



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **80356**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/554** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 13665**

(22) Дата подання заявки: **29.11.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **27.05.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **27.05.2013, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Стрижельчик Ніна Георгіївна (UA),  
Воробйова Людмила Іванівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА,  
пл. Свободи, 4, м. Харків, 61022 (UA)**

## (54) СПОСІБ ПОПЕРЕДНЬОГО ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕННОСТІ КСЕНОБІОТИКІВ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ПЛОДЮЧОСТІ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

### (57) Реферат:

Спосіб попереднього визначення мутагенності ксенобіотиків за показниками плодючості *Drosophila melanogaster* шляхом обробки ксенобіотиком самців, їх схрещування з інтактними віргінними самками та подальшого дослідження індукованих летальних мутацій у їх нащадків. Схрещування оброблених ксенобіотиком самців *Drosophila melanogaster* з інтактними віргінними самками проводять індивідуально у співвідношенні 1:1, а наявність мутагенності у досліджуваного ксенобіотика констатують на постембріональній стадії розвитку їх нащадків при достовірному зниженні показників плодючості (порівняно з спонтанним рівнем) за кількістю імаго.

**UA 80356 U**



Корисна модель належить до галузі генетики, а саме індукованого мутагенезу, і може бути використана для короткострокового попереднього тестування, зокрема визначення мутагенної активності різноманітних ксенобіотиків (лікарських препаратів, харчових добавок, шкідливих факторів оточуючого середовища тощо) за показниками плодючості у *Drosophila melanogaster*.

Найближчим аналогом способу, що заявляється, є спосіб обліку домінантних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* [1, 2]. Спосіб полягає в обліку індукованих у статевих клітинах самців *Drosophila melanogaster* домінантних летальних мутацій, які викликають загибель першого покоління нащадків. Для виконання способу використовують оброблених самців лінії дику типу Canton-S, яких схрещують масово з інтактними віргінними самками цієї лінії (по 200 пар). Оцінку домінантних летальних мутацій проводять на стадії яйця (ембріональна летальність). Яйцекладка відбувається на агарові пластинки у чашки Петрі. Через 3-4 години під бінокулярною лупою проводять облік відкладених яєць. Для кожної серії експерименту відбирають не менш ніж 1000 запліднених яєць. Якщо (через 18-20 годин) з яйця виходить личинка, від нього залишається порожня прозора оболонка. В цей час за допомогою бінокулярної лупи проводять пошук та підрахунок нерозвинутих яєць. Прозорими є незапліднені яйця. Матовий окрас яєць характеризує прояв домінантних леталей із ранньою ембріональною загибеллю. Яйця із пізньою ембріональною загибеллю забарвлені у різні кольори від жовтого до коричневого. Окремо підраховують кількість незапліднених яєць, кількість яєць із ранньою ембріональною загибеллю та кількість яєць із пізньою ембріональною загибеллю. Частота ембріональних летальних мутацій на ембріональній стадії розвитку відповідає відношенню кількості яєць з ембріональною загибеллю (вони відрізняються за кольором) до усіх відкладених, запліднених яєць і визначається у відсотках.

Однак у найближчому аналогу схрещення відбувається масово, що унеможлиблює аналіз геному кожного обробленого самця окремо. Для постановки однієї серії експерименту слід мати 900 самців і 600 самок одного віку у тому випадку, якщо обробці хімічними речовинами підлягають самці, та, відповідно, 900 самок і 600 самців при обробці самок, що робить метод неекономічним. Результати експериментів на ембріональній стадії розвитку дрозофіли потребують використання бінокулярної лупи та старанності у підрахунку різних класів яєць - можливі помилки при аналізі та обліку запліднених, незапліднених та нерозвинутих яєць. Все це призводить до невисокої достовірності і експресності тестування, що потребує обліку великої кількості яєць (1000 яєць на кожний варіант досліду) і робить метод неекономічним.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу тестування мутагенної активності ксенобіотиків, у якому за рахунок створення нової сукупності ознак була б підвищена інформативність, економічність, достовірність і експресність тестування.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення мутагенної активності ксенобіотиків шляхом обробки ксенобіотиком самців, їх схрещування з інтактними віргінними самками та подальшого дослідження індукованих летальних мутацій у їх нащадків, який відрізняється тим, що схрещування оброблених ксенобіотиком самців *Drosophila melanogaster* з інтактними віргінними самками проводять індивідуально у співвідношенні 1:1, а наявність мутагенності у досліджуваного ксенобіотика констатують на постембріональній стадії розвитку їх нащадків при достовірному зниженні показників плодючості (порівняно з спонтанним рівнем) за кількістю імаго.

