



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60065 (13) U  
(51) МПК (2011.01)  
A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ПРОТОННОГО ЯДЕРНО-МАГНІТНОГО РЕЗОНАНСНОГО СПЕКТРОСКОПІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІНДУКЦІЇ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ АБО АПОПТОЗУ В ПОПУЛЯЦІЯХ КЛІТИН**

1

2

(21) u201013716

(22) 18.11.2010

(24) 10.06.2011

(46) 10.06.2011, Бюл.№ 11, 2011 р.

(72) МИХАЙЛЕНКО ВІКТОР МИХАЙЛОВИЧ, ФІЛЬЧЕНКОВ ОЛЕКСІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ, ЗАВЕЛЕВИЧ МИХАЙЛО ПЕТРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб протонного ядерно-магнітного резонансного спектроскопічного визначення індукції диференціювання або апоптозу в популяціях клітин під впливом фармакологічно активних речовин, який **відрізняється** тим, що за співвідношенням між сигналами  $\text{CH}_3$  і  $\text{CH}_2$  резонансів, а саме за зменшенням відношення інтегральних площ сигналів  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  визначається наявність процесу диференціювання у популяції клітин.

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, біології і фармакології, а саме до способів визначення індукції апоптозу або диференціювання в популяціях клітин під впливом фармакологічно активних речовин.

Застосування диференційовальної терапії в онкології потребує визначення співвідношення між процесами диференціювання та апоптозу в популяції клітин, яка зазнає впливу диференційовального агенту. Це важливо для оцінки внеску як диференціювання, так і апоптозу у сумарний ефект препарату.

Для визначення апоптозу та диференціювання існує чимало методів, які базуються на певних ознаках цих процесів, що й визначають спосіб їхньої реєстрації (морфологія клітин, визначення їхнього функціонального стану, визначення певних специфічних маркерів диференціювання імунологічними, біохімічними, цитохімічними методами, тощо). Кожен з методів визначення має як свої переваги, так і певні обмеження. Оскільки жоден з них не є універсальним, виникає потреба у розширенні арсеналу можливих способів оцінки диференціювання або апоптозу з метою якомога ширшого врахування всіх ознак цих процесів. Існує також потреба в одночасному визначенні диференціювання та апоптозу в популяціях клітин під впливом тих чи інших фармакологічно активних речовин.

Метод протонного ( $^1\text{H}$ ) ядерно-магнітного резонансу (ЯМР) дозволяє зареєструвати зміни інтенсивності сигналів метиленового ( $\text{CH}_2$  при 1,3 м.д.) і метильного ( $\text{CH}_3$  при 0,9 м.д.) резонансів [1]. Природа цих резонансів пов'язана з особливостями

ми обміну ліпідів в клітині, а також змінами складу і текучості клітинної мембрани [2]. Зменшення мікров'язкості мембран та збільшення кількості мембранних ліпідів в сумі призводять до росту метиленового та метильного резонансів. Раніше було продемонстровано, що інтенсивність сигналу  $\text{CH}_3$  резонансу майже не змінюється при апоптозі клітин, в той час як інтенсивність сигналу резонансу  $\text{CH}_2$  може зростати відносно нього в кілька разів, причому такі зміни інтенсивності сигналів  $\text{CH}_3$  і  $\text{CH}_2$  резонансів корелюють із розвитком процесу апоптозу в клітинах, що дає змогу застосовувати таку ознаку для визначення апоптозу [1].

Збільшення рівнів холін-вмісних метаболітів в разі диференціювання клітин було продемонстровано за допомогою  $^{31}\text{P}$ -ЯМР на прикладі еритроїдного диференціювання клітин еритролейкемії [3]. На цей час немає відомостей про зміни інтенсивності сигналів  $\text{CH}_3$  і  $\text{CH}_2$  резонансів у процесі диференціювання клітин.

Власне опис корисної моделі, що заявляється. В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб для визначення диференціювання або апоптозу в популяції клітин на основі відомого методу протонної ядерно-магнітнорезонансної спектроскопії.

Поставлена задача вирішується тим, що для кількісного аналізу змін складу мембран клітини, які свідчили б про диференціювання або апоптоз клітин або ж про поєднання цих двох процесів в популяціях клітин запропоновано застосувати вимірювання сигналів метиленового та метильного резонансів в препаратах клітин, які зазнали впливу

UA (11) 60065 (13) U

агентів, що можуть спричинити індукцію апоптозу або диференціювання.

Одержаний технічний результат полягає у тому, що за такою ознакою, як співвідношення між сигналами  $\text{CH}_3$  і  $\text{CH}_2$  резонансів, що визначається за методом протонної ядерно-магнітнорезонансної спектроскопії, можна судити про наявність процесу диференціювання у популяції клітин. А саме, в разі типового процесу диференціювання відношення інтегральних площ сигналів  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  зменшується.

