



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78836** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/554** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 04917</b>	(72) Винахідник(и): <b>Стрижельчик Ніна Георгіївна (UA), Яковлева Лариса Василівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>19.04.2012</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.04.2013</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.04.2013, Бюл.№ 7</b>	

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ КСЕНОБІОТИКІВ НА DROSOPHILA MELANOGASTER

### (57) Реферат:

Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*, у якому індуковані домінантні летальні мутації визначають на постембріональній стадії розвитку дрозофіли за рівнем постембріональних втрат.

UA 78836 U



Корисна модель належить до галузі фармакологічної генетики, а саме індукованого мутагенезу, і може бути використана у сучасних схемах для короткострокового тестування, зокрема, визначення мутагенної активності різноманітних ксенобіотиків (лікарських препаратів, харчових добавок, шкідливих факторів оточуючого середовища, тощо).

Відомим способом тестування на мутагенність з використанням як тест-об'єкта *Drosophila melanogaster* є спосіб обліку рецесивних, зчеплених зі статтю, летальних мутацій (РЗСЛМ), який полягає в обліку індукованих в Х-хромосомах самців дрозофіли дикого типу летальних мутацій [1]. Для виконання способу використовують оброблених самців лінії дикого типу (Canton-S), яких схрещують з самками тестової лінії Меллер-5. Рецесивні, зчеплені зі статтю, летальні мутації передаються через самок F<sub>1</sub> самцям другого покоління F<sub>2</sub>, які не доживають до стадії імаго. В кожному варіанті досліду необхідно проаналізувати не менш ніж 1000 пробірок дрозофіли. Пробірки, в яких відсутні самці дикого типу, є "летальні". Рівень РЗСЛМ розраховують за співвідношенням летальних культур до загальної кількості проаналізованих.

Недоліком відомого способу є те, що для його виконання необхідна наявність спеціальної тестової лінії Меллер-5. При виконанні методу можливо лише виявлення здатності речовин індукувати генні мутації, а не хромосомні аберації. Недоліком методу є його неекономічність - необхідно проаналізувати 1000 яєць на кожен варіант досліду. Невисока достовірність і експресність тестування, обумовлена дуже низьким спонтанним рівнем РЗСЛМ у дрозофіли, який складає від 0,1 до 0,5 %. Середній показник - 0,26 %.

Найближчим аналогом способу, що заявляється, є спосіб обліку домінантних летальних мутацій у дрозофіли [2]. Спосіб полягає в обліку, індукованих у статевих клітинах самців дрозофіли домінантних летальних мутацій, які викликають загибель першого покоління нащадків. Для виконання способу використовують оброблених самців лінії дикого типу Canton-S, яких схрещують масово з інтактними віргінними самками цієї лінії (по 200 пар). Оцінку домінантних летальних мутацій проводять на стадії яйця (ембріональна летальність). Яйцекладка відбувається на агарові пластинки у чашки Петрі. Через 3-4 години під бінокулярною лупою проводять облік відкладених яєць. Для кожної серії експерименту відбирають не менш ніж 1000 запліднених яєць. Якщо (через 18-20 годин) з яйця виходить личинка, від нього залишається порожня прозора оболонка. В цей час за допомогою бінокулярної лупи проводять пошук та підрахунок нерозвинутих яєць. Прозорими є незапліднені яйця. Матовий окрас яєць характеризує прояв домінантних леталей із ранньою ембріональною загибеллю. Яйця із пізньою ембріональною загибеллю забарвлені у різні кольори від жовтого до, коричневого. Окремо підраховують кількість незапліднених яєць, кількість яєць із ранньою ембріональною загибеллю та кількість яєць із пізньою ембріональною загибеллю.

Ембріональна летальність визначається за відношенням кількості яєць, що не розвинулись, до загальної кількості відкладених запліднених яєць.

Однак у найближчому аналогові схрещення відбувається масово, що унеможлиблює аналіз геному кожного обробленого самця окремо. Для постановки однієї серії експерименту слід мати 900 самців і 600 самок одного віку у тому випадку, якщо обробці хімічними речовинами підлягають самці, та, відповідно, 900 самок і 600 самців при обробці самок, що робить метод неекономічним. Результати експериментів на ембріональній стадії розвитку дрозофіли потребують використання бінокулярної лупи та старанності у підрахунку різних класів яєць - можливі помилки при аналізі та обліку запліднених, незапліднених, та нерозвинутих яєць. Все це призводить до невисокої достовірності і експресності тестування, що потребує обліку великої кількості яєць (1000 яєць на кожний варіант досліду) і робить метод неекономічним.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу тестування мутагенної активності хімічних речовин, у якому за рахунок створення нової сукупності ознак була б підвищена інформативність, економічність, достовірність і експресність тестування.

