

УДК 575.224.4

## **КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ЕФЕКТІВ, ІНДУКОВАНИХ МІТОМІЦИНОМ С. ХАРАКТЕРИСТИКА ДОЗОВИХ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ**

В.М. ШКАРУПА, І.Р. БАРИЛЯК

Науковий центр радіаційної медицини АМН України  
Україна, 04050, м. Київ, вул. Мельникова, 53,  
e-mail: [baryliak@kyivutel.net.ua](mailto:baryliak@kyivutel.net.ua)

*Проаналізовано залежність доза — мутагенний ефект мітоміцину С (МС) в клітинах Allium сера L. для діапазону концентрацій 0,0005 – 1 мг/л при пролонгованій (72 год) дії препарату. Залежність доза — ефект має нелінійний S-подібний характер з виходом на “плато” при дії концентрацій мутагену, більших 0,2 мг/л. У діапазоні концентрацій до 0,01 мг/л спостерігали тенденцію до збільшення метафазного пулу мітотичних клітин. При дії вищих концентрацій відбувається збільшення профазного індексу. Найбільша частка клітин на стадії метафази — в точці переходу S-подібності кривої доза — ефект. Для клітин першого мітозу існує зворотна залежність відносної ефективності мутагену від величини його концентрації в перерахунку на одиницю дози для всіх досліджених концентрацій. Низька концентрація МС (0,0005 мг/л) в 76,92 рази ефективніша високої концентрації мутагену (1 мг/л) при перерахунку на одиницю дози. Апроксимація експериментальних даних поліномними функціями показала, що найбільш адекватно крива доза — ефект описується поліномом четвертого ступеня.*

*Ключові слова: мітоміцин С, Allium сера L., крива доза — ефект.*

**Вступ.** Дослідження цитогенетичних пошкоджень при дії різних концентрацій хімічних мутагенів – важливе джерело, що надає інформацію про природу взаємодії пошкоджувального агента із клітиною і механізми утворення аберацій хромосом [1]. Проте питання про кількісні закономірності зв'язку цитогенетичних ефектів пролонгованої дії мітоміцину С із його концентрацією вивчені недостатньо.

Раніше показано мутагенність мітоміцину С для *Allium сера L.* за умов пролонгованої дії у діапазоні концентрацій від 0,0005 до 1 мг/л [2]. Метою даної роботи було проведення кількісного аналізу дозових залежностей дії мітоміцину С в *Allium*-тесті. Для інтегральної оцінки дозових залежностей застосовували ряд таких параметрів, як частота абераційних клітин, зміна мітотичної активності, дезінтеграція пулів про-

© В.М. ШКАРУПА, І.Р. БАРИЛЯК, 2008

ліферуєчих клітин, відносна мутагенна ефективність у перерахунку на одиницю дози.

### Матеріали і методи

Цитогенетичну дію мітоміцину С досліджували в ана-телофазному тесті у клітинах кореневої меристеми *Allium scera* L. Для дослідів використовували такі концентрації препарату ("Мітоміцин-С Кіова", Японія): 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,8; 1 мг/л. Методика експерименту, критерії обчислення частоти аберантних ана-телофаз (ЧАА), мітотичної активності описані раніше [2]. Додатково аналізували кількість клітин, що перебували у різних фазах мітозу. Залежність відносної ефективності мутагену від величини його концентрації проводили в перерахунку на одиницю дози для усіх досліджених концентрацій. За одиницю дози обирали концентрацію мутагену, яка індукувала найменший рівень аберантних клітин. Для аналізу дозової залежності проводили апроксимацію експериментальних даних поліномними функціями різного ступеня. Результати експериментальних даних обробляли за загальноприйнятими статистичними методиками [3].

