імплантації у самок, що тестували самців із міста Калуша, не відрізнялась від такої у контролі і становила $10,30 \pm 0,36$. Кількість живих ембріонів складала $8,51 \pm 0,29$, що в 1,1 рази менше ($P < 0,02$), а мертвих - $1,79 \pm 0,11$, що в 1,7 рази більше ($P < 0,001$), ніж відповідні цифри в контрольній групі тварин.

Вище описані дані підтверджують експериментальні дослідження інших авторів, які вказують на здатність багатьох мутагенів (присутніх у викидах хімічних підприємств АТО) долати гемато-тестискул'ярний бар'єр і взаємодіяти з геномом статевих клітин ссавців (Бариліак І.Р. і др., 1989; Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., 1989).

Встановлене збільшення постімплантаційної смертності у самок, що тестували самців із забруднених територій, на фоні практично не зміненої кількості місць імплантації, вказує на те, що досить значна частина домінантних леталей індукується за рахунок генних мутацій. Це відповідає існуючим на сьогодні уявленням про те, що мейоз є добрим фільтром за відношенням до структурних аномалій хромосомного апарату (Смирнов В.Г., 1991).

Таким чином, було встановлено підвищення частоти домінантних летальних мутацій в статевих клітинах самців мишей, які утримувались

на забруднених територіях у порівнянні з контрольною групою тварин. Вказані дані свідчать про негативний вплив комплексу забруднювачів довкілля на геном статевих клітин ссавців. Результати цього тесту корелюють з даними попередніх досліджень.

4. Аналіз гонадотоксичності комплексу екологічних факторів для ссавців

Законсмірним етапом дослідження впливу існуючої екологічної ситуації на стан генофонду наступних поколінь є тест на гонадотоксичність.

Встановлено, що у піддослідних ссавців, які перебували у контрольному селі Завій, переважаюча кількість сім'яних каналців (85 - 95%) характеризувалась нормальною пістоюструктурою. Лише в окремих з них виявлені морфологічні зміни у вигляді дисоціації сперматогенного епітелію, утворення "вікон" і окремих ділянок його розшарування в межах гермінативної зони. Місцями ідентифіковані ділянки потовщення і стоншення адлюмінального шару сім'яних каналців. Індекс сперматогенезу у цій групі мишей складав $3,51 \pm 0,06$. Число нормальних сперматогоніїв становило $53,16 \pm 1,18$.

У піддослідних мишей, які утримувались у селі Верхнє, спостерігалось зменшення до 60-80% кількості каналців із нормальним сперматогенезом. Число сім'яних каналців з вираженими структурними порушеннями пропорційно зростало. Так, в різних функціональних шарах сперматогенного епітелію виявлені дифузно розташовані "вікна". Відмічені зони розпушення та злуцнення незрілих форм статевих клітин в просвіт каналця. В окремих досліджуваних каналцях ідентифіковані комбінації вищесписаних структурних змін з наступною десквамацією значних ділянок сперматогенного епітелію. У сім'яниках даної групи тварин зустрічались поодинокі каналці з тотальною відсутністю адлюмінального шару і спустошеними просвітами. У цих мишей відзначалось зниження індексу сперматогенезу до $3,05 \pm 0,15$. Зазначений показник був на 16% менший

($P < 0,05$), ніж у контролі. Середньогрупова кількість нормальних сперматогоніїв ($58,73 \pm 2,00$) навпаки зростала в 1,1 рази; ($P < 0,10$; $Cv < 10\%$).

На гістологічних препаратах сім'яників експериментальних тварин із міста Калуша, виявлені найістотніші морфо-функціональні зміни сперматогенеза. Лише від 45% до 60% канальців мали нормальну будову. Всі інші характеризувались менш або більш яскраво вираженою патологією. Зокрема, у канальцях із збереженим циклом сперматогенезу, відзначали великі ділянки експліації поверхневих шарів статевих клітин. Значна аномалія сім'яних канальців виявлялась у формі розрідження гермінативного епітелію і утворення в ньому значних за площею "вікон". Зросла п'ятма вага заивистих канальців із спустошеними просвітами при повній відсутності шарів диференціації статевих клітин (збережені лише камбіальні елементи) з поодинокими зонами оголення базальної мембрани. Індекс сперматогенезу у вказаній групі тварин складав $2,46 \pm 0,17$, що в 1,5 рази нижче ($P < 0,01$), за контрольний показник. Кількість нормальних сперматогоніїв перевищувала контрольну цифру на 10% ($P < 0,01$) і становила $63,05 \pm 1,79$.

