

Література.

1. *Баріляк І.Р.* Проблеми профілактики спадкової патології та вроджених вад розвитку // Журнал АМН України. – 2003. – Т.4, №; – С.656-667.
2. *Баріляк І.Р.* Генетичний моніторинг і його роль у профілактиці спадкової патології та природжених вад розвитку у дітей // Пед., акуш. та гінек. – 1999, №4. – С.147.
3. Introduction of international standarts and birth defect surveillane in Ukraine / I Intern.Symp. on Prevention and Epidemiology of Congenital malformations (15-16 Sept, 2000). – Cardiff, 2000. – P.78-79.
4. Атлас радіоактивного забруднення України. – К.: Мін. надзв. сит. України, 2002. – 24с.
5. Довкілля України, Стат. Зб., Держкомстат України. – К., 2004. – 264с.
6. Населення України, 2000р. Статистичний щорічник. – К.: Держкомстат України, 2004. – 208с.
7. Надання медико-генетичної допомоги в Україні. – К.: Міністерство охорони здоров'я України, Центр медичної статистики МОЗ України, 2002. – 84 с.

Резюме

Проаналізовано частоту вроджених вад розвитку в Рівненській та Волинській областях на обласному та районних рівнях за період з 1997 по 2006 роки. Встановлено, що у зазначених областях рівень вроджених вад розвитку значно перевищує середньодержавний і залежить від стану довкілля в цих областях (хімічного та комбінованого радіоактивного і хімічного забруднення).

Проанализирована частота врождённых пороков развития в Ровенской и Волынской областях на областном и районном уровнях за период с 1997 по 2006 год. Установлено, что в указанных областях уровень врождённых пороков развития значительно превышает средний по стране и зависит от состояния окружающей среды в этих областях (химического и комбинированного радиоактивного и химического загрязнения).

Frequency of congenital developmental anomalies in the Rivno and Volynsk areas at regional levels for the period with 1997 for 2006 is analysed. It is established, that in the specified areas the level of congenital developmental anomalies considerably exceeds average on the country and depends on a condition of an environment in these areas (chemical and combined radioactive with chemical pollution).

БАРИЛЯК І.Р., ШКАРУПА В.М.

*Науковий центр радіаційної медицини АМН України
Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53*

ТЕОРЕТИЧНІ МОДЕЛІ В АНАЛІЗІ ДОЗОВИХ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ МУТАГЕННОЇ ДІЇ МІТОМІЦИНУ С В ДОСЛІДАХ НА ALLIUM SERA L.

Аналіз дозових залежностей цитогенетичних пошкоджень при дії радіації і хімічних мутагенів є важливим джерелом як для вивчення природи взаємодії пошкоджуючого агенту з клітиною, так і для з'ясування механізмів формування аберацій хромосом. Раніше нами було показано, що при апроксимації експериментальних даних залежностей концентрація – кластогенний ефект мітоміцину С, найбільш адекватно крива доза-ефект описується поліномом четвертого ступеню [1]. Побудова рівнянь регресії значно полегшує аналіз результатів, оскільки можливо абстрагуватися від випадкових помилок [2]. Однак вони носять описовий характер, очевидно, що параметри, які входять в ці рівняння є емпіричними і інтерпретація їх

біологічного змісту є проблематичною [3].

Тому для розуміння природи взаємодії мутагену з клітиною необхідним є намагання знайти функцію, яка показувала б, виходячи із загальних уявлень про характер взаємодії, залежність виходу пошкоджень від дози. По експериментальним даним можна підібрати коефіцієнти цієї функції, причому вони повинні мати певний біологічний зміст [3]. Метою роботи було визначення такого роду функцій для опису виходу аберантних клітин при дії алкілюючого мутагену – мітоміцину С за умов його пролонгованої дії в клітинах апікальної меристеми *Allium sera L.*

Матеріали і методи

Експериментальні результати цитогенетичної дії мітоміцину С в клітинах кореневої меристеми *Allium sera L.* були отримані в попередніх дослідженнях [1]. Для аналізу дозових залежностей були використані теоретичні моделі, розроблені Чеботарьовим А.Н. і співавт. та Яковенко К.Н і співавт. для пояснення дозових залежностей цитогенетичних ефектів “одноцентрових” та “багатоцентрових” хімічних мутагенів [3-5].

$$\text{модель №1: } dA/dC = -KA, \quad (1)$$

$$\text{модель №2: } dA/dC = -KCA, \quad (2)$$

$$\text{модель №3: } dA/dC = -K(C + C_0)A, \quad (3)$$

$$\text{модель №4: } d\lambda/dC = KC(\mu - \lambda)^2, \quad (4)$$

де A – частка нормальних клітин; C – концентрація мутагену; K – коефіцієнт пропорційності, який визначає ефективність мутагену; λ – інтенсивність проникнення мутагену в клітину; μ – інтенсивність інактивації мутагенного ефекту; біологічний зміст параметру C_0 полягає в тому, що при $C_0 \leq 0$, існує поріг дії мутагену.