### Результати та обговорення

Проаналізовано цитогенетичні ефекти мітоміцину С при дії 13 концентрацій в діапазоні від 0,0005 до 1 мг/л. Найвища концентрація (1 мг/л) в 2000 разів перевищувала найменшу концентрацію (0,0005 мг/л). Вибір високих діючих концентрацій мітоміцину С базувався на дослідженнях його токсичності [4], а низьких – на попередніх додаткових дослідженнях, в яких намагались виявити концентрацію мутагену, яка індукує найменший рівень аберан-

тних клітин, що вірогідно відрізняється від контролю.

Характерною рисою залежності доза — ефект було швидке наростання частоти аберантних клітин із збільшенням концентрації в діапазоні низьких доз і уповільнення інтенсивності зростання ЧАА при більших дозах мутагену (рис. 1). У досліджуваному діапазоні не виявлено концентрації мітоміцину С, мутагенний ефект якої вірогідно не відрізнявся б від спонтанного. Вже найменша із досліджених концентрацій 0,0005 мг/л індукувала в 2,63 раза більшу ЧАА, ніж у контролі ( $p < 0,05$ ). При збільшенні концентрації мітоміцину С в 2 рази (0,001 мг/л) ЧАА збільшується в 1,6 раза ( $3,37 \pm 0,46\%$  і  $5,39 \pm 0,59\%$  аберантних клітин відповідно). Хоча кратність збільшення рівня аберантних клітин при цьому дещо менша, ніж аналогічне збільшення концентрації, це вказує на подібну до прямої залежності доза — ефект у цьому діапазоні концентрацій. При подальшому збільшенні концентрації в 5 разів (0,005 мг/л) ЧАА збільшується лише в 2,06 раза, що свідчить про значне зменшення мутагенної ефективності мітоміцину С і відхилення залежності доза — ефект від прямої у цьому діапазоні концентрацій. У подальшому при зростанні концентрації мітоміцину С з 0,005 до 0,2 мг/л ЧАА також зростає і при дії мутагену в останній концентрації досягає свого максимуму —  $92,09 \pm 0,93\%$ . При цьому варто зазначити, що в діапазоні концентрацій мутагену від 0,0005 мг/л до 0,05 мг/л, які індукують від  $3,37 \pm 0,45\%$  до  $40,59 \pm 1,70\%$  аберантних клітин, залежність доза-ефект має вигляд S-подібної кривої (рис. 1). Точка переходу на кривій при цьому має координати — 0,01 мг/л (концентрація мутагену);  $15,73 \pm 1,02\%$  (ЧАА). У вищевказаному діапазоні після точки переходу

спостерігали наближену до прямої залежність доза — ефект: при збільшенні концентрації мутагену в 2 рази (з 0,025 мг/л до 0,05 мг/л) ЧАА збільшується в 1,85 рази ( $21,99 \pm 1,08\%$  та  $40,59 \pm 1,70\%$  відповідно). Проте при подальшому збільшенні концентрації мутагену в діапазоні від 0,05 мг/л до 0,2 мг/л залежність доза — ефект набуває характеру гіперболічної кривої. Про це свідчить і зменшення мутагенної ефективності мітоміцину С в цьому діапазоні. В результаті збільшення концентрації мутагену в 4 рази (з 0,05 мг/л до 0,2 мг/л) ЧАА зростає лише в 2,27 рази ( $40,59 \pm 1,70\%$  та  $92,09 \pm 0,93\%$  відповідно). Збільшення рівня аберантних клітин при діючих концентраціях мутагену від 0,3 мг/л до 1 мг/л порівняно з ЧАА індукованих 0,2 мг/л мутагену не відбувається. Навпаки, при концентрації 0,3 мг/л відбувається вірогідне зменшення ЧАА ( $p < 0,05$ ) до  $86,42 \pm 1,90\%$ . В цілому, при збільшенні концентрації мутагену від 0,2 мг/л до 1 мг/л спостерігали тенденцію до зменшення ЧАА, при дії найвищої кон-

центрації мутагену 1 мг/л вона становила  $84,62 \pm 10,0\%$ . Але відмінності в ЧАА при дії мутагену в концентраціях від 0,4 мг/л до 1 мг/л порівняно з дією 0,2 мг/л є статистично недостовірними ( $p > 0,1$ ).

