



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **44433** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) КОРОТКОТЕРМІНОВИЙ СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ КАНЦЕРОГЕННОСТІ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН**

1

2

(21) u200901573

(22) 23.02.2009

(24) 12.10.2009

(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.

(72) МАЗЕПА ІВАН ВІЦЕНТОВИЧ, МАЗЕПА МАРІЯ  
АНДРІЙВНА, МАЗЕПА АНДРІЙ ІВАНОВИЧ(73) ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІ-  
ВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНИКА

(57) Короткотерміновий спосіб виявлення канцерогенності хімічних речовин, який полягає у використанні як об'єкта дослідження дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), який **відрізняється** тим, що досліджується комплекс фізико-хімічних властивостей нативної ДНК in vitro (наприклад, стабільність вторинної структури, характеристична в'язкість, оптичні, полярографічні, хемілюмінесцентні, окисно-відновні властивості).

Корисна модель відноситься до області біології, зокрема, біології злосликого росту та токсикології. Спосіб визначення канцерогенності хімічних речовин може бути використана в лабораторіях методико-біологічного профілю, в яких досліджується хімічний склад, фізико-хімічні властивості та функції хімічних речовин бактеріального, рослинного чи тваринного походження та створених в процесі народногосподарської діяльності, в тому числі як лікарські препарати.

Вивчення канцерогенних властивостей хімічних речовин існуючими методами [1,3,4,5] вимагає використання як мінімум 3 видів тварин, окремо самців і самок, дослідження не менше 3-х доз препарату, які вводяться в організм експериментальних тварин на шкірно, підшкірно, внутрішньом'язево та внутрішньоочеревинно, не менше 5-ти разів на тиждень, протягом усього терміну життя тварини (для щурів 30-36 місяців). В процесі експерименту систематично проводяться токсикологічні, цитологічні, гематологічні, цитогенетичні та клінічні спостереження. Така схема вивчення канцерогенних властивостей довготривала в часі, вимагає постійної участі 6-8 співробітників, 950-1000 особин експериментальних тварин, значної витрати фінансів і матеріальних ресурсів.

Основний недолік цих методів полягає в тому, що всі ці затрати можуть виявитися невиправданими, якщо речовина немає канцерогенних властивостей.

Прототипом до пропонованого нами корисної моделі є короткотермінові тести для виявлення мутагенних і канцерогенних хімічних речовин, які запропоновані Міжнародною комісією по захисту від мутагенів і канцерогенів навколишнього сере-

довища для Міжнародної програми по хімічній безпеці [2].

Тести для виявлення мутагенних і канцерогенних властивостей хімічних речовин в цій методиці проводились на бактеріях, дріжджах, вищих рослин, культурі клітин ссавців через позаплановий синтез ДНК в культивованих клітинах.

Спільною ознакою пропонованого авторами способу з прототипом є використання лише одного з досліджуваних об'єктів - дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), але в нашому винаході використаний оригінальний аналітичний напрям - дослідження комплексу фізико-хімічних властивостей ДНК, тоді як у прототипі аналізується одна із функцій ДНК - позаплановий синтез ДНК.

Методи дослідження, матеріали і технічні засоби прототипу високо вартісні, економічно не вигідні і довготривалі, математично непереконливі.

Суть нашого способу полягає в тому, що досліді проводяться на молекулах нативної ДНК in vitro (в пробірці), а канцерогенність хімічних речовин чи її відсутність обґрунтовується шляхом біологічного порівняння та математичного аналізу результатів впливу цих речовин на нативну ДНК здорових тварин.

Акцент на дослідження фізико-хімічних властивостей ДНК для виявлення канцерогенності хімічних речовин зроблений на основі сучасних уявлень про суть ракового процесу, згідно яких рак - це хвороба ДНК на генному рівні.

Завдання корисної моделі - розробити короткотерміновий (експресний) метод виявлення канцерогенних властивостей хімічних речовин в лабораторних умовах (in vitro) без використання експериментальних тварин, мінімальних економічних та матеріальних затратах, використовуючи

(19) **UA** (11) **44433** (13) **U**

порівняльний аналіз фізико-хімічних властивостей основного об'єкту в розвитку злоякісного процесу - дезоксирибонуклеїнову кислоту - ДНК.

При розробці даного способу використані препарати ДНК промислового виробництва спеціалізованими фірмами (Sigma, Merck та отримані авторами методом Мармура в умовах лабораторії кафедри біохімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника з тканин здорових (контрольних) та поражених лейкозним процесом тварин.