Клітини перещеплюваних ліній лейкозів людини культивували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % сироватки ембріонів корів. Клітини підтримували у вигляді суспензії та після досягнення максимальної щільності росту розводили свіжим середовищем у співвідношенні 1:2 - 1:3 для подальшого культивування. Клітини в логарифмічній фазі росту обробляли відомими індукторами диференціювання або апоптозу. Зразки клітин суспендували в 0,6 мл PBS- $\text{D}_2\text{O}$  і поміщали на лід. Спектри протонного магнітного резонансу реєстрували на ЯМР-спектрометрі Varian Mercury 300BB ("Varian", США) з робочою частотою 300 МГц при температурі 4 °С. Підсумовували по 128 сигналів спаду вільної індукції при 16 К; спектри накопичували із затримкою релаксації 10 с. За стандарт правив скляний капіляр з 0,1 % розчином триметилсіалопропіонової кислоти в  $\text{D}_2\text{O}$ , сигнал якої відповідав 0 м.д. Стандартизовані області резонансів  $\text{CH}_3$ - і  $\text{CH}_2$ -протонів мобільних ліпідних доменів (МЛД), а також протонів холіну інтегрували за допомогою комп'ютерної програми VNMR ("Varian"). Значення інтенсивності сигналів  $^1\text{H}$ -ЯМР виражали в відносних одиницях, нормалізованих за сигналом  $\text{CH}_3$ -протонів. Для оцінки рівня МЛД в клітинах розраховували співвідношення інтеграль-

них величин метиленового і метилового ( $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ ) сигналів. Одержані результати співставляли з результатами морфологічного дослідження препаратів клітин, за якими оцінювали наявність диференціювання або апоптозу в популяції.

Приклади практичного застосування корисної моделі

Приклад 1. Клітини К-562 хронічної мієлоїдної лейкемії людини інкубували в присутності типового індуктора апоптозу вепезиду. Фіг. 1-2 подає ПМР-спектри клітин після такого культивування, а також інтактних клітин. Значення інтегральних площ  $^1\text{H}$ -ЯМР-сигналів в клітинах лінії К-562 при дії зазначеної речовини, яка індукуює апоптоз, наведені в таблиці 1.

Приклад 2. Клітини К-562 хронічної мієлоїдної лейкемії людини інкубували в присутності типового індуктора еритроїдного диференціювання диметилсульфоксиду (ДМСО). Фіг. 3-4 подає ПМР-спектри клітин після такого культивування, а також інтактних клітин. Значення інтегральних площ  $^1\text{H}$ -ЯМР-сигналів в клітинах лінії К-562 при дії зазначеної речовини, яка індукуює диференціювання, наведені в таблиці.

Як бачимо, типовий індуктор апоптозу вепезид викликає в клітинах К-562 збільшення вмісту МЛД (за збільшенням співвідношення  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ ) та зменшення рівня холіну. Навпаки, типовий індуктор еритроїдного диференціювання в цій системі, диметилсульфоксид, спричинює зменшення співвідношення  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  та збільшення рівня холіну.

Результати морфологічного дослідження препаратів клітин, пофарбованих за Папенгеймом, підтверджують наявність диференціювання або апоптозу у пробах, в яких визначали співвідношення  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  методом ЯМР.

Таблиця

Значення інтегральних площ  $^1\text{H}$ -ЯМР-сигналів в клітинах лінії К-562 при дії речовин, які індукують апоптоз або диференціювання

Тип впливу	$^1\text{H}$ -ЯМР сигнали, м.д.	
	$(\text{CH}_2)_n/\text{CH}_3$	Протони холіну, від. од.
Інтактні клітини К-562	1,64±0,17	0,75±0,11
+ Вепезид (40 мкмоль/л, 18 год.)	3,26±0,46	0,22±0,03
+ ДМСО (2 %, 18 год.)	1,08±0,17	1,82±0,03

Наведені приклади практичного використання запропонованого способу свідчать про те, що з його допомогою можна визначити наявність диференціювання у популяції клітин, які зазнали впливу фармакологічного препарату, за величиною співвідношення  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  в порівнянні з такою в контролі.

Таким чином, заявлений спосіб дозволяє за допомогою відомого методу протонної ЯМР-спектроскопії визначити ще одну додаткову ознаку диференціювання клітин, яка безпосередньо пов'язана зі змінами стану мембран клітин в процесі диференціювання.

Заявлений спосіб розширює можливості методу протонної ЯМР-спектроскопії, дозволяючи поширити сферу його застосування стосовно процесів диференціювання.

Перелік фігур до заявки на корисну модель:

Фіг. 1-2. ПМР-спектри клітин лінії К-562 при дії індуктора апоптозу

Фіг. 1 - вепезид в дозі 40 мкг/мл, 18 год.;

Фіг. 2 - інтактні клітини К-562

Фіг. 3-4. ПМР-спектри клітин лінії К-562 при дії індуктора диференціювання

Фіг. 3 - інтактні клітини К-562;

Фіг. 4 - 2 % ДМСО, 18 год.

Джерела інформації

1. Blankenberg F.G., Katsikis P.D., Storrs R.W. et al. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // Blood. - 1997. - Vol. 89, N 10. - P. 3778-3785.

2. Hakumaki J.M., Brindle K.M. Techniques: Visualizing apoptosis using nuclear magnetic

resonance // Trends Pharmacol. Sci. - 2003. - Vol. 24, No. 3.-P. 146-149.

3. Carpinelli G., Podo G., Di Vito M. et al. Modulations of glycerophosphorylcholine and

phosphorylcholine in Friend erythroleukemia cells upon in vitro-induced erythroid differentiation: a  $^{31}\text{P}$  NMR study // FEBS Lett. - 1984. - Vol. 176, N1. - P. 88-92.

