



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **54497** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕХАНІЗМУ ЦИТОГЕНЕТИЧНОЇ ДІЇ ХІМІЧНИХ МУТАГЕНІВ ЗА ХАРАКТЕРОМ ЇХ КОНЦЕНТРАЦІЙНИХ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ

1

2

(21) u201006136

(22) 20.05.2010

(24) 10.11.2010

(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.

(72) ШКАРУПА ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ,
НЕУМЕРЖИЦЬКА ЛЮБОВ ВОЛОДИМИРІВНА,
БАРИЛЯК ІГОР РОМАНОВИЧ, КЛИМЕНКО СЕР-
ГІЙ ВІКТОРОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАУКОВИЙ ЦЕНТР
РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ

НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб визначення механізму цитогенетичної дії хімічних мутагенів за характером їх концентраційних залежностей, що включає теоретичні моделі концентраційних залежностей, який **відрізняється** тим, що на основі даних про концентраційні залежності дії мутагенів визначається прооксидантний та/або алкілюючий тип механізму їх цитогенетичної дії.

Корисна модель належить до медицини, а саме до генотоксикології і може бути використаною для визначення наявності прооксидантної або/та алкілюючої активності генотоксикантів, визначення внеску кожного з цих механізмів у сумарний мутагенний ефект. Актуальність розробки полягає в тому, що знання механізмів цитогенетичної дії генотоксикантів обумовлює можливість вдосконалення ефективності розробки засобів корекції індукованого мутагенезу.

Відомі методи кількісної оцінки індукованих мутагенами вільно-радикальних процесів [1-3] та наявності продуктів алкілювання ДНК [4]. Основним недоліком цих методів є необхідність проведення додаткових, паралельних з генотоксикологічними, біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень, які потребують більших матеріальних витрат та трудомісткості.

В той же час, визначення концентраційних залежностей цитогенетичних ефектів є обов'язковим етапом генотоксикологічних досліджень. Тому запропонована корисна модель дозволяє визначити механізми цитогенетичної дії генотоксикантів та кількісно оцінити внесок окремих механізмів у сумарний мутагенний ефект при плейотропному характері дії без додаткових досліджень, базуючись лише на аналізі концентраційної залежності.

В основу корисної моделі поставлено завдання визначення наявності прооксидантного та/або алкілюючого механізму цитогенетичної дії хімічних мутагенів шляхом застосування відомих матема-

тичних моделей концентраційних залежностей за новим призначенням.

Відомий спосіб визначення „одноцентрових” (активні групи мутагенів, що взаємодіють з одним ланцюгом ДНК в один етап) та „багатоцентрових” (активні групи мутагенів, що взаємодіють з двома ланцюгами ДНК в два етапи) мутагенів [5]. Авторами були запропоновані теоретичні моделі, які можуть адекватно описувати концентраційні залежності цитогенетичної дії алкілюючих мутагенів (моделі № 1-3). За відповідністю концентраційних залежностей певній моделі та характером поклітинного розподілу аберацій (відповідність від'ємному біноміальному теоретичному розподілу з параметрами $m=1$, та $m=2$) визначають „одноцентровий” чи „багатоцентровий” характер цитогенетичної дії мутагенів. Недоліками зазначеного методу є: певна невідповідність значень параметру m в ряді експериментальних досліджень [6], „одноцентровість” мутагену мітоміцину С, для якого показана взаємодія з двома ланцюгами ДНК [7], що суперечить принципам запропонованої авторами моделі, а також застосування способу лише для алкілюючих мутагенів, що не дає можливості визначити прооксидантну компоненту.

За результатами наших більш поглиблених досліджень - в основі відмінності механізмів дії „багатоцентрових” мутагенів лежить значна активація ними вільнорадикальних процесів, що і обумовлює двохетапний характер концентраційної залежності.

(19) **UA** (11) **54497** (13) **U**

Заявлений винахід здійснюється таким чином - в тест системах (Allium-тест, метафазний аналіз аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини) визначають концентраційні залежності цитогенетичних ефектів генотоксикантів. Проводять аналіз відповідності експериментальних значень теоретичним моделям, рішенням яких є функції:

модель № 1: $\rho = 1 - e^{-(\alpha+KC)}$ (експонента)

модель № 2: $\rho = 1 - e^{-(\alpha+KC)^2}$ (S-подібна крива)

модель № 3: $\rho = C^2/(\alpha+KC^2)$ (гіпербола)

де ρ - частка аберантних клітин (%), C - концентрація мутагену (мг/л, М), K - коефіцієнт пропорційності, який визначає ефективність мутагену (для моделі № 2, $K = 2K_1^2$), α - коефіцієнт, що вказує на зв'язок з очікуваним спонтанним рівнем аберантних клітин.

Визначають якій з вказаних моделей найкраще відповідають експериментально визначені концентраційні залежності та параметри моделі.