Препарати ДНК для вивчення канцерогенних властивостей хімічних речовин повинні бути чисті від домішок та нативні. Дослідження проводяться на ДНК, розчинені в стандартному солевому розчині (ССР).

Концентрації ДНК в досліді використовувалися у відповідності до вимог конкретної методики.

Хімічні речовини, що досліджуються на канцерогенність розчиняються в ССР. Визначення концентрації білка в ДНК проводиться по методу Лоурі, вмісту РНК - орциновим методом.

Хімічні реактиви, що використовуються при виділенні ДНК та виконанні хімічних аналізів були марки ХЧ або ОСЧ.

Порівняльний аналіз фізико-хімічних властивостей ДНК проведений з використанням ультрафіолетового спектрофотометра - Спекорд М400, інфрачервоного спектрофотометра - Спекорд М82, віскозиметра Зімма-Крозерса, квантометричної установки для визначення хемілюмінесценції, полярографа ПА-2, потенціометра М160.

Приклад конкретного виконання тестування хімічних речовин на канцерогенність:

1. Отримання нативних препаратів ДНК з тканин здорових та ушкоджених злоякісним ростом експериментальних тварин;
2. Дослідження чистоти і нативності препаратів ДНК;
3. Вивчення стабільності вторинної структури та характеристичної в'язкості ДНК;
4. Вивчення оптичних, полярографічних хемілюмінесцентних та окисно-відновних властивостей ДНК;
5. Статистичний аналіз та обґрунтування висновку про канцерогенність чи її відсутність у досліджених речовин.

Приклади результатів дослідження чистоти і нативності, температури плавлення і ширини температурного переходу та характеристичної в'язкості препаратів ДНК з тканин нормальним і уражених лейкозним процесом та під впливом канцерогенних речовин представлені в таблиці 1.

При аналізі результатів таблиці можна констатувати, що препарати ДНК з печінки здорових щурів є чисті від домішок, нативні з гіперхромним ефектом  $37,5 \pm 0,3\%$ , температурою плавлення  $86,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , ширина температурного переходу  $8,50 \pm 0,09^\circ\text{C}$ , характеристичною в'язкістю  $68,28 \pm 1,64 \text{ дЛ/г}$ .

В умовах формування лейкозного процесу ДНК містить статистично достовірно більшу домішку білка, РНК, має нижчий гіперхромний ефект і величину температури плавлення, які свідчать про зниження стабільності вторинної структури ДНК.

Під впливом неорганічного та органічного канцерогенів зміни чистоти, нативності та стабільності вторинної структури препаратів ДНК аналогічні тим, які встановлені для препаратів ДНК з лейкозних тварин (таблиця 1).

При аналізі УФ-спектрів препаратів ДНК із печінки здорових щурів встановлено, що пік максимального поглинання локалізований в області 258-260 нм, тоді як мінімальний пік розміщений в області 228-233 нм. Спектрограми препаратів ДНК печінки та пухлини уражених лейкозом щурів по характеру поглинання аналогічні контрольним препаратам ДНК з вираженим гіпсхромним зсувом.

При дії на ДНК здорових щурів неорганічного та органічного канцерогенів зміни в УФ-спектрах аналогічні тим, які констатовані для ДНК лейкозних тварин.

При аналізі інфрачервоних спектрів препаратів ДНК інтактних (здорових) тварин виділено поглинання на частотах  $3900\text{-}2850 \text{ см}^{-1}$  (перша смуга),  $1730\text{-}1515 \text{ см}^{-1}$  (друга смуга) та ряд менш виражених смуг поглинання, локалізованих в інших ділянках спектру ( $1390\text{-}1310$ ,  $1230\text{-}1215$ ,  $1090\text{-}1040 \text{ см}^{-1}$ ).

Порівнюючи характер поглинання препаратів ДНК, отриманих із тканин здорових і поражених лейкозом тварин, записаних в умовах різної відносної вологості (в.в.) показано, що в препаратах ДНК із лейкозних тканин поглинання в першому діапазоні розтягнуто до  $2610 \text{ см}^{-1}$ . Співвідношення величин поглинання цієї смуги при різних значеннях в.в. в принципі зберігають взаємовідношення, які характерні для контрольних зразків.