Загалом, можна підсумувати, що крива доза — ефект у діапазоні концентрацій мітоміцину С з 0,0005 до 0,05 мг/л (рівень мутагенності — до  $40,59 \pm 1,70\%$  аберантних клітин) має вигляд S-подібної кривої, яка в діапазоні з 0,05 мг/л до 0,2 мг/л (рівень мутагенності — до  $92,35 \pm 0,91\%$  аберантних клітин) набуває гіперболічного характеру з виходом на "плато" в діапазоні з 0,2 мг/л до 1 мг/л.

Статистична недостовірність відмінностей в ЧАА при високих концентраціях мітоміцину С обумовлена різким зменшенням кількості проаналізованих ана-телофаз у зв'язку із зменшенням кількості мітозів у меристемах, особливо при концентраціях, більших 0,4 мг/л, коли мітотична активність практично повністю інгібувалась. У попередніх дослідженнях показано, що

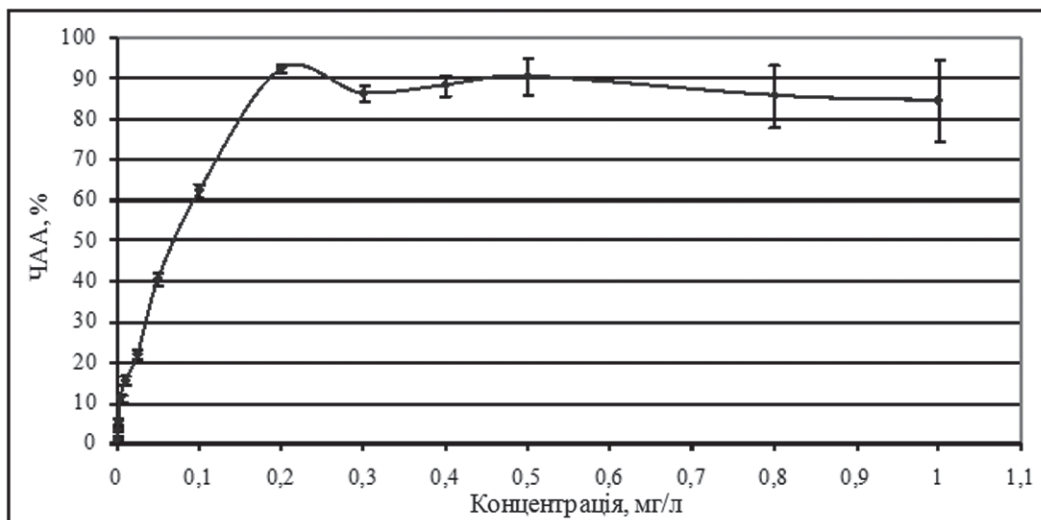


Рис. 1. Крива залежності концентрація — частота аберантних клітин при 72-годинній експозиції насіння *Allium cepa* L. із мітоміцином С

