



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92412** (13) **C2**
(51) МПК (2009)
A61B 5/01МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КЛІТИН БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ IN VITRO**

1

(21) а200903648

(22) 14.04.2009

(24) 25.10.2010

(46) 25.10.2010, Бюл.№ 20, 2010 р.

(72) МЕДВЕДЄВ ВІКТОР МИХАЙЛОВИЧ, МЕДВЕДЄВА ІРИНА МИХАЙЛІВНА, ДМИТРУК СЕРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, БЕБЕШКО ВОЛОДИМИР ГРИГОРОВИЧ, ТАЛЬКО ВІКТОРІЯ ВАСИЛІВНА, БІЛЕЦЬКИЙ ПАВЛО СТЕПАНОВИЧ

(73) АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ, НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ ІНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЇ ФІЗИКИ, СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ А.С. МАКАРЕНКА

(56) UA 98084259 A, 28.02.2000

UA 41782 A, 17.09.2001

RU 2 269 924 C2, 20.02.2006

RU 2 202 278 C2, 20.04.2003

WO 97/24063 A1, 10.07.1997

US 5 865 167 A, 02.02.1999

(57) 1. Спосіб оцінки функціонального стану біологічних об'єктів in vitro, який включає зміну умов, у яких здійснюються фізіологічні функції об'єкта, де

2

біологічний об'єкт інкубують в умовах зниженої або підвищеної відносно нормального фізіологічного значення температури і на підставі даних порівняльного аналізу параметрів, що відображають характер можливих функціональних відхилень у біологічних об'єктів, які перебувають у нормальному фізіологічному стані та у стані, який характеризується передумовами розвитку патологічного процесу, роблять висновок про функціональний стан досліджуваних біологічних об'єктів та/або їх резервні можливості відносно підтримання гомеостазу.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що температурні умови, у які вміщують біологічний об'єкт, характеризуються величинами, близькими до діапазону властивої конкретному біологічному об'єкту фізіологічної норми.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як досліджувані біологічні об'єкти можуть бути використані як культивовані in vitro клітини, тканини, органи, так і одно- чи багатоклітинні організми.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що може бути застосований в галузі медицини з метою удосконалення діагностики захворювань та з'ясування їх патогенетичних механізмів.

Винахід стосується медицини, зокрема лабораторної діагностики і може бути використаний для оцінки функціонального стану клітин біологічних об'єктів в установах охорони здоров'я.

Відомі способи оцінки морфологічного та функціонального стану клітин живих систем можна об'єднати у три групи:

1. Способи, які базуються на візуальній оцінці за допомогою оптичних приладів, а також на аналізі з використанням складного аналітичного обладнання, морфофункціональних змін у клітинах біологічних об'єктів, при попередньому застосуванні методик забарвлення клітин з різноманітною модифікацією.

2. Способи, які передбачають використання фізичного фактору (електричний струм, ін.) або хімічної речовини, з наступним аналізом параметрів живих клітин.

3. Способи, у яких використовується явище біо(хемі)люмінесценції.

Відомий спосіб диференційованої оцінки ступеня ушкодження гепатоцитів при хронічному отруєнні алкоголем [1] реалізується шляхом характеристики морфологічних змін гепатоцитів (виявлення жирової дистрофії) з використанням відповідних барвників і за допомогою мікроскопу.

Недоліком відомого способу, крім інвазивності, є візуальна оцінка змін у досліджуваних об'єктах, яка не може бути повністю позбавлена суб'єктивного фактору, обумовленого досвідом конкретного дослідника. Крім того, морфологічні зміни, на виявленні яких базується спосіб, являють собою наслідок первинних реактивних змін в клітині за умов розвитку патологічного процесу, а отже навряд чи можуть бути розцінені в якості ранніх діагностичних критеріїв.

Відомий спосіб визначення динаміки прихованої активності ізоферментів лактатдегідрогенази (ЛДГ) гомогенату лейкоцитів [2], оснований на порівнянні результатів електрофоретичного розді-

(13) **C2**(11) **92412**(19) **UA**

лення ізоферментів ЛДГ після попередньої інкубації з детергентом та без нього.

