

УДК 577.175.14

З.М. Бияшева*, К.А. Рысжан, А.Б. Казыханова, А.Б. Керимкулова

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: zarbiya@mail.ru

Использование тест-систем *Dr. melanogaster* при доклиническом испытании фармакологического средства

Проведено исследование мутагенного эффекта разрабатываемого и еще незапатентованного лекарственного препарата гроссгемин в тест-системе *Dr. melanogaster* L. Обнаружено, что 5% раствор фармакологического средства гроссгемин при пероральном введении в имаго дрозофилы не оказывают мутагенного влияния. Было проведено сравнение двух тест-систем дрозофилы: сцепленных X-хромосом и Меллер-5. Выявлена идентичность результатов по изучению мутагенной активности гроссгемина при использовании этих методик.

Ключевые слова: дрозофила, фармакологическое средство, летальные мутации, сцепленные X-хромосомы.

З.М. Бияшева, К.А. Рысжан, А.Б. Казыханова, А.Б. Керимкулова

Dr. melanogaster тест-жүйелерін фармакологиялық дәрілерді клиника алды тексеруде пайдалану

Бұл жұмыста *Dr. melanogaster* Меллер-5 және біріктірілген X-хромосомасы тест-жүйесіндегі гроссгемин дәрілік препараттың мутагендік эффектісін зерттеулері көрсетілген. Қолданған екі әдістің нәтижелері сәйкес: гроссгеминнің 5% коцентрациясы ауыз арқылы енгізу жағдайында мутагенді эффектісі байқалынбады.

Түйін сөздер: дрозофила, өлімге ұшырайтын мутация, біріктірілген X-хромосомасы, Меллер-5, гемизигота.

Z.M. Biyasheva, K.A. Ryszhan, A.B. Kazykhanova, A.B. Kerimkulova

The preclinical testing of the pharmacological remedy in the *Dr. melanogaster* test systems

This article presents dates by studying mutagenicity of the pharmacological remedy – grossgemin in test systems *Drosophila meksnjgaster*: Muller-5 and X-linked chromosomes. Results of the using these methods are identical. The grossgemin mutagenic activity in concentrations of 5% in oral administration are not detected.

Keywords: drosophila, lethal mutation, solderad X-chromosomes, Meller-5, gemizigota.

Среди комплекса проблем, связанных с загрязнением окружающей среды, одной из актуальных и вместе с тем наименее разработанной является проблема оценки потенциальной генетической опасности химических соединений, в том числе фармакологических препаратов. Развитие цивилизации превратило лекарственные средства в существенный компонент среды обитания человека. Отечественными и зарубежными исследованиями установлено наличие мутагенной активности у части широко распространенных лекарств – психотропных, антибактериальных и др. Очевидно, что использование таких препаратов может привести к увеличению мутационного

груза в человеческой популяции, к увеличению наследуемых генетических патологий и лежат в основе злокачественных новообразований [1].

В результате возникло новое направление в генетике – генетическая токсикология, основной задачей которой является создание методологии для классификации химических соединений по степени их потенциальной генетической опасности для человека, с целью осуществления различных регулирующих действий, направленных на предотвращение или уменьшение возможных генетических последствий воздействия химических соединений [2].

Вторая проблема генетической токсикологии связана с необходимостью постоянного

тестирования большого числа химических соединений. Невозможность экспериментального исследования генетической активности химических соединений на человеке обусловила создание для этих целей различных тест-систем, среди которых широко применяются тест-системы с использованием плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Эта мушка выбрана объектом ряда генетических схем поскольку это один из наиболее хорошо изученных модельных видов генетики высших организмов. Около 2/3 генов, ответственных за болезни у человека, обнаруживают гомологию в геноме дрозофилы. Основные биохимические процессы в клетках *Drosophila melanogaster* и млекопитающих идентичны. К достоинствам можно так же отнести тот факт, что у *Drosophila melanogaster* в процессе метаболизма происходит микросомальная активация веществ, в результате чего промутагены могут превращаться в мутагены. Это позволяет выявлять скрытые мутагены, которые приобретают генотоксичность в процессе метаболизма. Тесты с использованием *Drosophila melanogaster* рекомендованы ВОЗ для исследования мутагенной и токсической активности антропогенных ксенобиотиков и фармакологических средств [2, 3].