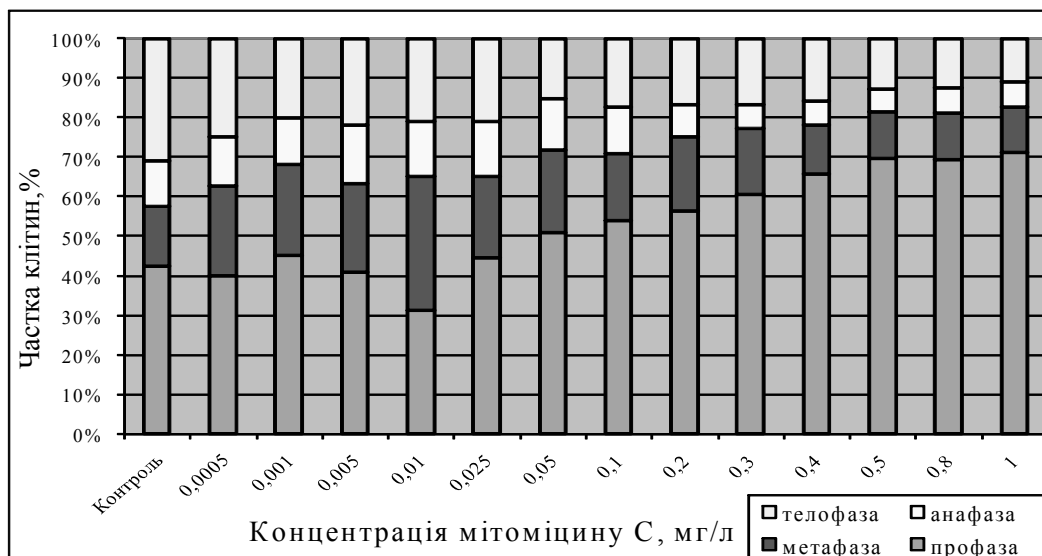


Рис. 2. Розподіл клітин *Allium cepa* L. залежно від фаз мітозу при дії мітоміцину С

мутагенність мітоміцину С в усьому діапазоні діючих концентрацій корелює із пригніченням мітотичної активності [2].

Аналіз кількості клітин, що перебували в різних фазах мітозу, показав, що при дії мітоміцину С розподіл клітин відрізняється від контрольного в усьому діапазоні досліджених концентрацій (рис. 2). Причому можна зазначити декілька тенденцій у зміні співвідношення фаз мітозу залежно від дози мітоміцину С. При дії мутагену в концентрації 0,0005 мг/л спостерігали збільшення пулу клітин на стадії метафази при зменшенні частки клітин у стадіях анафази і телофази. Це свідчить про те, що мутаген уже при дії найменшої з досліджених концентрацій призводить до затримки на стадії метафази. При подальшому збільшенні концентрації (0,001 мг/л) частка клітин на стадії метафази також збільшується, проте спостерігали і збільшення частки клітин на стадії профазы (45,18% порівняно з 39,91%), яка переважає таку в контролі

(42,53%). Сумарна частка клітин на стадіях анафази і телофази при цьому продовжує зменшуватись. При дії мутагену в наступних концентраціях продовжується тенденція збільшення частки клітин на стадії метафази, досягаючи максимуму при 0,01 мг/л, коли частка клітин на цій стадії складала 33,93%. Зменшення пулу клітин на стадіях анафази і телофази при цьому не спостерігали. У діапазоні діючих концентрацій після 0,01 мг/л характерним є поступове зростання профазного індексу. Воно відбувається за рахунок зменшення як анафазного і телофазного індексів, так і за рахунок зменшення пулу клітин на стадії метафази. Це свідчить про те, що в цьому діапазоні діючих концентрацій мутагену переважають процеси інгібування синтезу ДНК. Варто зазначити, що найбільшу частку клітин на стадії метафази спостерігали при дії концентрації мутагену (0,01 мг/л), яка є точкою переходу S-подібності кривої доза — ефект. Тому можливо, що S-подібність кривої

Таблиця 1. Відносна мутагенна ефективність на одиницю дози при дії мітоміцину С

Концентрація, мг/л	Відносна мутагенна ефективність на одиницю дози (0,0005 мг/л)	Концентрація, мг/л	Відносна мутагенна ефективність на одиницю дози (0,0005 мг/л)
0,0005	1	0,2	0,069
0,001	0,80	0,3	0,043
0,005	0,33	0,4	0,033
0,01	0,23	0,5	0,027
0,025	0,13	0,8	0,016
0,05	0,12	1,0	0,013
0,1	0,093	-	-