Заявлений спосіб здійснюють шляхом схрещення оброблених самців з інтактними віргінними самками не масово, а індивідуально в окремих пробірках у співвідношенні 1:1. Це дає змогу проаналізувати дію мутагену окремо на геном кожного самця і, таким чином, підвищити інформативність методу і зменшити об'єм експериментального матеріалу, що аналізується. Пробірки з *Drosophila melanogaster* (15-20 пробірок) культивують у термостаті при температурі 24 °C протягом 8-10 діб. У зв'язку з тим, що домінантні летальні мутації (генетичні зміни, що відбуваються в батьківських статевих клітинах і викликають загибель першого покоління нащадків), реалізуються на різних етапах онтогенезу *Drosophila melanogaster* - як на ембріональному (яйця), так і на постембріональному (личинки та лялечки) [2, 3], облік результатів в новому способі проводять не на стадії яйця, а на стадії лялечок. Для цього після виходу личинок на стінки пробірок спостерігають утворення лялечок. На цій стадії розраховують загальну кількість лялечок у дослідній та контрольній групах. Якщо з лялечки виходить імаго (доросла муха), то від неї на стінках пробірок залишається пуста прозора оболонка, яка легко відрізняється від загиблих темних непрозорих нерозвинутих лялечок. Тому після вильоту дорослих мух виконують підрахунок загиблих лялечок. Різниця між загальною кількістю лялечок та кількістю загиблих лялечок відповідає кількості імаго, що вилетіли.

Підвищення частоти індукованих ксенобіотиком летальних мутацій, в свою чергу, призводить до зниження рівня плодючості. Тобто, достовірне зниження показників плодючості у

*Drosophila melanogaster* при дії ксенобіотика вказує на його мутагенність - здатність індукувати підвищення частоти летальних мутацій.

Основним показником мутагенності ксенобіотиків у цьому способі є достовірне зниження рівня плодючості у *Drosophila melanogaster* за кількістю імаго.

У новому способі відпадає необхідність великого масового попереднього розведення *Drosophila melanogaster* (900 самців і 600 самок), що робить метод значно економічним. У новому способі схрещування оброблених самців з самками відбувається індивідуально, а не масово, що дає змогу проаналізувати дію мутагену окремо на геном кожного самця, що робить спосіб більш інформативним. Аналіз індукованої летальності у новому способі відбувається на стадії лялечок, а не на стадії яйця, що унеможливорює появу суб'єктивних помилок при підрахунках великої кількості різних класів яєць - 1000 яєць на кожний варіант досліду (незапліднених, запліднених, загиблих на ранній стадії, різного кольору, які загинули на пізній стадії ембріонального розвитку), що підвищує інформативність та достовірність методу.

Таким чином, сукупність суттєвих ознак способу, що заявляється, дозволяє підвищити інформативність, економічність, достовірність та експресність тестування.

Запропонований спосіб дозволяє значно розширити дослідження активності мутагенів різної хімічної природи, визначити дозові залежності, виявити реальну небезпеку для здоров'я людини використання певних класів хімічних речовин, дослідити безпечні концентрації лікарських препаратів та провести пошук речовин з антимутагенними властивостями.

