



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90336** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/554 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 13929	(72) Винахідник(и): Страшнюк Володимир Юрійович (UA), Шакіна Любов Олександрівна (UA), Скоробагатько Дар'я Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 02.12.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.05.2014	(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА, пл. Свободи, 4, м. Харків, 61022 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.05.2014, Бюл.№ 10	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ХІМІЧНОГО АБО ФІЗИЧНОГО ЧИННИКА

(57) Реферат:

Спосіб визначення генотоксичної дії хімічного або фізичного чинника, що передбачає дослідження частоти виникнення мутацій у *Drosophila melanogaster* Meig., причому як тесторну лінії використовують генетично нестабільну лінію Var (смужковидні очі), в якій після дії на самок хімічного або фізичного чинника у наступному поколінні досліджують частоту нерівного кросинговеру за мутаціями ознаки Var.

UA 90336 U

Корисна модель належить до галузі генетичної безпеки і може бути використана у сучасних методах визначення генотоксичної дії хімічного або фізичного фактора.

Відомий спосіб визначення генотоксичної (мутагенної) дії зовнішнього чинника, що передбачає облік рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій (РЗСЛМ) у дрозофіли [1, С. 260-261], у якому самців лінії дикого типу, що зазнали впливу досліджуваного фактора, схрещують з самками тесторної лінії Мьоллер-5 і через покоління визначають рівень РЗСЛМ за часткою культур, у яких відсутні самці дикого типу, від загальної кількості проаналізованих культур.

Недоліком означеного способу є його значна тривалість, трудомісткість і необхідність проведення великої кількості схрещувань.

Відомий спосіб визначення мутагенної дії зовнішнього чинника [1, С. 270-271], що вибраний за сукупністю ознак найближчим аналогом до запропонованої моделі, передбачає дослідження частоти виникнення мутацій у *Drosophila melanogaster* Meig.

Недоліками зазначеного способу, що базується на визначенні частоти індукованих у статевих клітинах дрозофіли домінантних летальних мутацій (ДЛМ) за показником ембріональної смертності, є непевність у тому, що ембріональна смертність викликана саме домінантними летелями, а також можливі помилки при ідентифікації незапліднених яєць та ранніх ембріональних леталей.

Технічною задачею корисної моделі є створення високоефективного та, водночас, простого і зручного у застосуванні способу визначення генотоксичної дії хімічного або фізичного чинника, що забезпечує достовірність не менше 95 %.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі [1, С. 270-271], вибраному за найближчий аналог, що передбачає дослідження частоти виникнення мутацій у *Drosophila melanogaster* Meig., згідно з корисною моделлю, як тесторну лінію використовують генетично нестабільну лінію Bar (смужковидні очі), в якій після дії на самок хімічного або фізичного чинника у наступному поколінні досліджують частоту нерівного кросинговеру за мутаціями ознаки Bar.

Причинно-наслідковий зв'язок проявляється у тому, що генотоксична дія зовнішнього хімічного або фізичного чинника призводить до порушення взаємодії гомологічних хромосом під час мейозу, внаслідок чого збільшується частота нереципрокної гомологічної рекомбінації у локусі Bar, результатом чого є збільшення частоти мутацій ознаки Bar.

Вибір лінії Bar (смужковидні очі) як тесторної обумовлений явищем нереципрокної гомологічної рекомбінації, що спричиняє її генетичну нестабільність [2]. Як відомо, у дрозофіли близько 80 % так званих спонтанних мутацій виникає під впливом нестабільних елементів геному [3]. Мутація Bar (B) (локалізація 1-57.0) - тандемна дуплікація локусу 16A1-16A7, фенотипово проявляється в редукції очей до вузької вертикальної смужки з кількістю фасеток біля 90 у самців та 70 у самок, на відміну від нормальної кількості біля 740 і 780 фасеток для самців і самок, відповідно [2]. Внаслідок рекомбінації між неправильно спарованими копіями генів в межах дуплікації Bar утворюються нереципрокні рекомбінантні хромосоми з трьома (Double Bar (B^D), або Ultrabar (BB)) і однією (реверсія до нормального фенотипу) копіями гену відповідно. Особини з нереципрокними рекомбінантними хромосомами мають мутантний (B/+, BB/Y, BB/B) і нормальний (+/Y) фенотип. Самки B/+ мають біля 350 фасеток і виямку на передньому краї ока. У мутантів Double Bar (BB) кількість очних фасеток зменшена приблизно до 45 у гетерозигот BB/B і до 25 у гемізигот BB/Y.

Частоту мутацій за локусом Bar визначають за відношенням кількості мутантних подій +/Y, B/+, BB/Y, BB/B до загальної кількості проаналізованих особин лінії Bar.