У разі кращої відповідності моделі № 1, механізм цитогенетичної дії - прооксидантний;

У разі кращої відповідності моделі № 2, механізм цитогенетичної дії - алкілюючий (можлива незначна індукція АФК не впливає при цьому на характер концентраційних залежностей);

У разі відповідності моделям № 2 та № 1 - поряд з алкілюючим механізмом наявність прооксидантних ефектів, що впливають на характер концентраційної залежності. Порівняльний внесок кожного з механізмів визначається за величиною коефіцієнту мутагенної ефективності K в кожній з моделей.

У разі відповідності моделям № 3 та № 1 - поряд з алкілюючим механізмом наявність значних прооксидантних ефектів.

Приклад 1. В Allium-тесті досліджували концентраційну залежність цитогенетичної дії прооксидантного мутагену діоксидину. Як видно з таблиці 1, найбільш адекватно (за критерієм χ^2) ця залежність описується моделлю № 1, визначений коефіцієнт мутагенної ефективності при цьому: $K = 0,049$.

Таблиця 1

Результати аналізу дії різних концентрацій діоксидину на клітини апікальної меристеми Allium сера L.

Концентрація, $\cdot 10^{-3}$ ММ (мг/л)	Вибірка	Кількість аберантних ана-телофаз, %			
		Експериментальна	Очікувана по моделі		
			№ 1	№2	№3
0,446 (0,1)	1760	2,44	8,50	8,23	2,41
2,232 (0,5)	1470	5,44	8,66	8,34	13,00
4,464 (1)	2176	6,07	8,87	8,47	15,07
22,32 (5)	1404	8,76	10,53	9,57	15,88
44,64 (10)	3089	12,30	12,57	11,02	15,91
89,3 (20)	2916	21,81	16,49	14,16	15,921
133,9 (30)	2114	24,17	20,24	17,59	15,923
178,6 (40)	1746	29,55	23,81	21,26	15,924
223,2 (50)	2090	27,75	27,23	25,13	15,924
267,9 (60)	1026	32,75	30,49	29,15	15,925
312,5 (70)	792	34,47	33,61	33,28	15,925
357,1 (80)	512	34,77	36,58	37,47	15,925
401,8 (90)	640	37,50	39,42	44,67	15,925
446,4 (100)	513	39,77	42,14	49,86	15,925
Статистичні показники та параметри моделей					
χ^2			11,07	28,067	167,16
n (кількість ступенів свободи)			13	13	13
P			0,6043	0,0089	<0,0001
K (коефіцієнт мутагенної ефективності)			0,0049	$2,0 \cdot 10^{-6}$	4,09

Відомо, що діоксидин є виключно прооксидантним мутагеном γ -типу (шляхи репарації індукованих ним та γ -опроміненням аналогічні) [6]. Таким чином, відповідність концентраційних залежностей моделі № 1 свідчить про прооксидантний механізм цитогенетичної дії.

Приклад 2. В Allium-тесті досліджували концентраційну залежність цитогенетичної дії алкілюючого мутагену мітоміцину С. Як видно з таблиці 2, найбільш адекватно (за критерієм χ^2) ця залежність описується моделлю № 2, визначений коефіцієнт мутагенної ефективності при цьому: $K = 1,09$.

Таблиця 2

Результати аналізу дії різних концентрацій мітоміцину C на клітини апікальної меристеми *Allium* сера L.

Концентрація, $\cdot 10^{-3}$ мМ	Вибірка	Кількість аберантних ана-телофаз, %			
		Експериментальна	Очікувана по моделі		
			№ 1	№ 2	№ 3
0,001495 (0,0005)	1604	3,37	-0,02	8,48	3,18
0,002991 (0,001)	1224	5,39	0,39	8,66	8,63
0,01495 (0,005)	1637	11,12	5,09	10,19	19,06
0,02991 (0,01)	1278	15,73	10,65	12,24	19,81
0,07477 (0,025)	1460	21,99	25,45	19,22	20,034
0,1495 (0,05)	1419	40,59	44,87	32,71	20,066
0,2991 (0,1)	842	62,35	69,86	60,57	20,074
0,598 (0,2)	850	92,09	90,99	93,08	20,076
Статистичні показники та параметри моделей					
χ^2	-	-	74,61	6,486	373,91
df	-	-	7	7	7
P	-	-	<0,0001	0,484	0,0001
K (коефіцієнт мутагенної ефективності)			3,319	1,094	1,075

Таким чином, відповідність концентраційних залежностей моделі № 2 свідчить про алкілюючий механізм цитогенетичної дії.

