



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66526 (13) U

(51) МПК

A61N 2/06 (2006.01)

A61N 2/12 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З МАГНІТОКЕРОВАНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

1

2

(21) u201107008

(22) 03.06.2011

(24) 10.01.2012

(46) 10.01.2012, Бюл.№ 1, 2012 р.

(72) ЛЕВІТІН ЄВГЕН ЯКОВИЧ, КОВАЛЬ АЛЛА
ОЛЕКСАНДРІВНА, МАЛОШТАН ЛЮДМИЛА МИ-
КОЛАЇВНА(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ(57) Спосіб визначення цитотоксичної дії лікарсь-
ких засобів з магнітокерованими властивостями

шляхом додавання до зразка, що досліджується, клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів з подальшим визначенням за допомогою світлової мікроскопії живих і пошкоджених клітин у нативному мазку, забарвленому метиленовою синню, який **відрізняється** тим, що після додавання клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів зразок, що досліджується, піддають зовнішній дії поля постійного магніту протягом 2-20 хвилин до розшарування прозорої та непрозорої фаз.

Корисна модель належить до фармації та мікробіології, а саме до способів вивчення цитотоксичної дії магнітних лікарських препаратів - комплексних лікувальних або діагностичних засобів, у складі яких є речовини з магнітокерованими властивостями.

Відомий цілий ряд магнітних лікарських препаратів, таких як: магнітні рідини, магнітореологічні суспензії, магнітні мікрокапсули, магнітні пластирі, магнітні супозиторії [1]. Магнітним наповнювачем цих препаратів є вискодисперсні частинки магнітного матеріалу, найчастіше феритів різного складу [2]. Широкому впровадженню магнітних лікарських препаратів заважає відсутність нормативних методів визначення їх небезпечності для організму людини.

Тести на цитотоксичність є одним із перших методів мікробіологічного аналізу in vitro нових лікарських засобів у межах доклінічних випробувань [3]. Широке впровадження у експериментальних альтернативних методів дослідження, у тому числі і культуральних клітин, дає можливість етичного та економного використання тварин у сучасних біологічних дослідженнях. Культуральні клітини високочутливі до дії малих кількостей досліджуваних речовин, ефект яких на цілий організм може виявлятися лише при великих дозуваннях та через значний час [4].

Найбільш близьким до корисної моделі є модифікований метод Шрека для визначення токсичної активності лікарських засобів [5]. Згідно з цим методом, як культуральні, використовують клітини червоного кісткового мозку щурів, які одержують шляхом вимивання фізіологічним розчином на холод. На початку експерименту розчини, що досліджуються, за допомогою дозатора вміщують у планшетку та методом перекачки зменшують дози у 2,4, 16,64 рази. Потім тим самим дозатором у кожну чарунку вносять рівні об'єми клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів. Контроль цитотоксичного ефекту досліджуваних засобів проводять через 15,30,60 і 90 хвилин методом світлової мікроскопії. Для визначення у нативному мазку кількості "живих" клітин - без порушення цілісності мембран, та "мертвих" клітин - з порушенням цілісності і проникливості мембран, використовують метиленову синь. Клітини, які забарвлюються у синій колір, оцінюються як "мертві".

Враховуючи, що зразки магнітних лікарських препаратів мають густу консистенцію чорного кольору і не розчиняються у фізіологічному розчині, неможливо модифікованим методом Шрека визначити зміни у співвідношенні "живих" і "мертвих" клітин.

Задачею корисної моделі є створення способу визначення цитотоксичної дії магнітних лікарських

(19) UA (11) 66526 (13) U

засобів, в якому за допомогою постійного магніту досягається розшарування речовини чорного кольору, що досліджується, (непрозорої фази) і кліткової суспензії червоного кісткового мозку щурів (прозорої фази), що дозволяє визначити зміни у співвідношенні "живих" і "мертвих" клітин методом світлової мікроскопії при забарвленні метиленовою синню.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі визначення цитотоксичної дії лікарських засобів з магнітокерованими властивостями шляхом додавання до досліджуваного зразка клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів з подальшим визначенням за допомогою світлової мікроскопії живих і пошкоджених клітин у нативному мазку, забарвленому метиленовою синню, відповідно до корисної моделі передбачено, що після додавання клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів зразок, що досліджується, піддають зовнішній дії поля постійного магніту протягом 2-20 хвилин до розшарування прозорої та непрозорої фаз.

Розшарування зразків магнітних лікарських засобів (непрозорої фази) і клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів (прозорої фази) за допомогою постійного магніту засноване на особливих магнітних властивостях магнітних лікарських засобів. Час, який необхідний для розшарування зразків магнітних лікарських засобів і клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів за допомогою постійного магніту, визначається експериментально та залежить від магнітних характеристик як постійного магніту, так і магнітних лікарських засобів.

