



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115504** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A61K 9/00
A61P 13/00
B82Y 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 06592	(72) Винахідник(и): Фалюш Оксана Анатоліївна (UA), Соткіс Ганна Григорівна (UA), Шуба Ярослав Михайлович (UA), Резніков Олександр Григорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.06.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2017	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2017, Бюл.№ 8	(74) Представник: Брагарник Олександр Миколайович, реєстр. №326

(54) СПОСІБ ГАЛЬМУВАННЯ ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб гальмування проліферації клітин раку передміхурової залози людини in vitro полягає у додаванні полідисперсного колоїдного розчину наночастинок золота, із середнім розміром 26,4 нм з переважанням частинок розміром 21,8 нм, до культурального середовища.

UA 115504 U

Корисна модель належить до галузі фармацевтики, медицини, онкології.

Рак передміхурової залози (ПЗ) є гормонозалежне злоякісне захворювання, яке в багатьох випадках ефективно лікується засобами андрогенної депривації. Разом з тим відбуваються пошуки інших препаратів для терапії цієї патології, які здатні впливати на пухлину. Одним з нових напрямків в розробці медикаментозних препаратів є використання нанотехнологій із застосуванням наночастинок золота, що пояснюється його унікальними властивостями.

Авторами в результаті проведених досліджень було виявлено здатність наночастинок золота пригнічувати проліферацію андрогенчутливої лінії клітин LNCaP, що робить перспективним їх застосування для дослідження гормонозалежних злоякісних пухлин.

На основі отриманих даних було розроблено спосіб гальмування проліферації клітин раку передміхурової залози людини *in vitro*, а саме шляхом застосування препарату полідисперсного колоїдного розчину наночастинок золота, стабілізованих полівінілпіролідом, із середнім розміром 26,4 нм з переважанням частинок розміром 21,8 нм (42 % від загальної кількості наночастинок).

У заявці US 2010034735 пропонується використання наночастинок золота для діагностики і лікування онкологічних захворювань, який полягає у застосуванні кон'югованих з фотосенсибілізаторами або трейсерами для позитронної емісійної томографії наночастинок золота.

Uz M. та ін. у статті The Effect of PEG Grafting Density and Hydrodynamic Volume on Gold Nanoparticle-Cell Interactions: An Investigation on Cell Cycle, Apoptosis and DNA Damage (M. Uz, V Bulmus, S Alsoy Altinkaya // *Langmuir*. 2016) показали гальмування росту культури андрогеннечутливих клітин раку передміхурової залози лінії PC-3 під впливом наночастинок золота, покритих поліетиленгліколем. (прототип) Jianfeng Guo та ін. у статті Bioconjugated Gold Nanoparticles Enhance Cellular Uptake: A Proof of Concept Study for siRNA Delivery in Prostate Cancer Cells (J Guo, CM. O'Driscoll, J.D. Holmes, K. Rahme // *Int J Pharm*. 2016. - V. 16. - P. 30407-30410) дослідили вплив кон'югатів наночастинок золота з антитілами проти фолатних рецепторів або з трансферинном, на лінії клітин раку передміхурової залози PC-3 та LNCaP. Результати їх досліджень показали, що функціоналізовані наночастинок золота мають здатність здійснювати доставку потенціальних лікарських засобів таргетної терапії у лікуванні раку передміхурової залози.

Фіг. 1 Вплив наночастинок золота на загальну кількість клітин (відсотки відносно приросту) андрогенчутливої лінії клітин LNCaP на 4-й день інкубації.

Фіг. 2 Мікрофотозображення андрогенчутливої лінії клітин LNCaP після 4-х днів інкубації.

Фіг. 1.

Стовпчики відображають загальну кількість клітин на 4-й день інкубації у 6-ти групах контрольній (інтактній); додавання етанолу; додавання полівінілпіролідону; додавання наночастинок золота; стимуляція дигідротестостероном; додавання наночастинок золота на тлі стимуляції дигідротестостероном.

Фіг. 2.

На мікрофотографіях показано моношар клітин лінії LNCaP після 4-х днів інкубації 6-ти груп контрольній (інтактній); додавання етанолу; додавання полівінілпіролідону; додавання наночастинок золота; стимуляція дигідротестостероном; додавання наночастинок золота на тлі стимуляції дигідротестостероном.