Таким чином, результати проведеного дослідження вказують на виражений гонадотоксичний ефект у соавців, зумовлений комплексом факторів оточуючого середовища в районах з підвищеним рівнем антропогенного забруднення біосфери. Отримані дані корелюють з результатами тесту на домінуючі летальні мутації. Поєднане використання зазначених методів дозволяє оцінити потенційні зміни генофонду досліджуваних об'єктів в майбутньому. Резюмуючи вищевказане, можна допустити, що на територіях, які зазнають впливу забруднювачів довкілля, не виключена небезпека блоку передачі спадкової інформації окремого індивіда (особини) з покоління в покоління і погіршення цього процесу на популяційному рівні. Останнє може істотно змінити генетичну структуру наступних генерацій та збіднити їх генофонд.

5. Характеристика впливу комплексу факторів довкілля на геном соматичних клітин людини

Для оцінки мутагенного навантаження, зумовленого комплексом факторів довкілля, в районах з різною екологічною ситуацією використали комплекс цитогенетичних показників букальних епітеліоцитів дітей 3-х вікових груп: нуклеоллярний індекс (НІ), статевий хроматин (СХ), кількість нормальних (НЯ) та морфологічно змінених (МЯ) ядер та індекс хроматизації (ІХ). Цей вибір зумовлений тим, що кожен з цих параметрів висвітлює певний аспект функціонування геному.

Результати дослідження каріограми у дітей 2-х контрольних сіл вказують на їх суттєві відмінності. У 7-8-ми річних школярів села Грабівка вони були в 1,2 - 1,5 рази достовірно вищими, ніж у їх однолітків із села Завій. У старших дітей ця тенденція посилювалась. Тому за контрольні цифри були прийняті дані, отримані у дітей села Завій, що підтверджується і результатами тестування на А. сера. Найістотніші відхилення від контролю у всіх вікових групах були зафіксовані в учнів ЗШ №5 міста Калуша. НІ, СХ, МЯ перевищували такі у їх ровесників із села Завій в 2,0 - 8,2 рази. ІХ в I-й і II-й вікових групах був більшим за контрольні цифри в 1,1 - 1,6 рази, а в III-й - на стільки ж менший. Досліджувані маркери у 7-8-ми та 10-11-ти річних дітей ЗШ №4 міста Калуша та села Верхнє в межах вікових груп істотно не відрізнялись. Три перші параметри перевищували контрольні цифри на 20-720%, а ІХ був нижчий в 1,1-2,1 рази. У дітей III-ї вікової групи, що проживають на забруднених територіях найнижчі показники були виявлені у міській ЗШ №4. У їх ровесників із села Верхнє проаналізовані дані виявились суттєво вищими за контроль, виняток складав тільки ІХ, який практично дорівнював контрольному значенню. Крім того, була встановлена загальна закономірність, яка полягала у зростанні з віком індивідуальної мінливості досліджуваних показників в межах вікових груп.

