



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **76136**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/554 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 06805**

(22) Дата подання заявки: **05.06.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.12.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.12.2012, Бюл.№ 24**

(72) Винахідник(и):

**Стрижельчик Ніна Георгіївна (UA),
Яковлева Лариса Василівна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК

(57) Реферат:

Спосіб оцінки мутагенної активності харчових добавок включає етап попередньої оцінки *in vitro* з використанням як тест-об'єктів бактеріальних клітин з подальшим обліком їх генних мутацій і соматичних клітин ссавців та етап кінцевої кількісної оцінки *in vivo* як тест-об'єктів клітин кісткового мозку ссавців з подальшим обліком у них хромосомних аберацій і статевих клітинах ссавців з обліком домінуючих летальних мутацій. Етап попередньої оцінки включає як тест-об'єкт культуру лімфоцитів людини з подальшим обліком у ній хромосомних аберацій. Перед етапом кінцевої кількісної оцінки в системі *in vivo* мутагенну активність додатково визначають в короткострокових тестах на *Drosophila melanogaster* шляхом обліку рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій та домінуючих летальних мутацій.

UA 76136 U

Корисна модель належить до фармакологічної генетики, а саме індукованого мутагенезу і призначена для оцінки мутагенної активності харчових добавок. Профілактика індукованого мутагенезу базується на широкому генетичному скринінгу, спрямованому на виявлення й усунення з харчової промисловості речовин з мутагенними властивостями. У зв'язку з тим, що до цього часу в Україні не існує способу тестування харчових добавок на мутагенність, вирішення такої проблеми є актуальним.

Специфічність біологічного об'єкта, на якому вивчається дія мутагену, а також специфічність мутаційного процесу, індукованого чинником, призводять до необхідності застосування декількох тест-систем - створення інтегральних схем, які включають набір (батареї) тестів з використанням різних тест-об'єктів, здатних виявляти як первинні пошкодження ДНК і генні мутації, так і хромосомні аберації в системах *in vitro* та *in vivo*.

Найближчим аналогом способу, що заявляється, є спосіб для оцінки мутагенних властивостей нових лікарських препаратів [1], який складається з двох етапів:

I етап - попередня оцінка мутагенної активності. Основними методами є напівкількісний метод обліку мутацій на мікроорганізмах (тест Еймса) та мікроядерний тест на клітинах кісткового мозку лабораторних тварин;

II етап - кінцева кількісна оцінка мутагенної активності фармакологічних препаратів. Основні методи: метафазний аналіз аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку ссавців (або у клітинах зародків тварин на постімплантаційних стадіях розвитку) та облік домінантних летальних мутацій у статевих клітинах самців лабораторних тварин.

Недоліком існуючого способу можна вважати використання таких методів досліджень, частина з яких є економічно недоцільною. Виникає необхідність використання більш дешевих короткострокових методів.

Численні дослідження засвідчують, що *Drosophila melanogaster* належить до високоінформативних та економічних тест-об'єктів. На дрозофілі можна вивчати весь спектр генетичних змін як у соматичних, так і статевих клітинах [2, 3].

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу тестування мутагенної активності харчових добавок, в якому за рахунок використання методів оцінки мутагенності на *Drosophila melanogaster* створюються нова сукупність ознак, що призводить до підвищення економічності, інформативності та експресності тестування.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі оцінки мутагенної активності харчових добавок, який включає етап попередньої оцінки *in vitro* з використанням як тест-об'єктів бактеріальних клітин з подальшим обліком їх генних мутацій і соматичних клітин ссавців та етап кінцевої кількісної оцінки як тест-об'єктів клітин кісткового мозку ссавців з подальшим обліком у них хромосомних аберацій і статевих клітинах ссавців з обліком домінантних летальних мутацій, на відміну від прототипу згідно з корисною моделлю передбачено, що етап попередньої оцінки включає як тест-об'єкт культуру лімфоцитів людини з подальшим обліком у ній хромосомних аберацій, а перед етапом кінцевої кількісної оцінки в системі *in vivo* мутагенну активність визначають в додаткових короткострокових тестах на *Drosophila melanogaster* шляхом обліку рецесивних, зчеплених зі статтю, летальних мутацій та домінантних летальних мутацій.