Рішеннями цих моделей є функції:

$$\rho = 1 - e^{-(KC + \alpha)}, \quad (\text{експонента}) \quad (5)$$

$$\rho = 1 - e^{-(KC^2/2 + \alpha)}, \quad (\text{S-подібна крива}) \quad (6)$$

$$\rho = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)^2}, \quad K = 2K_1^2, \quad C_0 = \alpha/K \quad (\text{S-подібна крива}) \quad (7)$$

$$\rho = C^2 / \alpha + KC^2, \quad (\text{гіпербола}) \quad (8)$$

де ρ – частка аберантних клітин; $e^{-\alpha}$ – частка нормальних клітин при спонтанному мутагенезі для функцій (1) і (2), $e^{-\alpha^2}$ – для функції (3); функція (4) передбачає нульовий рівень спонтанного мутагенезу.

Результати та обговорення

Відповідно до гіпотези про “одноцентрові” та “багатоцентрові” мутагени, дозові залежності для перших адекватно описуються функцією (7), а для других – функціями (5) і (8) [2]. Для аналізу залежності частки аберантних клітин від концентрації мітоміцину С за умов його пролонгованої дії в клітинах *Allium sera L.* були використані функції (5) – (8). В таблиці 1 наведені очікувані результати по виходу аберантних клітин на основі вищевказаних моделей та порівняння їх з експериментальними даними. За результатами експериментів *in vitro* в культурі лімфоцитів людини, мітоміцин С відноситься до “одноцентрових” мутагенів [3,6]. Тому ми очікували відповідності дозових залежностей наших експериментальних даних моделі, рішенням якої є функція (7). Проте, як видно з таблиці 1, в усьому діапазоні діючих концентрацій мутагену, жодна з досліджених моделей не описує адекватно дозову залежність виходу аберантних клітин.

Таблиця 1

Результати аналізу дії різних концентрацій мітоміцину С на клітини апікальної меристеми *Allium sera L.* (в усьому діапазоні концентрацій)

Концентрація, $\cdot 10^{-5} \text{M}$	Вибірка, клітин	Кількість аберантних ана-телофаз, %				
		Емпірична	Очікувана по моделі			
			№1	№2	№3	№4
0	1096	1,28	5,13	11,89	9,34	0
0,01495	1604	3,37	45,75	58,995	33,01	3,15

0,02991	1224	5,39	45,81	58,996	33,06	9,59
0,1495	1637	11,12	46,27	58,997	33,46	27,78
0,2991	1278	15,73	46,83	59,00	33,97	29,53
0,7477	1460	21,99	48,49	59,04	35,47	30,06
1,495	1419	40,59	51,13	59,20	37,99	30,15
2,991	842	62,35	56,03	59,64	43,04	30,164
5,980	850	92,09	64,39	61,49	52,92	30,169
7,477	324	86,42	67,96	62,83	57,65	30,170
11,96	177	88,20	76,65	68,10	70,41	30,170
14,95	43	90,70	81,09	72,29	77,50	30,170
23,92	21	85,71	89,96	84,98	91,62	30,171
29,91	13	84,62	93,41	91,15	96,23	30,171
Статистичні показники						
χ^2	-	-	160,48	236,15	140,32	723,94
df	-	-	12	12	12	12
P	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

В моделі № 4, очікуваний рівень аберантних клітин співпадає з експериментальним лише при дії мутагену у найменшій концентрації. Хоча модель №4 і описує вихід кривої доза-ефект на “плато”, проте він відбувається вже при досягненні 30% рівню аберантних клітин. Крім того, ця модель не описує S-подібної дозової залежності, яка мала місце в експерименті [1]. Очевидно, що мутагенна дія мітоміцину С в клітинах *Allium* *cepa* L. обумовлена іншими закономірностями реалізації первинних пошкоджень ДНК у аберації хромосом ніж покладеними в основу моделі №4. Основним недоліком моделей № 1-3 в усьому діапазоні діючих концентрацій мутагену є надзвичайно високий очікуваний рівень аберантних клітин при дії низьких та середніх концентрацій мутагену.