Отже, отримані нами результати по комплексному вивченню каріограм клітин букального епітелію дітей 3-х вікових груп вказують на їх зна-

чнуну гетерогенність. На основі проведеного кореляційного і факторного математичного аналізу для встановлення ступеня функціональної активності геному для осіб чоловічої статі нами запропонована наступна формула:

$$ФСГ = \frac{НІ \times НЯ}{СХ \times МЯ} \times IX, \text{ де}$$

НІ- нуклеоларний індекс, СХ- показник "статевий хроматин", НЯ- кількість нормальних ядер, МЯ- кількість морфологічно змінених ядер, IX- індекс хроматизації, ФСГ- функціональний стан геному. Провівши обчислення у вікових групах ми виявили, що зазначений показник характеризується значною варіабельністю ($Cv > 20\%$). Це дозволило нам встановити різні функціональної активності геному: високий, добрий, задовільний, низький. Після введення такої градації з'ясували, що функціональна активність геному у дітей села Завій була високою для всіх вікових груп, у селі Грабівка - доброю (I-а вікова група) і задовільною (II-а і III-я вікові групи). На забруднених територіях функціональна активність геному була низькою (місто Калуш всі вікові групи, село Верхнє - I-а і III-я вікові групи) або задовільною (село Вєохнє - II-а вікова група). Таким чином, встановлено, що при зростанні інтенсивності антропогенного навантаження функціональний стан геному у дітей досліджуваних вікових груп погіршується. Подібні результати корелюють із даними попередньо проведених досліджень та об'єктивно відображують реакцію геному людини на вплив комплексу коенціотиків оточуючого середовища.

На основі результатів батареї проведених тестів, які характеризують генетичну небезпеку комплексу чинників довкілля на територіях з різною екологічною ситуацією, можна зазначити, що мутагенний фон в межах села Завій (контроль) відповідає природному. У другому контрольному населеному пункті (село Грабівка) генетико-екологічна ситуація дещо гірша. Мутагенний фон, існуючий на територіях з підвищеним техногенним навантаженням, зумовлює виражені цитогенетичні та гонадотоксичні ефекти, які значно відрізняються від прийнятих контрольних пара-

метра. За ступенем відмінностей основних цифрових характеристик застосованих тест-методів відносно контрольних даних, можна стверджувати, що у селі Верхнє генетико - токсикологічна ситуація є істотно гіршею, ніж на контрольній території. Інтенсивність мутагенного фоку в місті Калуші - найвища серед усіх досліджуваних населених пунктів.

В наш час соціальні наслідки генетично зумовлених захворювань є суттєвими і можуть бути ще більшими, враховуючи невідоме зростання числа хімічних і фізичних мутагенних факторів, з якими людина контактує на виробництві і в побуті. Тому будь-які роботи, спрямовані на вивчення генетичної небезпеки забруднення довкілля вважаються прискітними.

ВИСНОВКИ

1. Застосований набір методів є адекватною та інформативною тест-системою для вивчення мутагенного фоку на територіях з різною екологічною ситуацією.

2. Комплекс факторів оточуючого середовища в районах з підвищеним рівнем антропогенного забруднення біосфери викликає пошкодження спадкового апарату різних тест - об'єктів :

а) питна вода з населених пунктів, які зазнають впливу шкідливих викидів підприємств АТ "Оріана", збільшує рівень перебудов хромосомного апарату в клітинах апікальної меристеми первинних корінців *A. сера*.

б) ступінь пошкодження спадкового матеріалу в клітинах кісткового мозку експері летальних осавців, які утримувались у забруднених районах, достовірно вищий, ніж в контрольній групі тварин.

3. Зміщення спектру перебудов каріому в бік хроматидних у тест-об'єктів (*A. сера* та *M. musculus*), які визначали рівень мутаційної мінливості в досліджуваних зонах, вказує на хімічну природу існуючого там мутагенного фоку.

4. Виявлена достовірна залежність між інтенсивністю техногенного впливу та числом домінуючих летальних мутацій і гонадотоксичністю у експериментальних самців мишей.

5. Порівняльна характеристика каріограми дітей 3-х вікових груп з 4-х населених пунктів Калуського району свідчить про залежність функціональної активності геному не лише від мутагенного пресінгу ксенобіотиків, але й від вікових та статевих особливостей організму.

6. Запропонований метод оцінки функціонального стану геному за комплексом показників каріограми є об'єктивним критерієм для встановлення генетичної активності факторів довкілля стосовно людини.