Для вирішення поставленої задачі у способі визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster* шляхом обробки ксенобіотиком самців, їх схрещуванням з інтактними віргінними самками та подальшого обліку індукованих домінантних летальних мутацій у їх нащадків, згідно з корисною моделлю, домінантні летальні мутації визначають на постембріональній стадії розвитку (стадії лялечок) за рівнем постембріональних втрат, а наявність мутагенної активності констатують при достовірному перевищенні частоти домінантних леталей над спонтанним рівнем більш ніж у 2 рази.

Корисною моделлю передбачено, що оброблених ксенобіотиком самців схрещують з віргінними самками індивідуально у співвідношенні 1:1.

Заявлений спосіб здійснюють шляхом визначення домінантних летальних мутацій у дрозофіли, який полягає в обліку індукованих хімічними речовинами мутацій у статевих клітинах дрозофіли, згідно з корисною моделлю, виконують додаткові підрахунки частоти індукованих

домінантних летальних мутацій. З цією метою оброблених самців схрещують з інтактними віргінними самками не масово, а індивідуально в окремих пробірках у співвідношенні 1:1. Це дає змогу проаналізувати дію мутагену окремо на геном кожного самця і, таким чином, підвищити інформативність методу і зменшити об'єм експериментального матеріалу, що аналізується.

5 Пробірки з дрозофілами (15-20 пробірок) культивують у термостаті при температурі 24 °C протягом 8-10 діб. В зв'язку з тим, що домінантні летальні мутації - генетичні зміни, що відбуваються в батьківських статевих клітинах і викликають загибель першого покоління нащадків, реалізуються на різних етапах онтогенезу дрозофіли - як на ембріональному (яйця), так і на постембріональному (личинки та лялечки) [2, 3], в новому способі підрахунок домінантних летальних мутацій пропонується проводити не на стадії яйця, а на стадії лялечок. Для цього після виходу личинок на стінки пробірок спостерігають утворення лялечок. На цій стадії розраховують загальну кількість лялечок у дослідній та контрольній групах. Якщо з лялечки виходить імаго (доросла муха), то від неї на стінках пробірок залишається пуста прозора оболонка, яка легко відрізняється від загиблих темних непрозорих лялечок. Тому після закінчення виходу імаго виконують підрахунок загиблих лялечок.

Основним показником рівня домінантних летальних мутацій є частота постембріональних втрат, яка оцінюється за відношенням кількості загиблих лялечок до загальної кількості лялечок за формулою:

$$\text{ДЛМ} = 3\text{Л} / (\text{ЖЛ} + 3\text{Л}) \times 100, \%$$

де: 3Л - кількість загиблих лялечок;

ЖЛ - кількість живих лялечок.

Про мутагенну активність хімічних речовин судять по перевищенню мутагенного ефекту над спонтанним рівнем більш ніж у 2 рази.

У новому способі відпадає необхідність великого масового попереднього розведення дрозофіли (900 самців і 600 самок), що робить метод значно економічним. У новому способі схрещування оброблених самців з самками відбувається індивідуально, а не масово, що дає змогу проаналізувати дію мутагену окремо на геном кожного самця, що робить спосіб більш інформативним. Аналіз індукованих домінантних летальних мутацій у новому способі відбувається на стадії лялечок, а не на стадії яйця, що унеможливує появу суб'єктивних помилок при підрахунках великої кількості різних класів яєць - 1000 яєць на кожний варіант досліду (незапліднених, запліднених, загиблих на ранній стадії, різного кольору, що загинули на пізній стадії ембріонального розвитку), що підвищує інформативність та достовірність методу.

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

Запропонований спосіб дозволяє дослідити активність мутагенів різної хімічної природи, визначити дозові залежності, виявити реальну небезпеку для здоров'я людини використання певних класів хімічних речовин, дослідити безпечні концентрації лікарських препаратів та провести пошук речовин з антимуагенними властивостями.

Спосіб визначення мутагенних властивостей хімічних речовин на *Drosophila melanogaster* служить вирішенню проблеми профілактики індукованого мутагенезу, а саме запобіганню негативного впливу мутагенів різної природи на структури спадковості людини, сприяє широкому генетичному скринінгу, спрямованому на виявлення й усунення з оточуючого середовища чинників з мутагенними властивостями.

Приклади використання способу, що заявляється:

Приклад 1

Для дослідження було визначення за допомогою запропонованого способу мутагенної дії нового антрахінонового барвника синього желатину - здатності індукувати домінантні летальні мутації на постембріональній стадії розвитку дрозофіли.

Аналізували самців *Drosophila melanogaster* лінії Canton-S, що були вирощені на середовищі, в якому концентрація барвника складала 0,6 %.