Приклад 3. В *Allium*-тесті досліджували концентраційну залежність цитогенетичної дії мутагену тіофосфаміду. Як видно з таблиці 3, ця залежність краще відповідає моделі № 2, але адекватно описується й моделлю № 1. Визначені коефіцієнти мутагенної ефективності при цьому: K = 0,23, мо-

дель № 2 та K = 0,14, модель № 1. Показано, що алкілюючий ефект тіофосфаміду супроводжується активацією вільно-радикальних процесів [8]. Таким чином, відповідність концентраційних залежностей моделям № 2 та № 1 вказує на наявність, поряд з алкілюючими, прооксидантних ефектів. Внесок алкілюючого механізму визначається коефіцієнтом в моделі № 2: K = 0,23, а прооксидантного - коефіцієнтом в моделі № 1: K = 0,14.

Таблиця 3

Результати аналізу дії різних концентрацій тіофосфаміду на клітини апікальної меристеми *Allium* сера L.

Концентрація, $\cdot 10^{-3}$ мМ (мг/л)	Вибірка	Кількість аберантних ана-телофаз, %			
		Експериментальна	Очікувана по моделі		
			№ 1	№ 2	№ 3
0,0528 (0,01)	1689	3,02	3,09	7,60	2,81
0,106 (0,02)	1651	4,18	3,26	7,70	7,07
0,528 (0,1)	1140	7,63	4,56	8,20	13,76
1,106 (0,2)	1677	9,96	6,16	8,81	14,18
2,64 (0,5)	1663	14,25	10,81	10,71	14,302
5,28 (1,0)	1748	21,40	18,05	14,18	14,320
10,57 (2,0)	1248	25,56	30,82	22,13	14,324
26,4 (5,0)	1213	49,38	58,38	49,56	14,325
52,8 (10,0)	604	83,94	82,16	84,80	14,326
Статистичні показники та параметри моделей					
χ^2	-	-	8,71	9,94	444,56
df	-	-	8	8	8
P	-	-	0,367	0,270	<0,0001
K (коефіцієнт мутагенної ефективності)			0,14	0,23	1,81

Приклад 4. За даними літератури, концентраційна залежність цитогенетичної дії алкілюючого мутагену фотрину в культурі лімфоцитів периферичної крові людини адекватно описується моделлю № 3 та № 1 [5]. Показано, що поряд алкілюючою дією, для фотрину характерна значна

прооксидантна активність, яка, при певних концентраціях, перевищує таку для діоксидину [8]. Таким чином, відповідність концентраційних залежностей моделям № 3 та № 1 вказує на наявність значної прооксидантної активності поряд з алкілюючим механізмом дії.

Використані джерела інформації:

1. Сидоркин В.Г., Старикова М.А., Пылаева С.И., Гординская Н.А. Способ оценки способности плазмы крови продуцировать свободные радикалы. Патент РФ № 2088928 (G01N33/49), № заявки: 93054243/14, дата подачи заявки: 06.12.1993, дата публикации: 27.08.1997, заявитель: Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии.

2. Молчанов А.В., Галактионова Л.П. Способ определения прооксидантной активности биологического материала. Патент РФ № 2146053 (G01N33/53, G01N33/49, G01N33/84), № заявки: 97101937/14, дата подачи заявки: 10.02.1997, дата публикации: 27.02.2000, заявитель: Алтайский государственный медицинский университет.

3. Азнабаева Л.Ф., Кильсенбаева Ф.А., Арефьева Н.А. Способ определения пероксидазной активности в биологических жидкостях. Патент РФ № 2180114 (G01N33/50), № заявки: 2000125850/14, дата подачи заявки: 13.10.2000, дата публикации: 27.02.2002, заявитель: Башкирский государственный медицинский университет.

4. Волощук Т.П., Пацковский Ю.В., Потопальс-

кий А.И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот этиленимином и его производными. IV. Алкилирование гомополинуклеотидов и ДНК //Биоорганическая химия. - 1999. - Т.25, № 6. - С. 464-473.

5. Бочков Н.П. Наследственность человека и мутагены внешней среды /Н.П. Бочков, А.Н. Чеботарев. - М.: Медицина, 1989. - 270 с.

6. Яковенко К.Н. Цитогенетический эффект производных этиленимина в культуре лимфоцитов человека. Сообщение 2. Математическая модель действия разных концентраций дипина и фотрина /К.Н. Яковенко, С.А. Ажаев, Н.П. Бочков //Генетика. - 1974. - Т. 10, № 11. - С. 138-146.

7. Beretta G. Mitomicin C. Pharmacology and Clinical Uses /G. Beretta, G. Cartei, T. Giralddi. - Turin: Minerva Medica Publishers. - 1990. - 180 p.

8. Середенин С.Б. Разработка фармакологических средств защиты генетических структур на основе изучения клеточных механизмов индукции мутаций /С.Б. Середенин, А.Д. Дурнев //Клеточные механизмы реализации фармакологического эффекта. М. - 1990. - С. 273-296.