



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 72641

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 01392**

(22) Дата подання заявки: **10.02.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.08.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.08.2012, Бюл.№ 16**

(72) Винахідник(и):

Черниченко Ігор Олексійович (UA),

Баленко Ніна Василівна (UA),

Осташ Ольга Михайлівна (UA),

Винарська Олена Іванівна (UA)

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ГІГІЄНИ ТА МЕДИЧНОЇ ЕКОЛОГІЇ ІМ. О.М.
МАРЗЄЄВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Попудренка, 50, м. Київ-94, 02660 (UA)**

(54) СПОСІБ ТЕСТУВАННЯ КАНЦЕРОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ХІМІЧНИХ СПОЛУК

(57) Реферат:

Спосіб тестування канцерогенних властивостей хімічних сполук, що включає дослідження in vivo мутагенності шляхом аналізу частоти клітин з мікроядрами у різних органах експериментальних тварин. Паралельно додатково визначають імуносупресію з наступним встановленням кореляційних зв'язків і ступеня їх достовірності між показниками мутагенності та імуносупресії.

UA 72641 U

Корисна модель належить до дослідження біологічних матеріалів, зокрема для тестування канцерогенних властивостей хімічних сполук, і може бути використана для оцінки їх небезпеки.

Відомим є спосіб тестування *in vivo* на двох видах ссавців (щурах, мишах) канцерогенних властивостей пестицидів, який передбачає використання "батареї" тестів, що включає короткостроковий тест (КСТ) для виявлення генотоксичності та органів-мішеней за показниками передмутаційних змін - кількості одностранных розривів ДНК в органах та середньострокові тести для реєстрації передпухлинних утворень у різних органах-мішенях як ознак канцерогенної активності. Довготривалість способу складає близько восьми місяців (Див. Недопитанська Н.М. і співав. Нові підходи до вивчення канцерогенної активності пестицидів // Довкілля та здоров'я.- 1997. - № 2. - С.16-17).

До недоліків цього способу належать неможливість за допомогою КСТ визначення мутаційної активності сполуки у зв'язку з тим, що більшість розривів ДНК відновлюється, а також відносна довготривалість.

Найбільш близьким до заявленого за технічною суттю є спосіб прогнозування канцерогенних властивостей досліджуваних хімічних сполук шляхом вивчення *in vivo* на гризунах (щурах, мишах) мутагенної активності та органів-мішеней за допомогою аналізу частоти клітин з МЯ в різних органах (Див. Сычева и соавт. Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств факторов окружающей среды // Гигиена и санитария.- 2003.-№6.-С.87-91).

Недоліком наведеного способу є неможливість точного визначення за заданими параметрами мутагенних канцерогенних сполук, оскільки мутагенні властивості не завжди є ознакою канцерогенності.

В основу корисної моделі поставлено задачу визначити комплекс ранніх показників змін в організмі, які можна використати як критерії для тестування канцерогенних властивостей хімічних сполук, що дозволяє більш оперативно і достовірно отримати результати.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає дослідження *in vivo* мутагенності шляхом аналізу частоти клітин з мікроядрами (МЯ) у різних органах експериментальних тварин, згідно з корисною моделлю, паралельно додатково визначають імуносупресію з наступним встановленням кореляційних зв'язків і ступеня їх достовірності між показниками мутагенності та імуносупресії.

Зростання показників мутагенності - частоти клітин з МЯ та супресії імунної системи і наявність достовірних кореляційних зв'язків між ними свідчать про те, що досліджувана сполука є канцерогенною з генотоксичним механізмом дії.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Досліджувану сполуку вводять в організм експериментальних тварин шляхами, які є адекватними шляхам потрапляння її в організм людини у натурних умовах у дозах, що відповідають 0,1 та 0,01 величини LD_{50} . Тварин умертвляють за добу після останнього введення канцерогена і відбирають біоматеріал для досліджень. Мутагенний ефект досліджують шляхом аналізу частоти клітин з МЯ в основних органах, де найчастіше можна очікувати розвиток пухлин, згідно із методичними рекомендаціями "Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом" - М., 2001. Одночасно відбирають кров для вивчення та оцінки стану різних компонентів імунного захисту організму. Оцінку мутагенного ефекту та імунологічних змін проводять із застосуванням звичайних статистичних методів та t-критерію Стьюдента. Зв'язок та його достовірність між показниками мутагенності та імуносупресії визначають за допомогою методів кореляційного аналізу.

Приклад здійснення способу.

Експеримент проводили на білих аутбредних мишах. Як модельний генотоксичний канцероген було взято бенз(а)пірен (БП). Канцероген вводили двома способами: шляхом на шкірних апплікацій та перорально внутрішньошлунково через зонд. Нашкірні апплікації БП здійснювали мікропіпеткою-дозатором у вигляді ацетонового розчину об'ємом 0,02 мл 5 разів на тиждень загальноприйнятим в експериментальній онкології методом. Разові дози БП складали 10,5 мкг, 2,5 мкг. Одній групі мишей (контроль розчинника) наносили апплікації ацетону по 0,02 мл. Перорально БП вводили у триетиленгліколі (ТЕГ) 1 раз на тиждень. Разова доза БП складала 0,1 мг, об'єм розчину на одне введення - 0,1 мл. Мишам контрольної групи вводили тільки розчинник ТЕГ в об'ємі 0,1 мл. Мишам інтактного контролю речовини не вводили. Відбір біоматеріалу для дослідження цитогенетичного ефекту (органи) та імунологічних змін в організмі (кров) здійснювали одночасно. Для дослідження МЯ брали тільки органи-мішені - шкіру із місця нанесення апплікацій та передшлунок при пероральному введенні. Із кожної групи тварин по 6-7 мишей умертвляли на 8, 22, 90 день від початку досліду, за добу після останнього