В наших дослідженнях дозова залежність виходу аберантних клітин від концентрації мітоміцину С була подібна до дії мутагену в лімфоцитах периферійної крові людини *in vitro* лише в діапазоні до виходу кривої доза-ефект на “плато” [3,6]. В експериментах *in vitro* не було виявлено виходу дозової кривої на “плато”. Слід зазначити, що при цьому використовувались концентрації мутагену, які не призводили до значного зменшення мітотичної активності. Неадекватність очікуваної відповідності моделі №3 експериментальним даним в усьому діапазоні діючих концентрацій обумовлена тим, що вона не враховує значного зменшення виходу аберантних клітин при досягненні певної критичної концентрації мутагену. Тому додатково ми провели кількісний аналіз дозових залежностей дії мітоміцину С в діапазоні до виходу кривої на “плато”. Результати представлені в таблицях 2 і 3.

Таблиця 2

Результати аналізу дії різних концентрацій мітоміцину С на клітини апікальної меристеми *Allium* *cepa* L. (в діапазоні концентрацій до виходу кривої на “плато”)

Концентрація, $\cdot 10^{-3}$ мМ	Вибірка	Кількість аберантних ана-телофаз,%				
		Емпірична	Очікувана по моделі			
			№1	№2	№3	№4
0,001495	1604	3,37	– 0,02	16,51	8,48	3,18
0,002991	1224	5,39	0,39	16,52	8,66	8,63
0,01495	1637	11,12	5,09	16,63	10,19	19,06
0,02991	1278	15,73	10,65	17,01	12,24	19,81
0,07477	1460	21,99	25,45	19,61	19,22	20,034
0,1495	1419	40,59	44,87	28,20	32,71	20,066

0,2991	842	62,35	69,86	54,39	60,57	20,074
0,598	850	92,09	90,99	92,55	93,08	20,076
Статистичні показники						
χ^2	-	-	74,61	26,78	6,486	373,91
df	-	-	7	7	7	7
P	-	-	<0,0001	0,0004	0,484	<0,0001

Таблиця 3

Параметри моделей, що описують концентраційні залежності дії мітоміцину С (в діапазоні концентрацій до виходу кривої на “плато”)

Модель	α	K	ρ_{0T}	ρ_{0e}	R^2	Adjusted R^2	RMSE
№1	- 0,043	3,319	- 4,40	1,28	0,9918	0,9904	0,0308
№2	0,1267	20	11,90	1,28	0,9556	0,9482	0,0716
№3	0,3027	1,094	8,60	1,28	0,9863	0,9840	0,0398
№4	0,0299	1,075	0	1,28	0,9333	0,9223	0,0877

ρ_{0T} – очікуваний по моделі спонтанний рівень аберантних клітин;

ρ_{0e} – експериментальний спонтанний рівень аберантних клітин

Як видно з таблиць 3 та 4, дозові залежності кількості аберантних клітин від концентрації мутагену в діапазоні до виходу емпіричної кривої на “плато” адекватно описує модель №3. Коефіцієнт K, який визначає ефективність індукції аберантних клітин мітоміцином С у *Allium* сера L. дорівнює 1,094. Важливим наслідком проведених експериментів є те, що для мітоміцину С показано відсутність порогу дії мутагену в клітинах *Allium* сера L. Це впливає з аналізу отриманих параметрів моделі. Як вже зазначалося, біологічний зміст параметру C_0 в моделі №3 полягає в тому, що значення $C_0 \leq 0$ обумовлені порогом дії мутагену. Оскільки отримані значення параметрів α і K є більшими нуля, а $C_0 = \alpha / K$, то $C_0 > 0$.

Разом з тим, необхідно відмітити, що в наших дослідженнях, як і в експериментах *in vitro* при дії мітоміцину С та іншого “одноцентрового” алкілюючого мутагену – тіофосфаміду, ця модель дає завищений рівень спонтанної частоти аберантних клітин [3,6]. Як видно з таблиці 3, теоретично очікувана частота аберантних клітин при нульовій концентрації мітоміцину С дорівнює 8,6%, порівняно з 1,28% в експерименті. Для тіофосфаміду, в дослідженнях *in vitro*, очікуваний спонтанний рівень аберантних клітин становив 5,7% та 12,3% при дії мутагену на стадіях G_0 та G_2 відповідно [3,4]. Слід зазначити, що інші розглянуті моделі дають ще більш істотні розходження з експериментом. На нашу думку, модель №3 не враховує процесів, які обумовлюють зменшення мутагенної ефективності при збільшенні концентрації мутагену, що в кінцевому результаті призводить до виходу кривої доза-ефект на “плато”. Ймовірно, що емпірично зафіксований рівень частоти аберантних клітин є меншим, ніж реально індукований. Особливо ця різниця збільшується при зростанні концентрації мутагену. Тому, внаслідок заниженої частоти аберантних клітин при високих концентраціях мітоміцину С, апроксимація експериментальних даних в моделі №3 призводить до завищення спонтанного рівню мутагенезу.