У результаті проведених експериментів було виявлено, що додавання полідисперсного колоїдного розчину наночастинок золота, із середнім розміром 26,4 нм з переважанням частинок розміром 21,8 нм, до середовища культури андрогенчутливих клітин раку передміхурової залози людини лінії LNCaP, гальмує проліферацію злоякісних клітин.

Приклади

Загальна схема досліджень

В досліді використано андрогенчутливі клітини раку простати людини лінії LNCaP. Клітини культивували в чашках Петрі діаметром 35 мм на покривних скельцях розміром 22×22 мм при 37 °C в інкубаторі із зволоженою атмосферою 95 % повітря та 5 % CO₂, використовуючи поживне середовище RPMI-1640 (з глютаміном) (Sigma, США) із додаванням 10 % фетальної телячої сироватки та гентоміцину 250 мг/л. Після того як моношар клітин на покривному склі становив 50-60 % поверхні скла, починали додавати досліджувані речовини щоденно протягом 96 год. із заміною культурального середовища.

Цитологічні препарати аналізували на світлооптичному рівні за допомогою мікроскопа Leica DME (Leica Microsystems, Німеччина). Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Canon Power Shot A650 IS.

Приклад 1 Культивування клітин з додаванням наночастинок золота, етанолу, полівінілпіролідону або 5 α -дигідротестостерону.

Контрольними групами були: а) інтактний контроль; б) клітини, які вирощувались за стандартних умов із додаванням 96 % етанолу (кінцева концентрація у культуральному середовищі 1 %); в) клітини, до культурального середовища яких додавали спиртовий розчин полівінілпіролідону в концентраціях 0,33, 3,33 та 33,35 мкг/мл відповідно до концентрацій наночастинок золота; г) клітини, до культурального середовища яких додавали спиртовий розчин наночастинок золота у концентраціях 0,1, 1,0 або 10 мкг/мл; д) клітини, до культурального середовища яких додавали спиртовий розчин 5 α -дигідротестостерону (кінцева концентрація 5 α -дигідротестостерону 10^{-4} М, етанолу – 1 %); е) клітини, до культурального середовища яких під час інкубації додавали наночастинки золота 10 мкг/мл на тлі стимуляції проліферації 5 α -дигідротестостероном (10^{-4} М).

Приклад 2 Підрахунок загальної кількості клітин лінії LNCaP

Клітини відокремлювали з поверхні скелець помірною трипсинізацією і осаджували центрифугуванням протягом 3 хв. на 3200 обертах Життєздатність клітин оцінювали з використанням 0,3 % водного розчину трипанового синього.

Підрахунок кількості клітин здійснювався за загальноприйнятою методикою в камері Горяєва. (Фіг. 1).

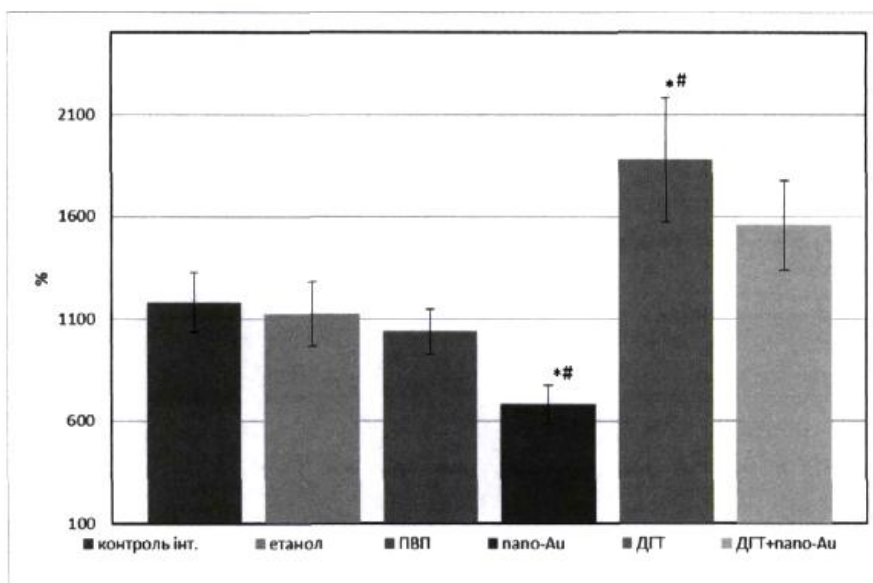
Приклад 3 Морфологічне дослідження клітин лінії LNCaP Для морфологічного аналізу, клітини на поверхні скелець фіксували 4 % параформальдегідом у фосфатному буфері, потім промивали дистильованою водою, інкубували 2 год. з тритоном 100 і фарбували гематоксиліном Бемера (Фіг. 2).