застосування канцерогена. Органи фіксували у 10 % забуференому розчині нейтрального формаліну. Аналіз частоти клітин з МЯ здійснювали на зашифрованих суспензійних препаратах, аналізуючи по 1000 клітин шкіри та передшлунка кожної миші. Суспензійні препарати виготовляли наступним чином. Шматочок шкіри, зафіксований у розчині формаліну промивали у дистильованій воді, після чого піддавали лужній дисоціації шляхом обробки 50 % КОН протягом 13-14 годин при температурі 18-19 °С у центрифужній пробірці. Зливали розчин лугу і додавали у пробірку дистильовану воду. Шматочок шкіри виймали та закріплювали спеціальною голкою на пінопластовій поверхні і обережно зіскоблювали скальпелем клітини епітелію шкіри у мікропробірку з дистильованою водою і витримували 2 години при температурі 20-21 °С. Потім проводили суспензування обережним піпетуванням суміші. Подальше центрифугування здійснювали протягом 9-10 хв. при 1500 об/хв. Процедуру повторювали двічі. Рідину над осадом видаляли. Краплю суспензії наносили на поверхню предметного скла для виготовлення мазків із подальшим їх фарбуванням. Фарбування препаратів проводили так само, як і суспензійних препаратів із передшлунка, які виготовляли та фарбували згідно із методичними рекомендаціями "Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом" - М., 2001. Імунологічні зміни в організмі визначали за показниками вмісту лейкоцитів у периферичній крові та їх клітинного складу, числа Т- і В-лімфоцитів, природних клітин - кілерів, а також реакцій дегрануляції базофілів, гальмування розпластування макрофагів, фагоцитозу, преципітації циркулюючих імунних комплексів розчином поліетиленгліколю. Оцінку отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих у медико-біологічних дослідженнях статистичних методів та t-критерію Стьюдента. Зв'язок між показниками мутагенності та імуносупресії визначали за методом рангової кореляції Пірсона. Результати дослідження наведено у таблиці.

Таблиця

Показники генотоксичності та імуносупресії у ранні терміни досліду за нашкірних аплікацій та перорального введення білим аутбредним мишам різних доз БП

Шляхи введення	Речовини	Разова доза	Показники, терміни			
			Число клітин з МЯ/1000		Т-лімфоцити, %	
			8 день	22 день	8 день	22 день
Нашкірні аплікації	БП	10,5** мкг	2,50* ±0,029	5,83*±0,31	32,78±2,16	26,33* ±0,61
	БП	2,1** мкг	1,50* ±0,29	3,00* ±0,26	32,83±2,12	26,83* ±0,87
	Ацетон	0,02 мкл	0,25±0,25	0,40±0,24	32,67±2,15	22,17* ±0,91
Перорально	БП	0,1** мл	1,33* ±0,21	2,83* ±0,31	31,16±2,32	17,83* ±0,70
	ТЕГ	0,1 мл	0,50±0,29	0,50±0,34	32,16±2,32	25,83* ±0,60
Контроль	-	-	0,33±0,21	0,33±0,21	29,83±5,78	30,00±0,55

Примітка. * - достовірні зміни показників порівняно із контролем;

** - наявність достовірних кореляційних зв'язків між показниками частоти клітин з МЯ і кількістю Т-лімфоцитів на 22 день досліду; коефіцієнти кореляції становили: для БП 10,5 мкг, $r=(-0,87)$ $P<0,01$; 2,1 мкг, $r=(-0,89)$ $P<0,01$; для 0,1 мг, $r=(-0,79)$ $P<0,05$.

Показники свідчать про спільні для обох шляхів введення БП закономірності:

- зростання частоти стрічання клітин з МЯ із збільшенням разової та сумарної доз БП;
- можливість визначення супресивного впливу канцерогена на імунну систему у ранній період дії протягом 3-4 тижнів;
- найбільш чутливий ранній показник імуносупресії - Т-клітинна ланка імунітету, що проявляється зниженням відносної кількості Т-лімфоцитів;
- поєднаність і односпрямованість відносно канцерогенезу мутагенного ефекту (зростання частоти клітин з МЯ) і імуносупресії та наявність достовірного зворотного кореляційного зв'язку між ними.

Спосіб дозволяє визначити комплекс показників мутагенності та імуносупресії, наявність достовірних кореляційних зв'язків між ними у ранні терміни дії БП, протягом 3-4 тижнів, який є раннім інформативним критерієм канцерогенних властивостей хімічних сполук та може бути використаним для оперативного і точного тестування та скринінгу хімічних канцерогенів із генотоксичними механізмами дії.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб тестування канцерогенних властивостей хімічних сполук, що включає дослідження in vivo мутагенності шляхом аналізу частоти клітин з мікроядрами у різних органах експериментальних тварин, який **відрізняється** тим, що паралельно додатково визначають імуносупресію з наступним встановленням кореляційних зв'язків і ступеня їх достовірності між показниками мутагенності та імуносупресії.

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

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