Материалы и методы

Для проверки генетической активности гроссгемина мы использовали методику сцепленных X-хромосом, позволяющую обнаружить видимые мутации в половой хромосоме у самцов дикого типа *Drosophila melanogaster* и Меллер-5 для индукции летальных мутаций. Так как лекарство еще не получило патент, состав гроссгемина, созданного на основе экстрактов из артишока, не приведен. Гроссгемин вводили перорально вместе с кормом в концентрациях, рекомендованных производителями.

Результаты и их обсуждение

Проводили скрещивание самцов линии *normal* (дикий тип) с самками генетической линии, содержащей сцепленные X-хромосомы, которые были маркированы рецессивными генами *yellow* (желтое тело) и *white* (белые глаза). Самцы обрабатывались перорально препаратом, затем их скрещивали с самками тест-линии – *double yellow* (рисунок 1). Воздействие препарата мы изучали на имаго F₁ (первого поколения). Сравнение результатов в опыте и контроле проводили используя таблицу сопряженности (таблица 1) [4].

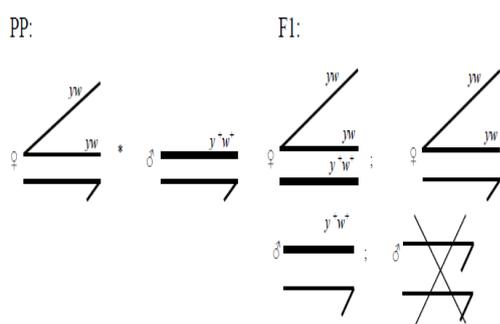


Рисунок 1 – схема скрещиваний по методике сцепленных X-хромосом (*double yellow*) для обнаружения видимых и летальных мутаций [4]



Рисунок 2 – Мушки линии Меллер-5: слева (меньших размеров) самец и справа самка

Таблица 1 – Результаты опыта и контроля в таблице сопряженности 2x2

Опыт	Поле <i>a</i> (число культур без леталей)	Поле <i>b</i> (число культур без леталей)
		68
Контроль	Поле <i>c</i> (число культур без леталей)	Поле <i>d</i> (число культур без леталей)
		52

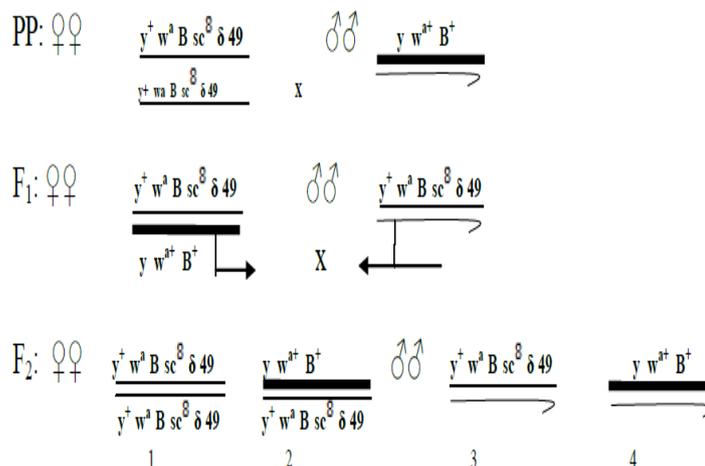
Метод Меллер-5 позволяет выявить летальные и морфологические мутации в X-хромосоме во втором поколении, а метод методики сцепленных X-хромосом – в первом поколении (рисунок 2).

Для получения F₁ в тест-системе Меллер-5 (М-5) использовали родителей, различающихся по окраске тела, а также по окраске и форме глаз, что значительно облегчает процедуру идентификации самок и самцов при посадке родителей на F₂ и анализе второго поколения.

