



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **116236**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 5/22 (2006.01)

G01N 21/91 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 12382	(72) Винахідник(и): Шкорбатов Юрій Георгійович (UA), Ніколов Олег Тимофійович (UA), Кузнецов Костянтин Андрійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.12.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.05.2017	(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА, пл. Свободи, 4, м. Харків, 61077 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2017, Бюл.№ 9	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО ЕФЕКТУ ГАММА-ВИПРОМІНЮВАННЯ

(57) Реферат:

Спосіб визначення біологічного ефекту гамма-випромінювання полягає у дослідженні показників життєздатності біологічного об'єкта, що зазнав впливу гамма-випромінювання. Як біологічний об'єкт, що досліджують, використовують клітини букального епітелію людини, а як показник пошкодження клітин - показник конденсації хроматину в ядрі. При спостереженні змін у клітинах людини під впливом гамма-випромінювання за допомогою світлового мікроскопа як вітальний барвник використовують орсеїн.

UA 116236 U

Корисна модель належить до радіаційної біології і може бути використана для визначення біологічного ефекту гамма-випромінювання, а саме для визначення впливу гамма-випромінювання на клітини людини та ступінь його впливу на організм людини в цілому.

Відомий спосіб визначення наслідків гострого поєднаного радіаційного ураження [1].
5 Недоліком цього способу є обмеженість дозового діапазону - найменша доза, з якої може застосовуватись даний спосіб, становить 4 Гр.

Також відомий спосіб оцінки радіаційного ураження за вмістом альфа-меланоцитстимулюючого гормону та серотоніну у біологічних рідинах організму [2]. Недоліком даного способу є неможливість його застосування у випадках зі зменшеною масою тіла
10 постраждалих від опромінення.

Відомий також спосіб оцінки радіаційного впливу за забарвленням зразків тканин тіофлавіном [3]. Основний недолік цього способу - наявність тільки якісної оцінки радіаційного ураження у відносно невеликому діапазоні доз (до 0,5 Гр).

Крім того, існує спосіб кількісної оцінки радіаційного ураження організму за показником
15 вмісту гранулоцитів та тромбоцитів у периферичній крові [4]. Загальним недоліком останніх трьох вищеписаних способів є необхідність втручання у внутрішнє середовище організму.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб визначення біологічного ефекту гамма-випромінювання, що базується на використанні зв'язаних з флуоресцентним барвником антитіл до фосфорильованого гістону γ -H2AX як біомаркер пошкоджень ДНК при дії гамма-
20 випромінювання [5]. Даний спосіб є достатньо інформативним, дозволяючи чисельно виражати ступінь радіаційного ураження, він може бути використаний на різних типах клітин (у т.ч. й на клітинах букального епітелію), але висока вартість препаратів антитіл до гістону γ -H2AX, які зв'язані з флуоресцентним барвником та необхідність застосування дорогого флуоресцентного мікроскопа обмежує застосування цієї методики.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб визначення біологічного ефекту гамма-випромінювання та ступінь його дії на організм людини за показником
25 конденсованості хроматину в ядрах клітин букального епітелію [6].

Поставлена задача вирішується тим, що як біологічний об'єкт, що досліджують, використовують клітини букального епітелію людини, а як показник стресової реакції клітин -
30 кількість гранул гетерохроматину в клітинному ядрі.

Найкращого результату досягають коли як вітальний барвник використовують орсеїн.

Спосіб здійснюють шляхом обробки суспензії клітин людини гамма-випромінюванням, забарвлення клітин вітальним барвником, наприклад орсеїном, та підрахунку кількості гранул
35 конденсованого хроматину в ядрах клітин.

Пропонований спосіб може бути реалізований наступним чином.

Клітини букального епітелію зіскоблюють за допомогою тупого шпателью з внутрішньої
поверхні щоки донора, потім помішують у буферний розчин наступного складу: 3,03 мМ фосфатний буфер (pH=7,0) з додаванням 2,89 мМ CaCl_2 при температурі 20-25 °С. Клітини зберігають з моменту вилучення з організму донора не більш 4 годин при температурі 20-25 °С.
40 Клітини, розподілені по пробірках Ейпендорфа в контейнері, оброблюють γ -випромінюванням. Як джерело гамма-випромінювання використовували гамма-установку "Исследователь-1" з ^{60}Co потужністю 0,007 Гр/с. Клітини обробляли дозами 0,5, 1, 2, 3, 4 та 5 Гр. Доза, отримана клітинами, визначалась експозицією - від 72 до 720 с. Через 2 хвилини після обробки клітини забарвлюють орсеїном (45 %) [7]. Вміст гетерохроматину визначають методом світлової
45 мікроскопії при збільшенні 400х.

Аналізують 200 клітин для визначення кількості гранул гетерохроматину, потім визначають величину стандартної похибки середнього. Статистичну обробку результатів проводять за Стьюдентом.

Суть запропонованого способу пояснюється прикладами.

В наведених прикладах (табл. 1 - табл. 4) визначали кількість гранул гетерохроматину в
50 ядрах клітин букального епітелію як показник ступеня стресової реакції клітин на дію гамма-випромінювання дозою від 0,5 до 5 Гр. Підрахунок проводили через 10 хв. після забарвлення препаратів орсеїном.

Таблиця 1

Вплив гамма-випромінювання на ступінь конденсації хроматину в клітинах букального епітелію донора чоловічої статі віком 18 років.