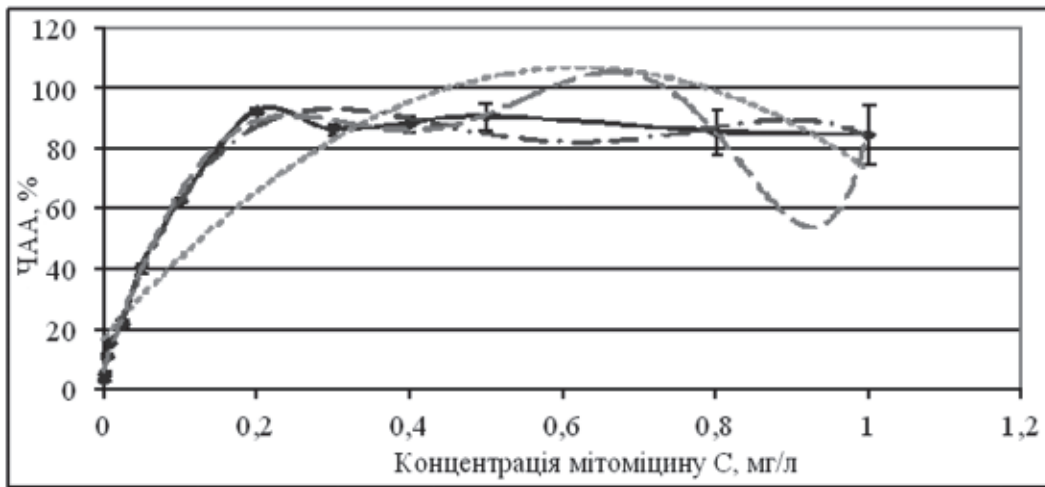


Рис. 3. Криві доза — ефект, побудовані за експериментальними даними та моделями № 1, № 3, № 5; — — — модель № 1, - · - · - модель № 3, ••• модель № 5

доза — ефект обумовлена затримкою клітин із пошкодженнями ДНК на стадії метафази.

Якщо прийняти за низьку дозу концентрацію мітоміцину С 0,0005 мг/л і розрахувати ефективність мутагену на одиницю дози, спостерігали зворотну залежність відносної ефективності мутагену від його концентрації в перерахунку на одиницю дози для всіх досліджених концентрацій (табл. 1).

Мутагенна ефективність при цьому є значно більшою у низьких концентраціях, ніж у високих. Так, найменша концентрація мутагену – 0,0005 мг/л у

76,92 раза ефективніша високої концентрації мутагену (1 мг/л) при перерахунку на одиницю дози.

Регресійний аналіз кривої доза — ефект проводили, використовуючи поліноми другого, третього, четвертого, п'ятого та шостого ступеня – моделі № 1–5 відповідно. Графіки кривих апроксимації експериментальних даних вказаним моделям наведено на рис. 3 і 4.

Коефіцієнти в рівняннях поліномів мають такий вигляд:

$$\text{модель №1: } y = -234,39x^2 + 290,93x + 16,61, \text{ модель №2: } y = 542,3x^3 - 992,36x^2 + 528,8x + 9,96,$$