Технічним результатом корисної моделі є створення способу визначення генотоксичної дії зовнішнього хімічного або фізичного чинника, у якому передбачено застосування впливу досліджуваного чинника на особин генетично нестабільної лінії *Drosophila melanogaster* та аналіз у наступному поколінні частоти мутацій за нестабільною фенотиповою ознакою.

Спосіб здійснюють таким чином:

Дія фізичного чи хімічного чинника може застосовуватися на різних стадіях онтогенезу дрозофіли: у ембріональний період, на стадії личинки, лялечки чи імаго. Хімічна речовина може додаватися у живильне середовище для личинок або (для жиророзчинних речовин) застосовуватися шляхом аплікації. У наступному поколінні, що розвивалося у стандартних умовах, досліджують частоту мутацій за локусом Bar. Висновок про наявність чи відсутність мутагенної дії досліджуваного хімічного або фізичного чинника роблять на основі порівняння частоти мутацій у досліді відносно контролю, у якому подібного впливу не застосовували.

Даний спосіб дозволяє визначити генотоксичну або можливу генопротекторну дію хімічного чи фізичного фактора, порівняти дію різних доз того чи іншого фактора, сумісну дію двох чи декількох факторів.

Приклади використання способу, що заявляється:

Приклад 1.

- Метою дослідження було визначити за допомогою запропонованого способу генотоксичну дію різних концентрацій етанолу. Личинки лінії Bar дрозофіли розвивалися у стандартному цукрово-дріжджовому середовищі з додаванням етанолу у об'ємних концентраціях 5,0 та 10,0 %. У наступному поколінні на стадії імаго досліджували частоту мутацій ознаки Bar, спричиненої нереципрокною рекомбінацією у локусі Bar. Отримані дані представлені у табл. 1.

Таблиця 1

Частота мутацій ознаки Bar внаслідок нереципрокної рекомбінації в лінії Bar *Drosophila melanogaster* при дії різних об'ємних концентрацій етанолу

Варіанти досліджу		Частота нерівного кросинговеру
Контроль, %	0,0	$1,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
Концентрація етанолу, %	5,0	$2,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,7 \cdot 10^{-3}$
Концентрація етанолу, %	10,0	$3,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,9 \cdot 10^{-3*}$

* - рівень значущості - $p < 0,05$

- Отримані результати свідчать про зростання мутагенної дії етанолу за показником частоти мутацій ознаки Bar у дрозофіли при збільшенні концентрації діючої речовини. З вірогідністю більше 95 % у об'ємній концентрації 10,0 % етанол спричиняє генотоксичну дію на геном дрозофіли.

Приклад 2.

- Метою дослідження було визначити за допомогою запропонованого способу генотоксичну дію різних доз γ -опромінення. Досліди проводили на базі лінійного прискорювача КУТ-1, розробленого і створеного в ННЦ Харківський фізико-технічний інститут [4]. Опромінювалися віргінні самки імаго. Застосовували поглинені дози 8 і 25 Гр. У наступному поколінні на стадії імаго досліджували частоту мутацій ознаки Bar, спричиненої нереципрокною рекомбінацією у локусі Bar. Отримані дані представлені у табл. 2.

- Отримані результати свідчать про зростання мутагенної дії γ -опромінення за показником частоти мутацій ознаки Bar у дрозофіли при збільшенні поглиненої дози. З вірогідністю більше 99,9 % при поглиненій дозі 25 Гр γ -опромінення спричиняє генотоксичну дію на геном дрозофіли, збільшуючи частоту нерівного кросинговеру на два порядки.

Таблиця 2

Частота мутацій ознаки Bar внаслідок нереципрокної рекомбінації в лінії Bar *Drosophila melanogaster* при дії різних поглинених доз γ -опромінення

Варіанти досліджу		Частота нерівного кросинговеру
Контроль, Гр	0	$0,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$
Поглинена доза, Гр	8	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
Поглинена доза, Гр	25	$1,4 \cdot 10^{-1} \pm 0,3 \cdot 10^{-1*}$

* - рівень значущості - $p < 0,001$

Джерела інформації:

1. Тихомирова М. М. Генетический анализ. - Л.: издательство ЛГУ, 1990. - 280 с.
2. Sturtevant A. H. The effects of unequal crossing over at the bar locus in *Drosophila*//Genetics. - 1925. - 10. - P. 117-147.
3. Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот. Ч. 1. Структура, механизмы перемещения и роль подвижных элементов в поддержании целостности хромосом // СОЖ. - 1998. - № 8. - С. 8-14.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб визначення генотоксичної дії хімічного або фізичного чинника, що передбачає дослідження частоти виникнення мутацій у *Drosophila melanogaster* Meig., який **відрізняється** тим, що як тесторну лінію використовують генетично нестабільну лінію Bar (смужковидні очі), в

якій після дії на самок хімічного або фізичного чинника у наступному поколінні досліджують частоту нерівного кросинговеру за мутаціями ознаки Ваг.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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