	Доза гамма-випромінювання, Гр					
	0,5	1	2	3	4	5
Контроль	14,3±0,23					
Кількість гранул гетерохроматину, од.	13,9±0,22	14,4±0,22	15,2±0,21	15,0±0,2	16,0±0,24	15,9±0,2

Таблиця 2

Вплив гамма-випромінювання на ступінь конденсації хроматину в клітинах букального епітелію донора чоловічої статі віком 22 роки.

	Доза гамма-випромінювання, Гр					
	0,5	1	2	3	4	5
Контроль	11,5±0,24					
Кількість гранул гетерохроматину, од.	12,5±0,23	13,5±0,23	13,9±0,23	16,2±0,28	17,9±0,31	18,3±0,28

Таблиця 3

Вплив гамма-випромінювання на ступінь конденсації хроматину в клітинах букального епітелію донора чоловічої статі віком 23 роки.

	Доза гамма-випромінювання, Гр					
	0,5	1	2	3	4	5
Контроль	13,5±0,3					
Кількість гранул гетерохроматину, од.	15,1±0,38	15,1±0,43	16,8±0,38	17,8±0,39	19,4±0,4	20,0±0,37

Таблиця 4

Вплив гамма-випромінювання на ступінь конденсації хроматину в клітинах букального епітелію донора чоловічої статі віком 60 років.

	Доза гамма-випромінювання, Гр					
	0,5	1	2	3	4	5
Контроль	13,0±0,17					
Кількість гранул гетерохроматину, од.	13,7±0,16	13,4±0,17	14,2±0,18	14,6±0,16	14,6±0,17	15,3±0,21

5

Наведені результати (табл. 1 - табл. 4) свідчать про збільшення конденсованості хроматину в ядрі під дією гамма-випромінювання. Барвник не впливає на ефект, так як фіксує клітину у стані на момент опромінення. Зі збільшенням отриманої дози гамма-випромінювання підвищується вміст гранул гетерохроматину в ядрах клітин. Також існує різниця в реакції клітин донорів, різних за віком - у випадку з клітинами донорів віком 18 та 60 років різниця між контролем та клітинами опроміненими дозами 3-5 Гр менш помітна та складає 10-17 %, тоді як клітини донорів віком 22 та 23 роки виявили підвищення вмісту гранул гетерохроматину на 50-60 %.

10

Отже, спосіб визначення біологічного ефекту гамма-випромінювання за показником конденсованості хроматину дозволяє вимірювати ступінь впливу випромінювання в залежності від величини отриманої дози. Також, даний показник залежить від віку організму, клітини якого потрапили під опромінення.

15

Джерела інформації:

1. Пат. 71134 А Україна, МПК (2006) А61В 10/00 G01N 33/48 (2006.01). Спосіб оцінки ступеня тяжкості гострого поєднаного радіаційного ураження /Р.Р. Бойчук, М.А. Іванчук; власник

20

Буковинська державна медична академія Міністерства охорони здоров'я України. - № 2003098836; заявл. 29.09.2003; опублік. 15.11.2004, Бюл. № 11 - 5 с.

2. Пат. 33415 Україна, МПК (2006) А61В 5/00. Спосіб діагностики радіаційного ураження головного мозку /О.М. Коваленко, О.В. Камінський, Л.П. Дерев'яно, Н.П. Атаманюк, К.О. Ваколюк; власник Науковий центр радіаційної медицини АМН України. - № u200800880; заявл. 25.01.2008; опублік. 25.06.2008, Бюл. № 12 - 4 с.

3. Пат. 10261 А Україна, МПК (2006) А61В 6/00 G01Т 1/161 (2006.01). Спосіб оцінки радіаційного ураження організму /Є.І. Суслів, Т.П. Підгаєвська, В.С. Ткачшин; власник Інститут фтизіатрії та пульмонології ім. Ф.Г. Яновського. - № 95073453; заявл. 24.07.1995; опублік. 25.12.1996, Бюл. № 4 - 2 с.

4. Пат. 31409 Україна, МПК А61В 5/145 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01). Спосіб кількісної оцінки радіаційного ураження /Д.О. Білий, В.Г. Бебешко; власник Науковий центр радіаційної медицини АМН України. - № U200712704; заявл. 16.11.2007; опублік. 10.04.2008, Бюл. № 7 - 14 с.

5. Rothkamm K. γ -H2AX as protein biomarker for radiation exposure /K. Rothkamm, S. Horn //Annali dell'Istituto Superiore di Sanita. - Rome, 2009 - Vol. 45, No. 3 - P. 265-271.

6. Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress. In: New Developments in Chromatin Research /Editors: Neil M. Simpson and Valerie J. Stewart //Nova Science Publishers, Inc. - New York, 2012. - Chapter 6. - P. 123-144.

7. Kuznetsov K. The effect of ionizing radiation in combination with static magnetic field and microwave radiation on chromatin state in isolated human buccal epithelium cells /K. Kuznetsov, D. Miroshnik, O. Nikolov, Y. Shckorbatov //Вісник Львівського університету. Серія біологічна. - Львів, 2014. - Вип. 68. - С 197-205.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення біологічного ефекту гамма-випромінювання, що полягає у дослідженні показників життєздатності біологічного об'єкта, що зазнав впливу гамма-випромінювання, який **відрізняється** тим, що як біологічний об'єкт, що досліджують, використовують клітини

букального епітелію людини, а як показник пошкодження клітин - показник конденсації хроматину в ядрі.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при спостереженні змін у клітинах людини під впливом гамма-випромінювання за допомогою світлового мікроскопа як вітальний барвник використовують орсеїн.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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