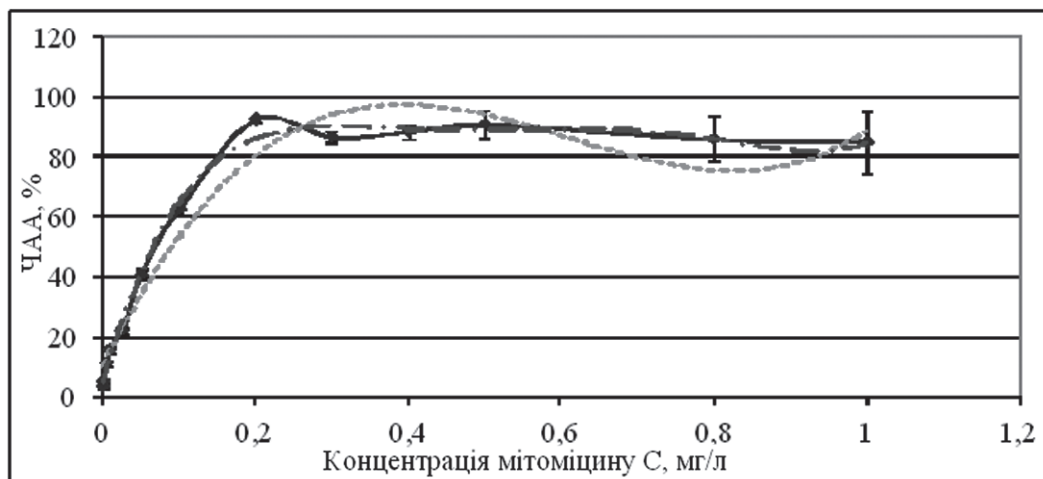


Рис. 4. Криві доза — ефект, побудовані за експериментальними даними та моделям № 2, №4; — — — модель № 2, - · - · - модель № 4

Таблиця 2. Параметри оцінки моделей апроксимації поліномними функціями

Параметри	Модель				
	№1	№2	№3	№4	№5
$y_0$	16,609	9,9653	5,8289	4,4122	5,5742
$R^2$	0,8719	0,9627	0,9919	0,9947	0,9967

модель №3:  $y = -1146,6x^4 + 2784,2x^3 - 2330,6x^2 + 771,48x + 5,82$ ,  
 модель №4:  $y = 2102,4x^5 - 6163,2x^4 + 6858,3x^3 - 3621,8x^2 + 904,52x + 4,41$ ,  
 модель №5:  $y = 13570x^6 - 34107x^5 + 28877x^4 - 8127,3x^3 - 870,28x^2 + 736,27x + 5,57$ ,  
 де  $y$  – частота аберантних клітин,  $x$  – концентрація мітоміцину С.

Коефіцієнти при поліномах описують зв'язок концентрації з часткою клітин, що розподіляються відповідно лінійній, квадратичній, кубічній та ін. функції. Оцінка параметрів моделей наведена в табл. 2. Крім квадрата коефіцієнта кореляції ( $R^2$ ) враховували також очікуваний рівень спонтанної частоти аберантних клітин, який виражається вільним членом у рівняннях поліномів,  $y = y_0$  при  $x = 0$ .

Варто зазначити, що графіки поліномів можуть мати різну форму, при-

чому чим вищий ступінь багаточлена, тим більш складною може бути ця форма. При цьому поліном низького порядку може бути недостатньо гнучким засобом для апроксимації даних, що і показують результати аналізу в моделях №1 і № 2, в яких очікуваний спонтанний рівень аберантних клітин є дуже подібним (відрізняються лише за третім знаком після коми).

Разом із тим, поліном високого порядку може бути занадто гнучким і точно відповідати експериментальним даним, набуваючи при цьому складної чужої форми, яка не має ніякого стосунку до форми справжньої залежності. Саме це і спостерігали для моделі № 5 при апроксимації поліномом найвищого із застосованих – шостого ступеня. Як видно з табл. 2, формально за значенням  $R^2$  ця модель краще описує експериментальні дані (внаслідок того,