В пробирке без наркотизации можно определить наличие или отсутствие в популяции

самцов. Схема обеспечивает скрещивание на F₂ без отбора виргинных самок (рисунок 3). В пробирку помещаем одну самку первого поколения и двух-трех самцов М-5 из исходной пробирки, или из линии М-5. Для самок такое скрещивание будет индивидуальным, а количество пробирок будет соответствовать половине проанализированных X-хромосом [5,6].

Результаты эксперимента сгруппированы в виде таблицы, где помимо абсолютных значений по индукции рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме, представлен уровень мутирования и в % (таблица 2).



F₂: 1 – самки Меллер-5; 2 – самки с серым телом, узкими абрикосового цвета глазами, гетерозиготные по вновь возникшей летальной мутации в X – хромосоме; 3 – серые самцы с узкими абрикосового цвета глазами; 4 – желтые самцы, при наличии летальной мутаций в X – хромосоме не развиваются

Рисунок 3 – Тест-система Меллер-5 для обнаружения летальных мутаций в X-хромосоме

Таблица 2 – Учет рецессивных леталей в X – хромосоме дрозофилы при воздействии фармакологического средства гроссгемина

Концентрация препарата в растворе	Экспозиция	Число изученных X-хромосом (число культур F ₁)	*РЛМСП	
			Число	%
2% р-р сахарозы (контроль)	20 – 24 часа	F2:128	0	0
		F1:42	0	0
5% экстракт гроссгемин + 2% р-р сахарозы (опыт)	20 – 24 часа	640 в F2	10	3,03
Примечание: *РЛМСП – число рецессивных летальных мутаций, сцепленных с полом				

Сравнение результатов в опыте и контроле проводили по нижеприведённой формуле:

$$x^2 = \frac{ad-bc \frac{N}{2} * N}{a+b \quad c+d \quad a+c \quad b+d}.$$

В опыте и контроле a, c – культуры без леталей соответственно; b, d – культуры с леталиями в опыте и контроле соответственно; N – общее число культур.

Если $x^2_{опыта} < x^2_{табл.} = 3,8$, если число степеней свободы = 1, то различия между c и d

(и соответственно a и b) недостоверны. В нашем эксперименте $x^2_{опыта}$ равен 0.94, т.е. превышает табличное значение x^2 . На основании этого можно утверждать, что гроссгемин в концентраций 5% при пероральном введении в имаго дрозофилы не обладает мутагенным действием в соответствии с международной градацией мутагенных эффектов [7]. В более ранних исследованиях с использованием 2% раствора гроссгемина в аналогичных экспериментах мутагенного эффекта также не обнаружили.

Литература

- 1 Иванютин В.А., Недорезов В.Л. Доклинические исследования лекарственных средств // Труды БГУ.- 2010.- Том 5 (1).- С. 291 – 294.
- 2 Ashby J. International Commission for protection against Environmenral Mutagens and Carcinogens. Two million rodent carcinogens. The role of SAR and QSAR in their detection. // Mutation Research. – 1994, Feb 1.- 305 (1). – P. 3-12.
- 3 Klopman G., Rozenkranz H.S. International Commission for protection against Environmenral Mutagens and Carcino genes. Approaches to SAR in carcinogenesis and mutagenesis. Prediction of carcinogenicity/mutagenicity using MUL TI-CASE. //Mutation Research, 1994, Feb 1, 305 (1), P. 33- 46.
- 4 Kuroda Y. Mutat. Res. Environ. // Mutagen. Related Subj.- 1987. -Vol. 182.- P. 365-370.
- 5 Бочков Н.П. Клиническая генетика. М., 2004. – 475с.
- 6 Дурнев А.Д. Генетическая токсикология // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2011. – № 9. – С. 35-43.
- 7 Абилов С.К. Химические мутагены и генетическая токсикология // Природа. – 2012. – № 10. - С. 39-46.
- 8 УДК 577.2:616-006