



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83478** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00
G01N 33/483 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 04249	(72) Винахідник(и): Танцура Людмила Миколаївна (UA), Шатілло Андрій Валерійович (UA), Соколік Вікторія Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.04.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.09.2013	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕВРОЛОГІЇ, ПСИХІАТРІЇ ТА НАРКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Академіка Павлова, 46, м. Харків, 61068 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2013, Бюл.№ 17	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕХАНІЧНОЇ СТІЙКОСТІ КЛІТИННИХ МЕМБРАН

(57) Реферат:

Спосіб визначення механічної стійкості клітинних мембран шляхом їх дозованого ушкодження, де як ушкоджуючий фактор використовують ультразвукове випромінювання.

UA 83478 U

Корисна модель належить до біологічних наук, в першу чергу, до медицини та фармакології. Зокрема може застосовуватися для скринінгу лікарських засобів та оптимізації лікування захворювань людини, які супроводжуються підвищеною механічною вразливістю клітинних структур.

На сьогодні запропоновано безліч технологій для скринінгу лікарських засобів та для вивчення реакцій клітин або тканин на різноманітні хімічні та фізичні впливи. Найближчим аналогом корисної моделі є найбільш близька за задачею та реалізацією методика, опис якої наведено у роботі Klinge et al. The FASEB Journal Vol. 21 June 2007. Згадана методика використовує скляні мікрогранули розміром 40-70 мкм, які додаються у середовище для культивування, та двадцятикратне покачування ємності з клітинною культурою (у найближчому аналогу використовувалися міобласти), яке забезпечує переміщення мікрогранул по поверхні міобластів і, відповідно, їх дозовану травматизацію.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу визначення механічної стійкості клітинних мембран шляхом їх контролюваного дозованого ушкодження та моделювання умов, більш наближених до тих, що існують у фізіологічних умовах в органах і тканинах організму, що забезпечить застосування тесту механічного ушкодження клітин для вивчення патофізіології та скринінгу засобів лікування *in vitro*.

Суть корисної моделі полягає в тому, що як ушкоджуючий фактор використовується ультразвукове випромінювання визначеної частоти, інтенсивності та просторового спрямування, дії якого зазнають клітини або тканини що досліджуються.

Така реалізація способу визначення механічної стійкості клітинних мембран дозволяє швидко підібрати перелік специфічних параметрів ушкодження мембран тієї чи іншої тканини та не створює перешкод для детекції маркерів ушкодження і тестування фармакологічних засобів для підвищення стійкості мембран - наприклад, у найближчому аналогу клітинна культура потребує додаткового етапу видалення скляних мікрогранул для подальшого аналізу та маніпуляцій з культурою.

Спосіб визначення механічної стійкості клітинних мембран здійснюється таким чином: клітинній суспензії, ємності з клітинною культурою або зразку солідної тканини (у залежності від задачі та особливостей дослідження) забезпечується тісний механічний контакт з випромінювачем ультразвукових коливань. Найкращим, з точки зору стабільності і відтворюваності характеристик випромінювання, є варіант, коли клітини розміщені у ємності, яка є частиною ультразвукового випромінювача.

Потім зразок, що досліджується, зазнає впливу ультразвукового випромінювання, зазвичай мінімальної інтенсивності та часу опромінення, після чого проводиться визначення маркерів цілісності клітинних мембран та загальної цитотоксичності за стандартними методиками. Ці дії повторюються кілька разів з поступовим збільшенням інтенсивності випромінювання до визначення кривої залежності інтенсивності/ступінь ушкодження.

Після вибрання найбільш оптимального для цілей дослідження показника інтенсивності ультразвуку можлива подальша оптимізація дозування та специфічності ушкодження шляхом визначення залежності ступеня ушкодження від часу опромінення і вибрання найбільш прийнятного часового інтервалу цього показника.

Необхідна частота ультразвуку зазвичай розраховується з врахуванням розміру клітин, консистенції тканини та бажаного характеру ушкодження або визначається технічними можливостями (більшість випромінювачів має фіксовану частоту випромінювання).

Для тканин з визначною просторовою орієнтацією структурних елементів та функцій, наприклад, попереково-смуғасті м'язи, кістки, хрящова тканина, бажано забезпечити відповідний до фізіологічного напрямок розповсюдження механічних коливань ультразвукових хвиль у зразку.

Приклад. Фракцію мононуклеарів периферійної крові хворих на м'язову дистрофію Дюшенна та контрольної групи концентрували центрифугуванням протягом 10 хв. при 4 тис. об/хв. та ресуспендували у 0,5 мл фізіологічного розчину або стандартного буферу (pH 7,4). Обробку ультразвуком здійснювали у приладі МУССОН-1, який було модифіковано для зменшення потужності випромінювання. Обробка проводилася при кімнатній температурі (інтенсивність ультразвуку складала 0,5 Вт/см², частота - 2,64 МГц), у міру озвучування із загального об'єму відбиралися проби аліквоти по 50 мкл через кожні 30 секунд протягом 3,5 хвилин: інтервали 0 хв., 0,5 хв., 1 хв., 1,5 хв., 2 хв., 2,5 хв., 3 хв. і 3,5 хв., відповідно. Таким чином, для кожної наступної аліквоти дія ультразвуку була подовжена на півхвилини.

Аліквоти МКПК, оброблені ультразвуком, фарбували у розчині вітального барвника нейтрального червоного (толуїлен червоний) шляхом інкубації протягом 1 години при 37 °C у термостаті. Згодом клітини відокремлювали від барвника, що не зв'язався, центрифугуванням

при 4 тис. об./хв 10 хв та промивали 5-кратним об'ємом буферу. Нейтральний червоний елюювали із осаду клітин солюбілізуєчим розчином (50 % етанол) 10 хв., центрифугували і в надосадовій рідині вимірювали його оптичну щільність при $\lambda=540$ нм за допомогою колориметра фотоелектричного концентраційного КФК-3.

5 На графіку залежності руйнівного впливу ультразвуку від часу його дії визначали мінімум поглинання нейтрального червоного при $\lambda=540$ нм, який відповідав стійкості мононуклеарів відповідної особи до ультразвуку. Оптичне поглинання визначалося за допомогою колориметра фотоелектричного концентраційного КФК-3.

10 Визначено, що графіки оптичного поглинання, отримані для клітин хворих, мають характерну форму та відрізняються від відповідних графіків для клітин з контрольної групи.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб визначення механічної стійкості клітинних мембран шляхом їх дозованого ушкодження, який **відрізняється** тим, що як ушкоджуючий фактор використовують ультразвукове випромінювання.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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

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