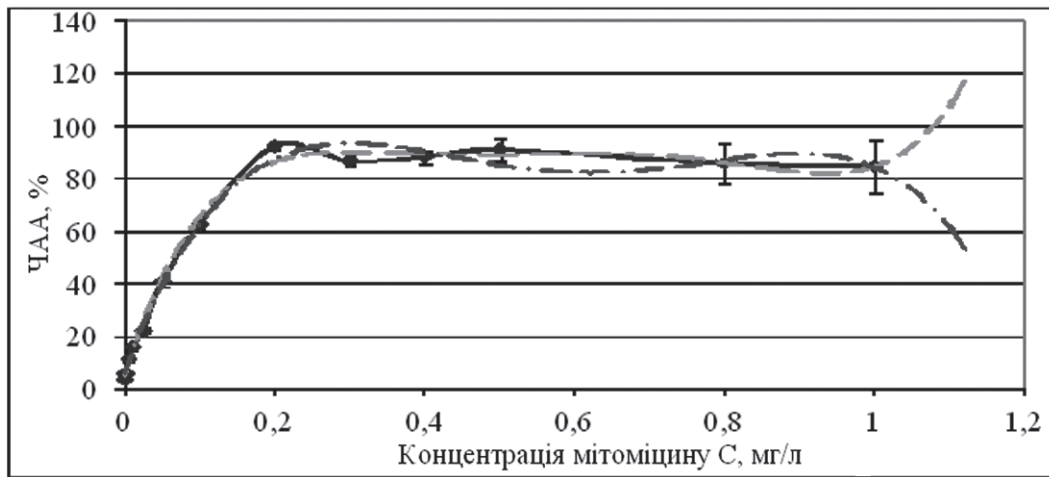


Рис. 5. Дозова залежність для моделей №3 і №4 при теоретичному збільшенні досліджуваних концентрацій; — — модель №3, - - - - модель №4

що крива найкраще проходить через експериментальні точки). Проте з рис. 3 видно, що в діапазоні концентрацій мітоміцину С: 0,5 – 0,8 мг/л (ЧАА в експерименті –  $90,70 \pm 4,43\%$  та  $85,71 \pm 7,63\%$  відповідно) крива по моделі дає значення ЧАА більше 100%, а в діапазоні 0,8 – 1 мг/л показує різке зниження ЧАА з  $85,71 \pm 7,63\%$  до  $\approx 55\%$  із подальшим збільшенням при 1 мг/л.

Виходячи з рівнянь, що описують моделі №3 і №4, бачимо, що ці функції мають різнонаправлений характер. Так, для поліному четвертого ступеня коефіцієнт перед  $x^4$  має від'ємний знак. Це означає, що при зростанні концентрації мітоміцину С збільшення ЧАА відбуватиметься лише до певного значення, після чого залежність доза — ефект матиме вигляд огинальної кривої. На відміну від цього модель №4 вже при концентраціях мутагену, більших за 1,1 мг/л, передбачає ЧАА, більшу за 100% (рис. 5).

Таким чином, апроксимація експериментальних даних поліномними функціями показала, що найбільш

адекватно крива доза — ефект при дії мітоміцину С описується поліномом четвертого ступеня і має вигляд огинальної кривої при теоретичному збільшенні концентрації мутагену.

#### Висновки

Залежність концентрація – частота аберантних клітин при пролонгованій (72 год) дії мітоміцину С у клітинах *Allium cepa* L. в діапазоні концентрацій 0,0005 – 1 мг/л має нелінійний S-подібний характер із виходом на “плато” при дії концентрацій мутагену, більших 0,2 мг/л. Для клітин першого мітозу існує зворотна залежність відносної ефективності мутагену від величини його концентрації в перерахунку на одиницю дози для всіх досліджених концентрацій. Низька концентрація МС (0,0005 мг/л) в 76,92 рази ефективніша високої концентрації мутагену (1 мг/л) при перерахунку на одиницю дози. Апроксимація експериментальних даних поліномними функціями показала, що найадекватніше крива доза — ефект описується поліномом чет-



вертого ступеня. Аналіз розподілу клітин за фазами мітозу виявив дві тенденції. При дії концентрацій мутагену до 0,01 мг/л спостерігали затримку клітин на стадії метафази. При подальшому зростанні концентрації мутагену спостерігали значне збільшення профазного індексу (при зменшенні всіх інших). Найбільшу частку клітин на стадії метафази спостерігали при дії концентрації мутагену (0,01 мг/л), яка є точкою переходу S-подібності кривої доза — ефект. Тому можливо, що S-подібність кривої обумовлена затримкою клітин із пошкодженнями ДНК на стадії метафази.