Друга смуга частот в спектрі з максимумом  $1705 \pm 5 \text{ см}^{-1}$ , характеризуючи процес комплементарного спарювання азотистих основ, є диференціальною характеристикою при оцінці стану вторинної структури ДНК. При злоякісній трансформації тканин в ІЧ-спектрі ДНК в смузі поглинання  $1705 \pm 5 \text{ см}^{-1}$  настають істотні зсуви, що проявляються порушенням структури піку, дифузному збільшенні смуги по ширині і зміщенням піку максимального поглинання до  $1715 \pm 6 \text{ см}^{-1}$ . Залежність смуги  $1705 \text{ см}^{-1}$  від функціонального стану ДНК дозволяє допустити, що виявлені відмінності в характері взаємодії ДНК лейкозних тканин з інфрачервоним випромінюванням можуть бути використані як для оцінки бластомогенної дії хімічних речовин, так і для визначення лікувального ефекту протипухлинних препаратів.

Ефекти неорганічного та органічного канцерогенів на оптичні властивості ДНК здорових тварин аналогічні тим, які виявлені для нуклеїнових кислот лейкозних тварин.

Встановлено, що препарати нативної ДНК із тканин здорових щурів проявляють слабку полярографічну активність, яка описується одним, в окремих випадках, двома слабкими піками, які не перевищують фонову активності.

В препаратах ДНК із тканин лейкозних особин достовірно фіксуються два піки в області від'ємного потенціалу: пік I від 1,05 В до 1,30 В і пік II від 1,45 В до 1,60 В.

Оскільки походження піків в препаратах ДНК пов'язане з активністю вільних груп макромолекул,

які або взагалі не приймали участі в утворенні структурних зв'язків, або утворювались внаслідок їх розриву, то для посилення наявного ефекту в препаратах ДНК була використана теплова денатурація, при якій настає розрив всіх водневих зв'язків.

При аналізі полярограми денатурованих препаратів ДНК із тканин здорових і поражених лейкозом щурів встановлена висока електрохімічна активність, що проявляється чіткими двома піками, характер і локалізація яких нагадує піки для препаратів ДНК із печінки і пухлини лейкозних тварин.

Неорганічний та органічний канцерогени на електрохімічну активність препаратів ДНК печінки здорових щурів викликають зміни аналогічні тим, які спостерігаються на препаратах ДНК печінки і пухлини лейкозних тварин.

Радикали, що утворюються, з пероксиду водню можуть підсилювати хемілюмінісцентні властивості речовин з низькою вільнорадикальною активністю, включаючи нуклеїнові кислоти.

Аналіз ініційованим пероксидом водню хемілюмінісценції ДНК з тканин здорових і уражених лейкозом тварин проведений за наступними показниками - амплітуда спонтанного світіння, амплітуда швидкого спалаху, амплітуда повільного спалаху, світлосума ініційованого пероксидом водню світіння.

При дослідженні препаратів нуклеїнових кислот з тканин щурів показано, що препарати ДНК тканин здорових і уражених лейкозом особин не здатні спонтанно випромінювати світло у вигляді хемілюмінісценції, оскільки рівень світіння їх практично не перевищує фонові показники (табл. 2). При введенні в систему ДНК - розчинник пероксиду водню, що є активним стимулятором вільнорадикальних реакцій, індукуює випромінювання світла у вигляді хемілюмінісценції, в структурі якої чітко виділяється швидкий і повільний спалах. Амплітуда швидкого спалаху, що з'являється після введення пероксиду водню, неоднакова для різних препаратів. Проте, загальною тенденцією в змінах швидкого спалаху є збільшення середніх показників для препаратів ДНК, отриманої з органів щурів, уражених лейкозом.

Після швидкого спалаху настає деякий спад світіння ДНК, який переходить в поступовий розвиток повільного спалаху, параметри якого (амплітуда і світлосума свічення) змінюються з вже відміченою тенденцією для швидкого спалаху.

Оскільки ДНК нездатна до спонтанного випромінювання світла, можна вважати, що відмічене явище хемілюмінісценції ДНК при введенні пероксиду водню обумовлене властивостями останнього. У спеціально проведеному досліді з'ясувалося, що при введенні в систему фосфатний буфер - стандартний сольовий розчин чистого пероксиду водню реєструється тільки швидкий спалах, за яким слідує різкий спад свічення, інтенсивність

якого при досягненні стаціонарного рівня не відрізняється від спонтанної хемілюмінісценції.

При порівнянні показників ОВП тканин здорових і уражених лейкозом особин (табл. 1) видно, що абсолютні величини ОВП ДНК печінки лейкозних щурів достовірно збільшені в порівнянні з контролем, причому величина ОВП зразків ДНК пухлини кількісно перевищує такі показники ДНК печінки контрольних і уражених лейкозом щурів.