7. Результати комплексної генетичної оцінки сумарного впливу екологічних чинників в районах з неоднаковим ступенем забрудненості вказують на різну інтенсивність мутагенного фону, яка відповідає в межах сіл Завій і Грабівка природній, достовірно збільшена на території села Верхне та найвища в місті Калусі.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Розроблений спосіб встановлення функціонального стану геному букальних епітеліоцитів може бути застосований як експрес-метод для з'ясування генетичної активності оточуючого середовища за відношенням до людських популяцій, які піддаються впливу генотоксикантів.

2. Запропонований метод поєднаного визначення цитогенетичних характеристик соматичних клітин людини може бути впроваджений в клінічну практику як генетичний маркер донозологічної діагностики біологічних ефектів.

3. Застосований набір методів дослідження може використовуватись як тест-система для оцінки мутагенного фону на територіях з різною екологічною ситуацією.

Перелік публікацій за темою дисертації

1. Ковальчук Л.Є., Случик В.М., Герашенко С.Б. Оцінка генетичного ефекту дії факторів хімічного виробництва // Цитологія і генетика. - 1994. - Т.28, №3. - С. 41-46.

2. Случик В.М. Оцінка мутагенності оточуючого середовища Букальним тестом: популяційне дослідження // Доповіді Національної академії наук України. - 1995. - №9. - С. 139-141.
3. Случик В.М., Случик І.Й. Еколого-генетична характеристика окремих регіонів Прикарпаття // Галицький лікарський вісник. - 1995. - Т.2, №2. - С. 33-35.
4. Случик В.М. Експериментальна оцінка генетичних наслідків антропогенного забруднення оточуючого середовища комплексом факторів хімічного виробництва // Цитология и генетика. - 1996. - Т. 29, № 5. - С.25-29.
5. Ковальчук Л.Є., Случик В.М. Морфологічні критерії оцінки функціональної активності генома людини в умовах екологічного забруднення // Тези доповідей I-го Національного конгресу анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України. - Івано - Франківськ, 1994. - С.80.
6. Случик В.М. Мутагенність питної води з різних зон Прикарпаття // Тези доповідей 18 - і обласної наукової конференції молодих вчених - медиків. - Івано - Франківськ, 1994. - С.12.
7. Случик В.М. Генетичний аспект екології людини (експериментальне дослідження) // Тези доповідей Міжнародного конгресу молодих вчених українців. - Івано-Франківськ, 1995. - С.50-51
8. Случик В.М. Оцінка генотоксичності доквілля для людини в умовах інтенсивного антропогенного забруднення біосфери // Тези доповідей II-го з'їзду медичних генетиків України. - Львів, 1996. - С.129.
9. Случик В.М. Метод виготовлення давлених препаратів корінців *Allium cepa*: Посвідчення про рац. пропозицію за № 14 / 2174 від 07.04.94. - Івано - Франківськ, 1994.
10. Случик В.М., Мотуляк А.П. Уніфікований цитохімічний метод ідентифікації основних клітинних компонентів в екофоліатизному матеріалі слизової оболонки порожнини рота: Посвідчення про рац. пропозицію за № 52 / 2212 від 21.11.94. - Івано - Франківськ, 1994.

Случик В.М. "Комплексная оценка мутагенного фона, обусловленного малоинтенсивными факторами химического производства (экспериментально - популяционное исследование)".

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 - генетика. Украинский научный гигиенический центр, Киев, 1996.

Защищается рукопись, содержащая результаты изучения мутагенного фона, обусловленного комплексом химических загрязнителей внешней среды, в районах с различным экологическим состоянием. Для этого предложена разработанная автором тест - система, которая включает: 1) оценку генотоксичности питьевой воды ана - телофазным методом клеток апикальной меристемы первичных корешков *Allium* сера; 2) исследование генетической активности окружающей среды на *Mus musculus* (метафазный анализ клеток костного мозга, тест на доминантные летальные мутации в половых клетках самцов мышей); 3) изучение гонадотоксических эффектов суммарного действия загрязнителей среды; 4) определение функционального состояния генома детей 3-х возрастных групп на основании показателей кариограммы клеток буккального эпителия. Указанный набор тест - методов дал возможность объективно оценить интенсивность мутагенного фона в исследованных районах и определить его потенциальную опасность для существующих там геноценозов. Установлено, что комплекс факторов окружающей среды в районах с повышенным уровнем антропогенного загрязнения биосферы вызывает повреждение наследственного аппарата соматических и половых клеток тест - объектов, выраженный гонадотоксический эффект и снижение уровня функциональной активности генома буккальных эпителиоцитов детей 7-8 - ми, 10-11 - ти и 13 - 14 - ти лет.