Мутагенний ефект оцінювали по індукції домінантних летальних мутацій на постембріональній стадії розвитку дрозофіли - на стадії лялечки. Для статистичної обробки даних використовували критерій  $\chi^2$  [4]. Одержані результати представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Рівень постембріональних летальних мутацій у статевих клітинах *Drosophila melanogaster* при впливі антрахінонового барвника синього желатину

Концентрація	Проаналізовано культур дрізофіли	Частота	Значення	
		ПЕЛМ*, % M±m	$\chi^2$	P
Контроль				
-	15	3,0±0,56	-	-
Синій желатин				
0,6	15	9,01±1,4	44,3	< 0,01

Примітка. \* ПЕЛМ - постембріональні летальні мутації

У контролі частота постембріональної летальності складала -3,0±0,56 %. При впливі синього желатину встановлено достовірне підвищення (у 3 рази) частоти постембріональної летальності

5 -9,01±1,4 %  $\chi^2_{3} = 44,3$ ;  $p < 0,01$ ).

Таким чином, проведені експериментальні дослідження дозволили, за допомогою запропонованого способу, встановити мутагенну дію нового антрахінонового барвника синього желатину. Виявлено, що синій желатин здатен достовірно підвищувати частоту домінантних летальних мутацій на постембріональній стадії розвитку дрізофіли.

10 Приклад 2

Для дослідження було визначення, за допомогою запропонованого способу, мутагенної дії нового азобарвника червоного крохмалю - здатності індукувати домінантні летальні мутації на постембріональній стадії розвитку дрізофіли в залежності від величини концентрації.

15 Аналізували самців *Drosophila melanogaster* лінії Canton-S, що були вирощені на середовищі, в якому концентрація барвника складала 0,3; 0,4 і 0,6 %. Мутагенний ефект оцінювали по індукції домінантних летальних мутацій на постембріональній стадії розвитку дрізофіли - на стадії лялечок. Для статистичної обробки даних використовували критерій  $\chi^2$  [4]. Одержані результати представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Рівень постембріональних летальних мутацій у статевих клітинах *Drosophila melanogaster* при впливі різних концентрацій червоного крохмалю

Концентрація	Проаналізовано культур дрозофіли	Частота ПЕЛМ*, % M±m	Значення	
			$\chi^2$	P
Контроль				
-	15	3,27±0,58	-	-
Червоний крохмаль				
0,3	15	3,70±0,47	0,43	>0,05
Червоний крохмаль				
0,4	15	4,4±0,50	0,13	>0,05
Червоний крохмаль				
0.6	15	10.2±1.70	58.9	< 0.01

Примітка. \* ПЕЛМ - постембріональні летальні мутації

20

У контролі частота постембріональної летальності складала - 3,27±0,58 %. При впливі червоного крохмалю виявлені дозозалежні зміни постембріональної летальності - 3,70±0,47; 4,4±0,50; 10,2±1,70 %, відповідно.

25 Коефіцієнт кореляційної залежності поміж частотою постембріональної летальності та концентрацією червоного крохмалю у середовищі складав + 0,827 ( $p < 0,01$ ). Статистично

значуща різниця (у 3 рази) між дослідом і контролем установлена при концентрації барвника 0,6 % ( $\chi^2_3 = 58,9$ ;  $p < 0,01$ ). Одержані результати представлені в таблиці.

Проведені експериментальні дослідження дозволили, за допомогою запропонованого способу, встановити достовірну залежність мутагенного ефекту нового азобарвника червоного крохмалю від дози.

Таким чином, заявлено новий спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster* шляхом оцінювання частоти утворення домінантних летальних мутацій на постембріональній стадії розвитку дослідних комах.

Спосіб відзначається підвищеною інформативністю економічністю, достовірністю та експресністю тестування.

Джерела інформації:

1. Методические рекомендации по проверке мутагенных свойств у новых лекарственных препаратов (Издание официальное). - М.: ФК МЗ СССР, 1981. - С. 24-31.

2. Тихомирова М.М. Генетический анализ. - Л.: Из-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. - С. 11-12.

4. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М., 1990. - С. 128-131.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster* шляхом обробки ксенобіотиком самців, їх схрещування з інтактними віргінними самками та подальшого дослідження індукованих домінантних летальних мутацій у їх нащадків, який **відрізняється** тим, що індуковані домінантні летальні мутації визначають на постембріональній стадії розвитку дрозофіли за рівнем постембріональних втрат, а наявність мутагенної активності ксенобіотиків констатують при достовірному перевищенні частоти домінантних летальних мутацій над спонтанним рівнем більш, ніж у 2 рази.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що оброблених самців схрещують з віргінними самками індивідуально у співвідношенні 1:1.

---

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

---

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