Для багатьох мутагенів (в тому числі з алкілюючим механізмом дії) характерними є криві доза-ефект з виходом на “плато” або \cap -подібного типу. Зокрема, при дії мітоміцину С на протязі 2 годин на стадії S в клітинах *Sterpis capilaris* крива дозових залежностей мала “плато”, [7]. Такі закономірності можуть бути обумовлені інтерфазною загибеллю та затримкою мітозу пошкоджених клітин, інгібуванням формування видимих перебудов з первинних пошкоджень. Тому адекватний аналіз залежностей доза-ефект при дії хімічних мутагенів потребує розробки теоретичних моделей, які б враховували також вищевказані процеси.

Висновки

Встановлено, що залежність концентрація – частота аберантних клітин за умов пролонгованої дії мітоміцину С в клітинах *Allium* сера L. задовільно описується теоретичною моделлю, характерною для “одноцентрових” хімічних мутагенів: $dA/dC = -K/(C + C_0)A$, лише в діапазоні до виходу кривої на “плато”. Коефіцієнт регресії, який визначає ефективність індукції аберантних клітин мітоміцином С дорівнює 1,094. Теоретично обґрунтовано відсутність порогу кластогенної дії мітоміцину С на клітини кореневої меристеми *Allium* сера L. Висловлено припущення, що для аналізу дозових залежностей цитогенетичної дії хімічних мутагенів, необхідним є розробка теоретичних моделей, які враховують також процеси інтерфазної загибелі та затримки мітозу пошкоджених клітин.

Література:

1. Шкарупа В.М., Баріляк І.Р. Кількісний аналіз цитогенетичних ефектів, індукованих мітоміцином С. Характеристика дозових залежностей // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007 (подано до друку).
2. Lovell D.P. Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: statistical models and study design // *Mut. Res.* – 2000. – Vol. 464, № 1. – P.87-95.
3. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М.: Медицина, 1989. – 270 с.
4. Чеботарев А.Н., Яковенко К.Н. Математическое моделирование зависимости цитогенетического эффекта от концентрации мутагена // *Генетика.* – 1974. – Т. 10, № 8. – С. 150-157.
5. Яковенко К.Н., Ажаев С.А., Бочков Н.П. Цитогенетический эффект производных этиленimina в культуре лимфоцитов человека. Сообщение 2. Математическая модель действия разных концентраций дипина и фотрина // *Генетика.* – 1974. – Т. 10, № 11. – С. 138-146.
6. Щеглова Е.Г., Чеботарев А.Н. Сопоставление уровня сестринских хроматидных обменов и хромосомных aberrаций, индуцированных химическими мутагенами *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1983, № 11. – С.93-95.
7. Дубинина Л.Г., Курашова З.И. Мутагенез, индуцированный митоміцином С // *Генетика.* – 1986, Т. 22. – № 10. – С. 2444-2451.

Резюме

Досліджували відповідність експериментальних даних дозових залежностей цитогенетичної дії мітоміцину С (в діапазоні концентрацій $0,015 \cdot 10^{-5} \text{M}$ – $29,91 \cdot 10^{-5} \text{M}$ за умов пролонгованої дії мутагену) в клітинах *Allium* сера L. існуючим теоретичним моделям. Показано, що крива доза - мутагенний ефект в діапазоні до виходу кривої на “плато”, адекватно описується моделлю притаманною для дії “одноцентрових” мутагенів: $dA/dC = -K/(C + C_0)A$, рішенням якої є функція $p = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)^2}$. Де А – частка нормальних клітин, р – частка аберантних клітин, С – концентрація мутагену, К, K_1 і α – коефіцієнти. Визначено коефіцієнт ефективності індукції аберантних клітин мітоміцином С (1,094) та показано відсутність порогу дії мутагену в клітинах *Allium* сера L. Завищений очікуваний рівень спонтанного мутагенезу та неадекватність опису дії високих концентрацій мутагену (при виході кривої на “плато”) в цій моделі обумовлені тим, що вона не враховує зменшення мутагенної ефективності на одиницю дози при збільшенні концентрації мітоміцину С. Висловлено припущення, що для аналізу дозових залежностей цитогенетичної дії хімічних мутагенів, необхідним є розробка теоретичних моделей, які враховують також процеси інтерфазної загибелі та затримки мітозу пошкоджених клітин.