Статистичні методи

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Стюдента. Розрахунок середніх показників здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Excel. Різницю між досліджуваними групами показниками вважали статистично вірогідною при значенні $P < 0,05$.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб гальмування проліферації клітин раку передміхурової залози людини in vitro, який полягає у додаванні полідисперсного колоїдного розчину наночастинок золота, із середнім розміром 26,4 нм з переважанням частинок розміром 21,8 нм, до культурального середовища.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що гальмування проліферації клітин раку передміхурової залози людини in vitro здійснюється в культурі андрогенчутливих ракових клітин лінії LNCaP.
3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що гальмування проліферації андрогенчутливих ракових клітин лінії LNCaP здійснюється за допомогою нефункціоналізованих наночастинок золота.
4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що наночастинки золота застосовують в концентрації від 5 до 10 мкг/мл.



Фіг. 1

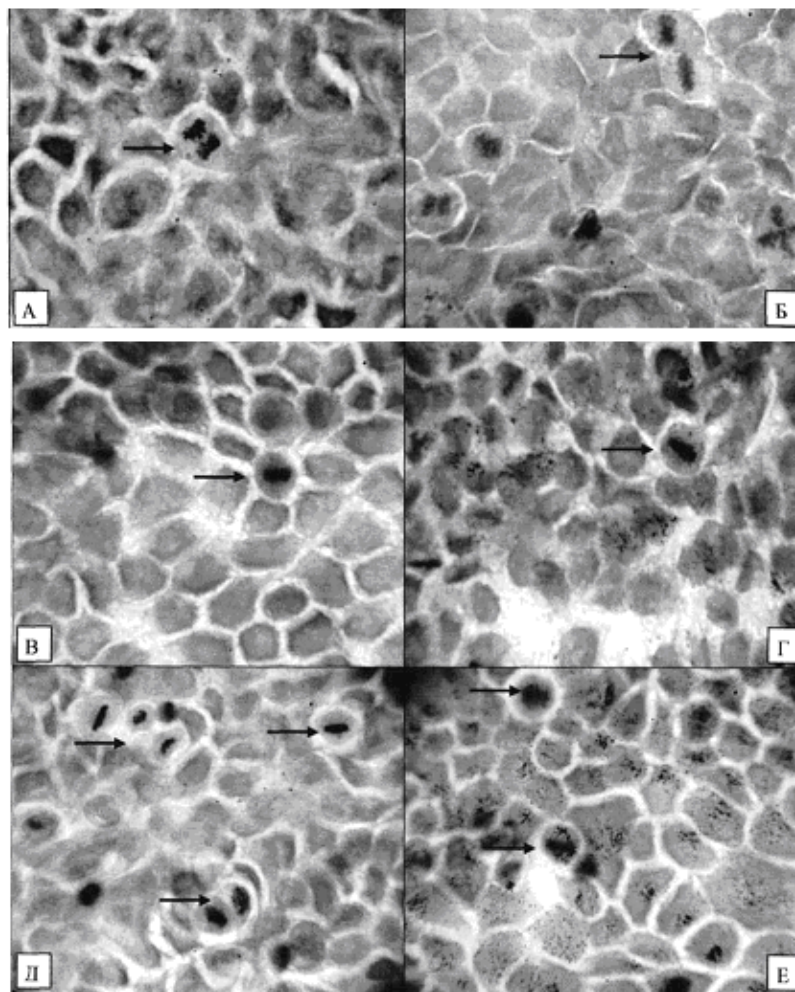


Fig. 2

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601