



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **45458** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/15

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕКИ ВОДОРОЗЧИННИХ РЕЧОВИН ЗА ДОПОМОГОЮ КЛІТИННОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ

1

2

(21) u200905847

(22) 09.06.2009

(24) 10.11.2009

(46) 10.11.2009, Бюл.№ 21, 2009 р.

(72) СТЕГНІЙ БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, СТЕГНІЙ
МАРИНА ЮРІЇВНА, ЮРЧЕНКО ОЛЬГА МИКОЛАЙ-
ВНА, ГОЛОВКО ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧ-
НОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ(57) Спосіб визначення якості та безпеки водороз-
чинних речовин за допомогою клітинної тест-

системи, що включає підготовку проб препарату, вирощування клітин у поживному середовищі, порівняння з контролем в культурах, тест-систему, який **відрізняється** тим, що проводять оцінку морфологічних та функціональних показників клітинних ліній, порівнюють з контролем без додавання дослідного агента, а як тест-систему використовують перещеплювані культури нирки вівці (PO), коронарних судин (KST) та легень ембріонів (LEK), які висівають на мікропланшети.

Корисна модель відноситься до ветеринарної медицини, клітинної біології та біотехнології і може використовуватись для оцінки токсичності хімічних речовин, початкової сировини, лікарських препаратів, косметологічних засобів, підбору доз нових лікарських препаратів, а також захисної дії антитоксичних речовин.

Заміна тварин, яких використовують у якості тест-об'єктів для оцінки токсичності хімічних речовин має важливе гуманітарне значення, а також дає можливість дотримуватись стандартного процесу культивування перещеплюваних клітинних ліній, та має переваги відносно простого одержання їх у необхідній кількості.

Відомо спосіб визначення токсичності хімічних речовин (Пат. RU №2079130, кл. G01N 33/48, от 21.10.1993 г. Спосіб виявлення токсичності хімічних агентів на культурах фібробластів кожи и легких эмбриона человека). Недоліком є те, що за допомогою цього способу цитотоксичні властивості визначаються тільки за біохімічними показниками.

Існує спосіб визначення дії на клітину хімічних агентів (Пат. RU №2089905, кл. G01N 33/48, от 23.06. 1994 г. Спосіб оценки характера воздействия на клетку различных химических агентов). Але у цьому способі потрібно спеціальне обладнання, так як при внутріклітинному електрофорезі вимірюють амплітуду зміщення клітинних ядер.

Найбільш близьким за технічною суттю до способу, що заявляється є спосіб визначення цитотоксичної дії (Пат. RU №2226275, кл. G01N 33/15, G01N 33/48, от 15.04.2002 г. Спосіб опре-

деления цитотоксического эффекта и ростстимулирующей активности веществ для доклинических испытаний). За цим способом проводять підготовку проб препарату, вирощування клітин на поживному середовищі, підрахунок живих клітин, порівняння з контролем в культурах. У якості тестованих клітин використовують тест-систему, яка складається із чотирьох культур ссавців, а саме: диплоїдних фібробластів, міобластів людини, мінімальних гіпотом та гібридом. Це рішення може бути прототипом. Недоліком цього рішення є те, що використовують 4 клітинні лінії, з яких 2 диплоїдні, які мають обмеження життєздатності - не більш чим 100 пасажів; гібридні клітини не мають аналогів в організмі людини та тварин.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення якості та безпеки водорозчинних речовин за допомогою клітинної тест-системи, що включає підготовку проб препарату, вирощування клітин у поживному середовищі, порівняння з контролем в культурах, тест-систему шляхом проведення оцінки морфологічних та функціональних показників клітинних ліній, порівняння з контролем без додавання дослідного агента, а в якості тест-системи використання перещеплюваних культур почки вівці (PO), коронарних судин (KST) та легень ембріонів (LEK), які висівають на мікропланшети з метою всебічно оцінити вплив дослідних речовин на клітини різних органів.

Порівняльний аналіз запропонованого рішення із прототипом дозволяє зробити висновок, що використання у якості тест-системи перещеплюваних

(13) **U**
(11) **45458**
(19) **UA**

культур почки вівці (PO), коронарних судин (KST) та легень ембріонів (LEK), які висівають на мікопланшети та порівняння з контролем без додавання дослідного агенту, відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконують таким чином:

Спочатку готують клітинну тест-систему. Перещеплювані культури нирки вівці (PO), коронарних судин (KST) та легень ембріонів (LEK) висівають на мікропланшети з концентрацією клітин 200-250 тис/см³ в поживному середовищі, яке містить 10% ембріональної сироватки BPX та рівні об'єми середовищ Ігла та 199. Після чого клітинну систему культивують в CO₂-інкубаторі не менше доби з послідовним внесенням кількох розведень дослідної речовини.

Оцінку цитотоксичної дії дослідних речовин проводять за допомогою мікроскопії протягом 24-48-72 годин після внесення цільного препарату та його розведень. Зокрема, оцінюють такі морфофункціональні характеристики, як морфологію клітин і динаміку формування моношару в лунках планшети з дослідною речовиною та в контролі в лунках без додавання дослідного агенту.

Приклад 1

Оцінку цитотоксичної дії дослідних речовин проводили за допомогою мікроскопії протягом 24-48-72 годин після внесення цільного препарату та його розведень.

Морфологія у нормі для клітин нирки вівці (PO) та легень ембріонів (LEK) була представлена клітинами, які варіюють у розмірах з округленими ядрами, що мають від одного до кількох ядерців

різної форми. Максимальний пік мітотичної активності у нормі для нирки вівці (PO) відбувався на другу добу після посіву (клітини формували моношар). Для клітин легень ембріонів (LEK) максимальний пік мітотичної активності відбувався на третю добу. В досліді з цільним препаратом спостерігали округлення та зернистість клітин, іноді каріопікноз ядер, формування моношару не відбувалось.

Приклад 2

Оцінку цитотоксичної дії дослідних речовин проводили за допомогою мікроскопії протягом 24-48-72 годин після внесення цільного препарату та його розведень. Морфологія у нормі для клітин коронарних судин (KST) складалася із середніх по розміру клітин також з закругленими ядрами та ядерцями різної форми. Максимальний пік мітотичної активності у нормі для клітин коронарних судин (KST) відбувався на другу добу після посіву, також формувалася щільний моношар клітин. У випадку цитотоксичних властивостей препарату моношар не формувалася.

За допомогою цього способу були визначені цитотоксичні властивості дослідних речовин, які проявились нездатністю клітин формувати моношар, набуванням закругленості, зернистості з послідуною дегенерацією.

Одержані за допомогою тест-системи дані допоможуть визначати цим способом допустимі концентрації дослідних речовин у продуктах харчування, лікарських препаратах, косметологічних засобах.