Исследовали соответствие экспериментальных данных дозовых зависимостей цитогенетического действия митоміцина С в клетках *Allium* сера L. существующим

теоретическим моделям. Показано, що діапазон до вихода кривої дозових залежностей дії митомицину С на "плато", адекватно описується моделлю, характерною для дії "одноцентрових" мутагенів: $dA/dC = -K(C + C_0)A$, рішенням якої є функція $\rho = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)}$. Де А – частка нормальних клітин, ρ – частка аберантних клітин, С – концентрація мутагену, К і α – коефіцієнти. Визначено коефіцієнт мутагенної ефективності (К = 1,094) митомицину С і показано відсутність порога дії мутагену в клітках *Allium cepa* L. Завищений очікуваний рівень спонтанного мутагенезу за цією моделлю обумовлено тим, що вона не враховує зменшення мутагенної ефективності при збільшенні концентрації митомицину С. Висловлюється припущення, що для адекватного аналізу дозових залежностей цитогенетичного дії хімічних мутагенів, необхідна розробка теоретических моделей, які б враховували такі процеси як інтерфазна гибель і затримка митозу пошкоджених клітин.

Investigated correspondence of experimental data dose-response dependences of cytogenetic action of mitomycin C in cells *Allium cepa* L. to existing theoretical models. It is shown, that a range up to an output of a that dose-response dependences of action mitomycin C on "plateau", it is adequately described by model, characteristic for action "monocentric" mutagens: $dA/dC = -K(C + C_0)A$, which decision is function $\rho = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)}$. Where А - a share normal cells; ρ - a share aberrant cells; С - concentration of mutagen; К, K_1 and α - coefficients. It is certain coefficient mutagenic efficiency (К = 1,094) of mitomycin C and absence of a threshold of action mutagen in cells *Allium cepa* L is shown. The overestimated expected level spontaneous mutagenesis on this model is caused by that it does not consider reduction of mutagenic efficiency at increase in concentration mitomycin C. It is supposed, that for the adequate analysis dose-response dependences cytogenetics actions of chemical mutagens, development of theoretical models which would consider such processes as interphase destruction and a mitosis arrest the damaged cells is necessary.

БОДНАР Л. С.¹, БЕЛЯЄВА В. В.¹, ГОРБУЛІНСЬКА С. М.¹, ФЕДИНЯК А. В.²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
79005, м. Львів, вул. Грушевського 4

²Клініка репродуктивної медицини «ІНТЕРСОНО», м. Львів

СКРИНІНГ ПРИРОДНИХ ЗРАЗКІВ ВОДИ ЧЕРВОНОГРАДСЬКОГО ГІРНИЧО - ПРОМИСЛОВОГО РЕГІОНУ НА ІНДУКЦІЮ СОМАТИЧНИХ МУТАЦІЙ ТА РЕКОМБІНАЦІЙ НА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Проведене генотоксикологічне обстеження зразків води з природних водойм Червоноградського гірничо-промислового району Львівської області на індукцію соматичних мутацій та рекомбінацій у *Drosophila melanogaster*. Виявлена тенденція до зменшення мутагенності у зразках води, відібраних з річок Тисмениця, Солокія, Дністер, Західний Буг починаючи з 1997 – 2006 роки.

Для генотоксичного аналізу використовуються різні методи, в тому числі на індукцію як генних мутацій, так і хромосомних аберацій з використанням еукаріотичних та прокаріотичних організмів. Метод індукції соматичних мутацій і рекомбінації на *Drosophila melanogaster* використовується, в основному, для дослідження зразків на канцерогенність. Метод базується на проходженні в соматичних клітинах процесу, аналогічного мейотичному кросинговеру або соматичної рекомбінації. Принцип методу полягає в тому, що у мух, гетерозиготних по одному чи декількох рецесивних генах під дією мутагенів виникають мозаїчні плями – ділянки тканин, на яких проявляється дія цих генів, в той час, як оточуючі ділянки мають нормальний фенотип. Всі клітини особин марковані певними рецесивними генами, що