Недоліком відомого способу є те, що він являє собою аналіз лише окремого показника (активності ізоферментів ЛДГ) і не може дати комплексного уявлення про загальний стан та напрямок змін у клітинному гомеостазі за умов початку розвитку патологічного процесу, а отже не може бути використаний з метою ранньої діагностики захворювань.

Відомий спосіб випробування Т-лімфоцитів людини [3], який передбачає оцінку часу інкубації клітин з антигенами для оптимізації виявлення певного значення рухливості Т-клітин.

Недоліком відомого способу є те, що використання часу інкубації є методичним прийомом (наближення умов експерименту до умов *in vivo*) для досягнення мети і дозволяє зробити висновок лише щодо окремої здатності (відповідь на дію антигену) окремого виду клітин (Т-лімфоцити).

Відомий спосіб визначення функціональної активності лейкоцитів периферичної крові людини за ступенем гасіння біолоюмінесценції [4] являє собою удосконалений методичний підхід до визначення фагоцитарної активності лейкоцитів з використанням культури люмінесцентних бактерій.

Недоліком відомого способу є неможливість його використання з метою виявлення функціональних змін у клітинах різних типів тканин на ранніх стадіях розвитку патологічного процесу.

Найбільш близьким за технічною сутністю є спосіб комплексного аналізу параметрів живих клітин, описаний Сухенко Е. П., Бакировым Т. С., Соловьевым А. А., Генераловым В. М., Васильевым Ю. В., Паком А. В. [5], який передбачає оцінку за допомогою приладу біоелектричних показників за характеристиками руху клітин, вміщених у інкубаційне середовище і знакоперемінне електричне поле, частоту якого змінюють.

Недоліком найбільш близького за технічною сутністю способу є неможливість отримання чіткого уявлення про стан окремих функціональних систем в клітині та можливий напрямок їх змін, а отже - неможливість застосування способу для ранньої діагностики захворювань.

Технічною задачею запропонованого способу є створення способу оцінки функціонального стану клітин біологічних об'єктів на основі можливості виявлення порушення здатності клітин до підтримання гомеостазу на ранніх стадіях розвитку патологічного процесу.

Технічна задача вирішується з урахуванням наступних положень:

1. Відхилення будь-якого параметру стану клітини (наприклад, температури) від фізіологічної норми може бути класифіковане як енергетично нестійкий стан.

2. Стереотипічною реакцією клітини на такий енергетично нестійкий стан виступають процеси, які охоплюють ядерний апарат і компоненти цитоплазми, що супроводжується змінами інтенсивності синтетичних процесів з метою утримання основних клітинних функцій у межах фізіологічних норм.

3. Відхилення будь-якого параметру стану клітини (наприклад, температури) у бік збільшення

або зменшення буде приводити до відхилення параметрів клітинних функцій від їх нормального значення, при чому великі відхилення будуть характерні для клітин з порушеним "нестійким" метаболізмом або станом [6].

Спосіб дозволяє визначити як загальний (мінімум декілька складових) функціональний стан живої клітини будь-якого типу тканини чи органу, так і окремі його характеристики (мінімум одна складова), виявити відмінності у функціональному стані клітин, які перебувають у фізіологічних умовах та клітин, за наявності умов початку розвитку патологічного процесу будь-якого характеру. Спосіб дозволяє отримати інформацію щодо здатності клітини в умовах впливу різноманітних ендогенних та екзогенних факторів підтримувати гомеостаз і оцінити резервні можливості клітини стосовно підтримання гомеостазу.

Зазначений спосіб реалізується у чотири етапи:

1. Вибір об'єкту дослідження (вид клітин).

2. Вибір значущих параметрів, які характеризують загальний функціональний стан досліджуваних клітин, або окремі його складові.

3. Вибір методики вивчення обраних параметрів функціонального стану клітин.

4. Введення у послідовність методичних дій енергетичного фактору (наприклад, зміни температури інкубації) для здійснення за його допомогою енергетичного впливу на клітину з метою з'ясування можливостей або особливостей її функціонального стану за характером відповіді на цей вплив.

Використовуючи метод порівняння характеристик відповідей клітин, які перебувають у нормальних фізіологічних умовах, та в умовах розвитку патологічного процесу, роблять висновок щодо функціонального стану клітин у зв'язку з розвитком будь-якої конкретної патології.