Використання постійного магніту при вивченні цитотоксичної дії магнітних лікарських засобів невідомо з літературних джерел.

Спосіб здійснюється таким чином:

На початку експерименту зразки магнітних лікарських засобів густої консистенції чорного кольору за допомогою дозатора вміщують у планшетку та методом перекачки зменшують дози в 2,4, 16,64 рази. Потім тим самим дозатором у кожній чарунці клітинну суспензію червоного кісткового мозку щурів нашаровують на зразки магнітних лікарських засобів та через 15,30,60 і 90 хвилин планшетку ставлять на постійний магніт. Під дією зовнішнього магнітного поля через 2-20 хвилин (час визначається експериментально та залежить від магнітних характеристик постійного магніта і магнітних лікарських засобів) відбувається розшарування досліджуваної речовини і клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів.

Контроль цитотоксичного ефекту проводять методом світлової мікроскопії. Для визначення у нативному мазку кількості клітин ("живих" - без порушення цілісності мембран та "мертвих" - з порушенням цілісності і проникливості мембран) використовують метиленову синь. Клітини, які забарвлюються у синій колір, оцінюються як "мертві". У кожному експерименті підраховують 100 клітин. Клітини червоного кісткового мозку щурів у фізіологічному розчині використовують як негативний контроль. Одержані експериментальні результати

статистично обробляють методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [6].

Корисна модель ілюструється прикладом.

Приклад 1. За заявленим засобом було здійснено визначення цитотоксичної дії магнітокерованого рентгеноконтрастного засобу [7] у Проблемній лабораторії морфологічних досліджень НФаУ за допомогою біотестів у культурі клітин in vitro.

В експерименті досліджувались наступні зразки:

№1 - комплексний магнітокерований рентгеноконтрастний засіб [7] складу:

барій гексаферит	30 %
"Тріомбразт"	56 %
3 % водний розчин пектину	14 %.

Намагніченість насичення цієї композиції I_s при 300 K - 19 кА/м.

№2 - синтезований барій гексаферит (намагніченість насичення I_s при 300 K -300 кА/м) [8].

№3 - препарат "Тріомбразт" (ОАО Фармак, Україна) серія 141107 [9]. №4-пектин (ДООТ 29186-91) [10].

Дослідження проводили з використанням клітин червоного кісткового мозку щурів, які одержували шляхом вимивання фізіологічним розчином на холоді.

На початку експерименту розчини, що досліджувались, за допомогою дозатора вміщували у планшетку та методом перекачки зменшували дози у 2,4, 16,64 рази. Потім тим самим дозатором у кожну чарунку вносили рівні об'єми клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів. Враховуючи, що зразки №1 та №2 мають густу консистенцію чорного кольору і не розчиняються у фізіологічному розчині, клітинну суспензію червоного кісткового мозку нашаровували на ці зразки та через 15,30,60 і 90 хвилин планшетки ставили на постійний магніт Н35В-М, який мав форму призми розміром 50 ммх30 мм* 10 мм. Згідно з ТУ У 21174514.001-96 постійний магніт Н35В-М має наступні магнітні параметри: залишкова індукція B_r - 0,9 Тл; коерцитивна сила H_{cb} - 600 кА/м. Під дією зовнішнього магнітного поля через 2 хвилини для зразка №2 та через 10 хвилин для зразка №1 (час визначено експериментально) відбувалося розшарування досліджуваної речовини і клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів.

Контроль цитотоксичного ефекту проводили методом світлової мікроскопії. Для визначення у нативному мазку кількості клітин ("живих" - без порушення цілісності мембран та "мертвих" - з порушенням цілісності і проникливості мембран) використовували метиленову синь. Клітини, які забарвлювались у синій колір, оцінювались як "мертві". У кожному експерименті підраховували 100 клітин. Клітини червоного кісткового мозку щурів у фізіологічному розчині використовували як негативний контроль. Одержані експериментальні результати статистично обробляли методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження цитотоксичності вивчених зразків за заявленим способом наведені у табл. 1 і табл. 2.