Спосіб визначення мутагенних властивостей хімічних речовин на *Drosophila melanogaster* служить вирішенню проблеми профілактики індукованого мутагенезу, а саме негативного впливу мутагенів різної природи на структури спадковості людини, сприяє широкому генетичному скринінгу, спрямованому на виявлення й усунення з оточуючого середовища чинників з мутагенними властивостями.

Приклади використання способу, що заявляється:

Приклад 1

Метою дослідження було порівняння двох методів визначення мутагенної активності і таким чином визначення інформативності запропонованого способу.

Аналізували самців *Drosophila melanogaster* лінії Canton-S, що були вирощені на середовищі, в якому концентрація препарату складала 0,6 мг/мл. Мутагенність препарату діоксидину оцінювали: по-перше, за частотою індукованих мутацій (за кількістю ембріональних втрат), по-друге, за зниженням рівня плодючості *Drosophila melanogaster* на постембріональній стадії розвитку (за кількістю імаго). Для статистичної обробки даних використовували критерії  $\chi^2$  та Стюдента t [4]. Одержані результати представлені в таблиці 1.

В контролі частота домінантних летальних мутацій складала  $6,1 \pm 0,4$ , плодючість за кількістю імаго була рівною  $89,9 \pm 4,7$ .

Таблиця 1

Частота домінантних летальних мутацій та рівень показників плодючості у *Drosophila melanogaster* при дії лікарського препарату діоксидину

Концентрація %	Проаналізовано культур	ДЛМ, % $M \pm m$	Кількість імаго $M \pm m$	Значення $\chi^2/t$
Контроль				
-	15	$6,1 \pm 0,4$	$89,9 \pm 4,7$	-
Діоксидін				
0,6	15	$16,1 \pm 1,4$	$57,4 \pm 6,4$	$46,8/4,1$

Аналіз одержаних результатів показав, що препарат діоксидин достовірно підвищує частоту індукованих мутацій порівняно з контролем. Частота летальних мутацій складала  $16,1 \pm 1,4$  ( $\chi^2=46,8$ ;  $p < 0,01$ ).

Підвищення частоти летальних мутацій, в свою чергу, призводило до достовірного зниження показників плодючості у *Drosophila melanogaster* порівняно з контролем за кількістю імаго до  $64,4\%$  -  $57,4 \pm 6,4$  ( $t=4,1$ ;  $p < 0,01$ ). Тобто, достовірне зниження показників плодючості у *Drosophila melanogaster* при дії ксенобіотика вказує на його мутагенність - здатність індукувати підвищення частоти летальних мутацій.

Таким чином, заявлено новий спосіб попереднього визначення мутагенності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster* шляхом оцінювання частоти утворення домінантних летальних мутацій за достовірним зниженням рівня показників плодючості дрозофіли за кількістю імаго.

Спосіб відзначається підвищеною інформативністю, економічністю, достовірністю та експресністю тестування.

Джерела інформації:

- 5 1. Методические указания к определению мутагенной активности химпрепаратов с помощью тестов на дрозофиле. - Львов: ЛГУ, 1984.-16 с.
2. Тихомирова М.М. Генетический анализ. - Л.: Из-во ЛГУ, 1990. - С. 270-271
3. Магерамова Л.М. Изучение закономерностей мутагенного процесса в линиях дрозофилы, дефектных по системе репарации. Автореф. ... кан. биол. наук - М, 1986. - С. 11-12.
- 10 4. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М., 1990. - С. 128-131.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб попереднього визначення мутагенності ксенобіотиків за показниками плодючості *Drosophila melanogaster* шляхом обробки ксенобіотиком самців, їх схрещування з інтактними віргінними самками та подальшого дослідження індукованих летальних мутацій у їх нащадків, який **відрізняється** тим, що схрещування оброблених ксенобіотиком самців *Drosophila melanogaster* з інтактними віргінними самками проводять індивідуально у співвідношенні 1:1, а наявність мутагенності у досліджуваного ксенобіотика констатують на постембріональній стадії розвитку їх нащадків при достовірному зниженні показників плодючості (порівняно з спонтанним рівнем) за кількістю імаго.

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

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