В умовах формування лейкозного процесу ОВП ДНК досліджених тканин, маючи позитивний заряд, представляє зразки нуклеїнових кислот системою, в якій переважає окислена форма.

Неорганічний та органічний канцерогени в системі ДНК - розчинник збільшує величину окисленої форми як здорових так і лейкозних тварин.

Використання даного способу для встановлення канцерогенності конкретної хімічної речовини базується на порівнянні результатів впливу цієї речовини на фізико-хімічні (гіперхромний ефект, температуру плавлення, ширину температурного інтервалу, характеристичну в'язкість, оптичні, хемілюмінісцентні, полярографічні, окисно-відновні) властивості ДНК з тканин здорових тварин з результатами змін цих параметрів при формуванні злостісного процесу.

Канцерогенною речовина вважається у тому випадку коли дія її на фізико-хімічні властивості ДНК здорових тварин аналогічна змін, що формуються в процесі злостісного росту.

Література:

1. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных. - Москва - Ленинград, 1980. - 42с.
2. Международная программа по химической безопасности. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. - ВОЗ. - Женева, 1989. - 211с.
3. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test//Mutat. Res. - 1975. - 31. - 347 - 364.
4. Ashby J., De Serres F.J., Draper M., Ishidate M.Jr., Margolin B.N., Matter B.E., Shelby M.D. Evaluation of shortterm tests for carcinogens, Report of the International Programme on Chemical Safety Collaborative Study on in vitro Assays. - Amsterdam? Oxford? New York, Elsevier Science Publishers/ - 1985. - (Progress in Mutation Research, Vol.5).
5. IARC. Mutagenesis assays with bacteria. In: Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. - Lyons. - International Agency for Research on Cancer. - IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 2. - 1980a.-P. 85-106.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика фізико-хімічних властивостей ДНК  
з тканин здорових експериментальних тварин та при дії канцерогенів

| Досліджуваний показник              | Контроль (печінка) | Лейкоз (печінка) | Пухлина     | Неорганічний канцероген | Органічний канцероген |
|-------------------------------------|--------------------|------------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Вміст білка, %                      | 0,49±0,02          | 0,84±0,03*       | 1,09±0,07*  | 0,93±0,04*              | 0,87±0,04*            |
| Вміст ДНК, %                        | 1,04±0,09          | 1,74±0,14*       | 2,14±0,12*  | 1,88±0,05*              | 0,84±0,05*            |
| Гіперхромний ефект, %               | 37,1±0,3           | 33,5±0,3*        | 33,4±0,4*   | 33,9±0,4*               | 33,8±0,5*             |
| Температура плавлення, °C           | 86,2±0,1           | 85,1±0,1*        | 84,9±0,1*   | 84,2±0,2*               | 84,6±0,3*             |
| Ширина температурного інтервалу, °C | 8,50±0,09          | 8,66±0,05        | 9,66±0,14*  | 9,03±0,15*              | 9,01±0,13*            |
| Характеристична, в'язкість, дл/г    | 68,26±1,64         | 53,60±1,29*      | 48,90±1,65* | 51,3±1,49*              | 52,3±1,53*            |
| ОВП, мВ                             | 229,0±1,2          | 264,4±3,2*       | 286,2±3,1*  | 283,1±2,9*              | 281,6±3,0*            |

Таблиця 2

Показники ініційованої H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> хемілюмінесценції (ХЛ)  
препаратів ДНК тканин здорових та вражених лейкозом щурів (M±m, n=8)

| Дослідна тканина | Спонтанна ХЛ Ас,<br>відн. од. | Ініційовані ХЛ |              |   |
|------------------|-------------------------------|----------------|--------------|---|
|                  |                               | h, відн. од.   | H, відн. од. | S H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , імп//10 <sup>3</sup> /10 <sup>3</sup> C |
| Печінка          |                               |                |              |   |
| контроль         | 1,36±0,08                     | 7,41±0,39      | 9,22±1,22    | 1005±22   |
| лейкоз           | 1,26±0,13                     | 11,48±0,90     | 17,46±2,34   | 1704±131  |
|                  | P>0,5                         | p<0,01         | p<0,01       | p<0,01  |
| Пухлина          | 1,14±0,14                     | 10,84±2,12     | 22,30±2,59   | 2202±228  |
|                  | *p>0,2                        | *p>0,1         | *p<0,001     | *p<0,001  |

\*p - у порівнянні з ДНК печінки контрольних щурів