#### Перелік літератури

1. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. — М.: Медицина, 1989. — 270 с.
2. Шкарупа В.М., Баріляк І.Р. Залежність концентрація — кластогенний ефект при дії мітоміцину С на клітини апікальної меристеми *Allium sera* L. // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4, № 2. — С. 181-187.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.
4. Шкарупа В.М. Оцінка фітотоксичної і цитогенотоксичної активності алкілюючих протипухлинних препаратів // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. Зб. наук. праць. — Київ — Луганськ — Харків. — 2006. — Випуск 1 (70). — С.30-40.

Представлено В.А. Кунахом  
Надійшла 11.02.2008

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ  
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ,  
ИНДУЦИРОВАННЫХ МИТОМИЦИНОМ С.  
ХАРАКТЕРИСТИКА ДОЗОВЫХ  
ЗАВИСИМОСТЕЙ

В.Н. Шкарупа, І.Р. Баріляк

Научный центр радиационной медицины  
АМН Украины, Киев  
Украина, 04050, г. Киев, ул. Мельникова,  
53, e-mail: [baryliak@kyivutel.net.ua](mailto:baryliak@kyivutel.net.ua)

Проанализирована зависимость доза — мутагенный эффект митомицина С (МС) в клетках *Allium sera* L. в диапазоне концентраций 0,0005 — 1 мг/л при пролонгированном действии препарата. Зависимость доза — эффект имеет нелинейный S-образный характер с выходом на “плато” при концентрациях, больших 0,2 мг/л. В диапазоне концентраций до 0,01 мг/л наблюдается тенденция увеличения метафазного пула митотических клеток. При действии более высоких концентраций происходит увеличение профазного индекса. Наибольшая доля клеток на стадии метафаза — в точке перехода S-образности кривой доза — эффект. Для клеток первого митоза существует обратная связь относительной эффективности мутагена от величины его концентрации в пересчете на единицу дозы для всех исследованных концентраций. Низкая концентрация МС (0,0005 мг/л) в 76,92 раза эффективнее высокой концентрации мутагена (1 мг/л) при пересчете на единицу дозы. Аппроксимация экспериментальных данных полиномными функциями показала, что наиболее адекватно кривая доза — эффект описывается полиномом четвертой степени.

**Ключевые слова:** митомицин С, *Allium sera* L., кривая доза — эффект.

QUANTITATIVE ANALYSIS  
OF THE CYTOGENETICS EFFECTS  
INDUCED OF MYTOMICIN C.  
THE CHARACTERISTIC  
OF THE CURVE THE DOZE — EFFECT

V.M. Shkarupa, I.R. Barylak

Scientific Center for Radiation Medicine of  
Academy of Medical Sciences of Ukraine  
Ukraine, 04050, Kyiv, 53 Melnikova str.  
e-mail: [baryliak@kyivutel.net.ua](mailto:baryliak@kyivutel.net.ua)

Dependence a doze-mutagenic effect of the mytomicin C (MC) in cells *Allium sera* L. is analysed. In a range of concentration 0,0005



— 1 mg/l at the prolonged action of a preparation. Dependence the doze — effect has nonlinear S-shaped character with an output on “plateau” at concentration of great of 0,2 mg/l. In a range of concentration up to 0,01 mg/l the tendency of increase in a metaphase pool proliferating cells is observed. At action of higher concentration there is an increase in a prophase index. The greatest share of cells at a stage of a metaphase — in a point of transition of S- shaped of a curve a doze — effect. For cells of the first mitosis there is a feedback of relative efficacy of a cloudy from

size of its concentration in recalculation on unit of a dose for all investigated concentrations. Low concentration MC (0,0005 mg/l) in 76,92 times is more effective than high concentration of a cloudy (1 mg/l) at recalculation on unit of a dose. Approximation of experimental data polynomial functions has shown, that is the most adequate a curve doze — effect is described by a polynomial of the fourth degree.

*Key words:* mytomicin C, *Allium cepa* L., curve doze — effect.