Запропоновано спосіб, який також складається з двох етапів включає:

1 етап - попередня оцінка мутагенної активності у системі *in vitro*. Основними методами оцінки є: напівкількісний метод обліку генних мутацій на мікроорганізмах (тест Еймса) та облік хромосомних аберацій у культурі лімфоцитів людини;

II етап - оцінки у системі *in vivo*, в яку входять відбіркові дослідження на *Drosophila melanogaster* (облік генних мутацій - рецесивних, зчеплених зі статтю, летальних мутацій і облік домінантних летальних мутацій у статевих клітинах) та кінцева кількісна оцінка мутагенної активності. Основні методи: метафазний аналіз аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку ссавців та облік домінантних летальних мутацій у статевих клітинах самців лабораторних тварин.

У новому способі набір методів, які використовуються, дозволяє поетапно вирішувати дві основні задачі: виявлення потенційних мутагенів (тест Еймса і короткострокові тести на *Drosophila melanogaster*) та визначення їх генетичної активності - небезпечності (кількісна оцінка в дослідях на ссавцях).

Використання на 1-му етапі замість мікроядерного тесту (який виконується на клітинах кісткового мозку тварин) методу обліку хромосомних аберацій у культурі лімфоцитів людини дає змогу вивчити вплив мутагенів безпосередньо на геном людини.

Значне підвищення інформативності запропонованого способу відбувається за рахунок застосування тесту з обліку рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій у дослідженнях

на *Drosophila melanogaster*, який дозволяє провести виявлення здатності індукції генних мутацій у таких речовин, як азосполуки, азобарвники та інші чинники, які не проявляють активності в тесті Еймса, що призводить до одержання "помилково негативних" результатів.

Окрім того, застосування методу обліку домінантних летальних мутацій на *Drosophila melanogaster* значно підвищує економічність та експресність нового способу. Відбувається значне підвищення пропускної спроможності способу тестування. Виникає можливість проведення великої кількості дешевих дослідів на *Drosophila melanogaster* з метою виявлення мутагенів для подальшої кількісної оцінки їх активності на ссавцях.

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

Запропонований спосіб дозволяє дослідити мутагенну активність харчових добавок, визначити дозові залежності, виявити реальну небезпеку для здоров'я людини використання певних класів хімічних речовин, дослідити безпечні концентрації та провести пошук речовин з антимутагенними властивостями.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1

Метою дослідження було визнання за допомогою запропонованого способу мутагенної активності харчової добавки червоного крохмалю (ЧК). Дослідження проводили на двох етапах. На 1-му етапі в системі *in vitro* оцінювали здатність речовин індукувати генні мутації в тесті Еймса та хромосомні аберації (ХА) в культурі лімфоцитів людини. На 11-му етапі виконували дослідження на *Drosophila melanogaster* - визначали здатність речовин викликати рецесивні, зчеплені зі статтю, летальні мутації (РЗСЛМ) й домінантні летальні мутації (ДЛМ) у статевих клітинах дрозофіли і хромосомні аберації (ХА) у соматичних клітинах кісткового мозку та домінантні летальні мутації (ДЛМ) у статевих клітинах мишей. Одержані результати представлені в таблиці.

Таблиця

Результати оцінки за допомогою заявленого способу тестування рівня мутагенної активності харчової добавки червоного крохмалю

Методи, речовини		Максим. виражений рівень мутаген, ефекту (в балах)	Максим. виражен. індекс мутаген. Активності	Рівень мутаген. безпеки
1	2	3	4	5
IN VITRO				
1	Тест-Еймса <i>Salmonella</i> /мікросоми:			
	червоний крохмаль 5 СХ;	0	0, III	-
2	Облік ХА у культурі лімфоцитів людини;			
	червоний крохмаль 5 СХ;	I*	I, III	B
IN VIVO				
3	Облік РЗСДМ у дрозофіли;			
	червоний крохмаль 5 СХ;	2*	2, III	B
4	Облік ДЛМ у статевих клітинах дрозофіли;			
	червоний крохмаль 5 СХ;	2*	2, III	B
5	Облік ХА у клітинах кісткового мозку мишей;			
	червоний крохмаль 5 СХ;	0	0, III	-
6	Облік ДЛМ у статевих клітинах з мишей;			
	червоний крохмаль 5 СХ;	2*	2, III	B

Примітки:

Бал 0 - відсутність мутагенного ефекту;

Бал 1 - слабкий мутагенний ефект;

Бал 2 - середній мутагенний ефект;

Ранг III - перевищення добової дози в 15 та більше разів;

B - третій рівень мутагенної безпеки для людини - "слабкий мутаген";

* - $P < 0,01$ (по відношенню до контролю).