SLUCHIK V. M. "Complex Estimation of Mutagenic Background Caused by Low Intensive Factors of Chemical Production (Experimental - Population Research).

Theasis for Master's Degree in Biology, Speciality 03.00.15 - Genetics. Ukraine Scientific Hygienic Centre, Kiev, 1996.

A Manuscript is submitted for defence, including the results of mutagenous background study caused by complex chemical pollutants of the environment in areas with different ecological status. For this a test has been suggested, worked out by the author - a system which includes: 1) estimation of drinking water genotoxicity using ana - telophase method of *Allium cepa* primary rootlets apical meristem cells; 2) research of genetic activity of environment on *Mus musculus* (metaphase analysis of bone marrow cells, testing of dominant lethal mutation in male mice otils); 3) study of gonadotoxic effect of summary action of environmental pollutants; 4) determination of functional status of genome of three age groups on the basis of buccal epithelium cells karyogram data. The suggested set of test - methods allowed to evaluate objectively the intensity of mutagenic background of the areas studied and to determine its potential danger for the existing genocenoz there. It has been established that a complex of environmental factors in the areas with high level of antropogenic pollution of biosphere causes violation of hereditary apparatus of test - objects somatic and sexual cells, marked gonadotoxic effect and lowering the level of functional activity of buccal epithelocytes genome in children of 7- 8, 10-11, and 13 - 14 years.

Ключові слова: хімічне виробництво, оцінка мутагенного фону, тест - система.

Зам. 97 тир. 100

Підписано до друку 23.02.1996р., об'єм - 1,0 л. арк.

Відділ оперативної поліграфії ОУС, вул. Панфіловців, 6.

BUCHNIK, V. M. "Complex Evaluation of Mutagenic Background Caused by Low Intensity Factors of Chemical Production (Eisenhütten - Population Research).

Thesis for Master's Degree in Biology, Specialty 03.03.05 - Genetics, Ukraine Scientific Hygiene Centre, Kiev, 1998.

A Manuscript is submitted for defense, including the results of mutagenous background study caused by complex chemical pollutants of the environment in areas with different ecological status. For this a test has been suggested, worked out by the author - a system which included: 1) estimation of drinking water genotoxicity using one - telophase method of *Allium cepa* primary rootlets (colocal micronuclei cells); 2) research of genotoxic activity of environment on *Mus musculus* (metaphase analysis of bone marrow cells, testing of dominant lethal mutation in male mice cells); 3) study of gonadotoxic effect of summary action of environmental pollutants; 4) determination of functional status of condense of 2 weeks age groups on the basis of buccal epithelium cells karyogram data. The suggested set of test - methods allowed to evaluate objectively the intensity of mutagenic background of the areas studied and to determine its potential danger for the existing population there. It has been established that a complex of environmental factors in the studied areas leads to an increase in the level of mutagenic activity of drinking water and to an increase in the level of mutagenic activity of drinking water in children of 7-8, 10-11, and 13-14 years.

Известно, что комплексное воздействие химических загрязнителей окружающей среды приводит к повышению уровня мутагенности факторов окружающей среды. В работе предложено и апробировано комплексное тестирование, позволяющее объективно оценить интенсивность мутагенного фона в исследуемых районах и определить его потенциальную опасность для существующего населения. Установлено, что комплекс факторов окружающей среды в исследуемых районах приводит к повышению уровня мутагенности факторов окружающей среды и к повышению уровня мутагенности факторов окружающей среды у детей в возрасте 7-8, 10-11, и 13-14 лет.

AB 34.175