Таблиця 1

Цитотоксичність зразків №1 і №3 на клітини червоного кісткового мозку щурів

Час, хв.	Контроль кількості "мертвих" клітин, %	Ступінь розведення зразка №1 кількість "мертвих" клітин, %			Ступінь розведення зразка №3 кількість "мертвих" клітин, %		
		76	38	19	76	38	19
15	2,4±0,3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
30	3,5±0,5	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
60	5,1±0,8	1,0±0,1	0±0	0±0	1,1±0,1	0±0	0±0
90	6,7±0,7	1,2±0,1	0,9±0,01	0±0	1,2±0,1	0,7±0,03	0±0

Таблиця 2

Цитотоксичність зразків №2, №4 на клітини червоного кісткового мозку щурів

Час, хв.	Контроль, кількість "мертвих" клітин, %	Зразок №2, кількість "мертвих" клітин, %	Зразок №4, кількість "мертвих" клітин, %
15	2,4±0,3	1,9±0,6	2,1±0,4
30	3,5±0,5	3,7±0,3	3,0±0,5
60	5,1±0,8	5,0±0,5	4,9±0,7
90	6,7±0,7	6,1±0,4	6,2±0,5

Аналіз отриманих результатів дозволив зробити висновки:

1. Усі зразки, що досліджувались на моделі клітин червоного кісткового мозку щурів, не виявили цитотоксичного ефекту.

2. Кількість клітин, що пошкодились, у зразках №2, №4 була на рівні контролю залежно від часу контакту з клітинами.

3. Одержані результати при дослідженні зразків №1 і №3 свідчать на користь цитопротекторної дії останніх на клітини червоного кісткового мозку щурів. У контрольних пробах, де клітини були суспендовані у фізіологічному розчині, залежно від часу контакту спостерігалось збільшення пошкоджених клітин: через 15 хв.-2,4±0,3, через 30 хв.-3,5±0,5, через 60 хв.-5,1±0,8, а через 90 хв.-6,7±0,7. У той же час клітини, що були суспендовані у випробовуваних зразках №1 і №3, залишались непошкодженими протягом 30 хвилин, і тільки через 60 хвилин біоконтакту було зафіксовано клітини, що пошкодились.

4. Магнітокерований рентгеноконтрастний засіб не виявив цитотоксичної дії в дослідях in vitro.

Таким чином, розроблений спосіб визначення цитотоксичної дії магнітних лікарських засобів з застосуванням постійного магніту для розшарування зразків лікарських засобів чорного кольору з магнітними властивостями і клітинної суспензії червоного кісткового мозку щурів дає можливість визначити зміни у співвідношенні "живих" і "мертвих" клітин методом світлової мікроскопії та провести ефективний та достовірний контроль цитотоксичного ефекту магнітних лікарських засобів, що може бути одним із перших методів мікробіологічного аналізу in vitro нових магнітних лікарських засобів у межах доклінічних випробувань.

Джерела інформації:

1. Wilfried A. Magnetism in medicine/A. Wilfried, W. Andra, H. Nowak. - Berlin: Wiley-VCH, 2006. - P.320-331.

2. Беликов В.Г. Получение и медико-биологическое использование магнитных полей и носителей / В.Г. Беликов, А.Г. Курегян // Хим.-фармац. журн.-2001. - Т.35, № 2. - С. 27-34.

3. Blaauuboer B.J. Toxicodynamic modelling and the interpretation of in vitro toxicity data. // Toxicology Letters-2001-Vol.120-P.117-123.

4. Малышева М.В., Рязанова Р.А. Клеточные культуры - модельная тест-система в токсиколого-гигиенических исследованиях. // Тезисы докладов. 1-ый съезд токсикологов России 17-20 ноября 1998г. / Под ред. проф. Б.А.Курляндского. - М., 1998. - С. 297.

5. Маркова В.М. Модификация метода Шрека для определения антиоксидантной активности препаратов и вновь синтезированных соединений // Тез. Докл. III съезда фармацевтов Туркменской ССР. - Ашхабад, 1987. - С. 225-226.

6. Теорія ймовірностей і статистичні методи обробки результатів спостережень / Б.В. Горбуненко, Ф.Г. Дягілева, Г.В. Жиронкіна та ін. -Х.: Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2002. - С 95-100.

7. Патент на винахід № 90577 Україна, МПК (2009) А61К 49/04. Магнітокерований рентгеноконтрастний засіб / Є.Я. Левітін, А.О. Коваль, Т.О. Онопрієнко, І.О. Ведерникова, О.Л. Алтухов; заявник і патентовласник НФаУ. - Заявл. 28.07.2008; опубл. 11.05.2010, Бюл. № 9.

8. Левитин Е.Я., Коваль А.А., Цихановская И.В. и др. Изучение реакции получения гексаферрита бария - основного компонента магнитных коллоидов для фармацевтической промышленности // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. - Запоріжжя: ЗДМУ, 2006. - Вип. XV, Т.1. - С. 161-166.

9. Компендиум. Лекарственные препараты 2007 / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. - К.: МОРИОН, 2007. - Т.2. - С. С-158.

10. Лазарева Е.Б., Меньшиков Д.Д. Опыт и перспективы использования пектинов в лечебной практике // Антибиотики и химиотерапия.-1999. - № 2. - С. 37-40.