Результати досліджу свідчать, що харчова добавка - червоний крохмаль проявляє мутагенний ефект. Завдяки використанню нового способу встановлено, що мутагенний ефект червоного крохмалю (ЧК) залежав як від особливостей його біотрансформації, так і від можливостей трансформуючих систем різних тест-об'єктів. Так, ЧК в концентраціях 0,1-1000,0 мг/чашку не виявляв мутагенної активності у тесті Еймса-Salmonella/мікросоми ссавців, тобто призводив до одержання "помилково негативних" результатів. Проте, у досліджах на *Drosophila melanogaster* ЧК індукував генні мутації - рецесивні, зчеплені зі статтю летальні мутації і домінантні летальні мутації при обробці дорослих самців (500 мг/мл), а при дії на личинки (у концентраціях 0,3; 0,4; 0,6 %) дозозалежним чином підвищував частоту ембріональної і постембріональної летальності в F₁ та достовірно знижував показники плодючості дрозофіли за кількістю лялечок і імаго. Цитогенетичні ефекти ЧК мають ряд особливостей в системах *in vitro* та *in vivo*. В культурі лімфоцитів людини ЧК (8; 80; 800 мг/мл) дозозалежним чином підвищував частоту ХА. Виявлена висока позитивна кореляційна залежність мутагенного ефекту від концентрації - "доза-ефект".

В системі *in vivo* на ссавцях показана висока тканинна специфічність ушкоджуючої дії ЧК - встановлена більша чутливість статевих клітин до впливу барвника, ніж соматичних. При пероральному введенні самцям дозою 1,0 г/кг протягом 10 днів ЧК достовірно підвищував частоту ДЛМ у статевих клітинах мишей, але не індукував змін частоти ХА у клітинах кісткового мозку.

Порівняльний аналіз показав, що максимально виражений рівень мутагенного ефекту ЧК у різних тестах був різним і коливався від 0 до 2 балів. У тесті Еймса відзначена відсутність мутагенного ефекту (бал 0). При аналізі цитогенетичної активності ЧК встановлено слабкий ефект у культурі лімфоцитів людини (бал 1).

Найвищий рівень мутагенного ефекту (середній ефект) відзначено в тестах з обліку: РЗСЛМ і ДЛМ у дрозофіли та ДЛМ у статевих клітинах мишей (бал 2). Дози, за яких відбувалися достовірні зміни більш ніж в 15 разів перевищують рекомендовані добові дози барвників для харчової промисловості. За рівнем генетичної небезпеки для людини ЧК відносяться до категорії "слабкий мутаген".

Встановлено, що найбільш інформативним тестом для оцінки мутагенності сполук, які містять канцерогенні угруповання азо-структури, є облік рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій і домінантних летальних мутацій у дрозофіли та облік домінантних летальних мутацій у зародкових клітинах мишей у хронічному експерименті.

Таким чином, заявлено новий спосіб визначення мутагенної активності харчових добавок, в якому за рахунок використання набору методів, якій запропоновано, відбувається поетапне вирішення двох основних задач: виявлення потенційних мутагенів (тест Еймса і короткострокові тести на *Drosophila melanogaster*) та визначення їх генетичної активності - небезпечності (кількісна оцінка в досліджах на ссавцях).

Спосіб відрізняється підвищеною інформативністю економічністю, достовірністю та експресністю тестування.

Джерела інформації:

1. Оцінка мутагенних властивостей нових лікарських засобів / Барилляк І.Р., Неумержицька Л.В., Дуган О.М., Кривошеїн Ю.С., Дорошенко Г.Г., Логодир Т.А. // Доклінічне вивчення нешкідливості лікарських засобів (методичні рекомендації). - К.: ФК МОЗ України, 2000. - С. 166-182.

2. Тихомирова М.М. Генетический анализ. - Л.: Изд-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.-16 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки мутагенної активності харчових добавок, що включає етап попередньої оцінки *in vitro* з використанням як тест-об'єктів бактеріальних клітин з подальшим обліком їх генних мутацій і соматичних клітин ссавців та етап кінцевої кількісної оцінки *in vivo* як тест-об'єктів клітин кісткового мозку ссавців з подальшим обліком у них хромосомних аберацій і статевих клітинах ссавців з обліком домінантних летальних мутацій, який **відрізняється** тим, що етап попередньої оцінки включає як тест-об'єкт культуру лімфоцитів людини з подальшим обліком у ній хромосомних аберацій, а перед етапом кінцевої кількісної оцінки в системі *in vivo* мутагенну активність додатково визначають в короткострокових тестах на *Drosophila melanogaster* шляхом обліку рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій та домінантних летальних мутацій.

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