Здійснення способу, пояснюється прикладами дослідження показників фагоцитарної здатності нейтрофілів крові людини, які відображають різні складові функціонального стану клітини: фагоцитарного показника (ФП), фагоцитарного індексу (ФІ), загальної фагоцитарної активності (ЗФА).

Приклад 1.

- об'єкт дослідження - нейтрофіли крові людей: контрольна група - донори (група 1), досліджувана група - учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС без гематологічних відхилень (група 2);

- значущий параметр - фагоцитарний показник (ФП, %);

- методика визначення ФП - розрахунок на основі даних аналізу фагоцитарної функції нейтрофілів методом визначення їх здатності поглинати частинки латексу [7];

- визначення ФП у групі 1 та групі 2 зазначеним методом при сталій температурі інкубації ($T^{\circ}\text{C}=37^{\circ}\text{C}$, час 60хв.) приводить до неповної оцінки реактивної здатності клітин (близькі значення ФП у групі 1 та групі 2);

- використання методу "розгойдування" тепловою енергією, тобто зниження (до 30°C) або підвищення (до 40°C) температури інкубації відносно нормального фізіологічного значення (37°C) до-

зволяє виявити суттєві відмінності значень ФП у групі 1 та групі 2, а саме більш високі значення ФП при температурі 40°C у осіб групи 2 та характер змін ФП при зменшенні та збільшенні температури інкубації, який відрізняється різноспрямованістю температурних залежностей: збільшення ФП в групі 1 поряд зі зменшенням показника в групі 2 при охолодженні (до 30°C) та зменшення ФП в групі 1 поряд із збільшенням показника в групі 2 при нагріванні (до 40°C).

Залежність значень ФП від температури ілюструє Фіг. (А).

Приклад 2.

- об'єкт дослідження - нейтрофіли крові людей: контрольна група - донори (група 1), досліджувана група - учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС без гематологічних відхилень (група 2);

- значущий параметр - фагоцитарний індекс (ФІ, ум. од);

- методика визначення ФІ - розрахунок на основі даних аналізу фагоцитарної функції нейтрофілів методом визначення їх здатності поглинати частинки латексу (7);

- використання енергетичного впливу (зменшення та збільшення температури інкубації відносно фізіологічного значення 37°C) дозволяє виявити різноспрямованість температурних залежностей показника ФТ, яка є схожою з такою для ФП, при чому значення ФІ при сталій температурі (37°C) також є дуже близькими у обох групах і не дозволяють у повній мірі оцінити реактивну здатність клітин, що досліджуються.

Залежність значень ФП від температури ілюструє Фіг. (Б).

Приклад 3.

- об'єкт дослідження - нейтрофіли крові людей: контрольна група - донори (група 1), досліджувана група - учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС без гематологічних відхилень (група 2);

- значущий параметр - загальна фагоцитарна активність (ЗФА, ум. од);

- методика визначення ЗФА - розрахунок на основі даних аналізу фагоцитарної функції нейтрофілів методом визначення їх здатності поглинати частинки латексу [7];

- аналіз залежностей показника ЗФА від температури при використанні методу "розгойдування" тепловою енергією (зниження до 30°C та підвищення до 40°C температури інкубації відносно нормального фізіологічного значення – 37°C) дозволяє зробити висновки, аналогічні отриманим при дослідженні показників ФП та ФІ.

Залежність значень ЗФА від температури ілюструє Фіг. (В).

Таким чином, спосіб, який заявляється, є достатньо простим у застосуванні і демонструє значні можливості по виявленню функціональних змін в

клітинах на ранньому етапі розвитку патологічного процесу будь-якого характеру, коли головною діагностичною проблемою є відсутність такої вираженої реакції клітини, яка могла б бути виявлена відомими способами.

Спосіб дозволяє оцінити функціональний стан клітин будь-якого типу тканин живого організму з визначенням їх резервної можливості щодо підтримання гомеостазу.

Джерела інформації:

1. Пат. 1103UA, МПК7 A61B10/00 Спосіб диференційованої оцінки ступеня ушкодження гепатоцитів при хронічному отруєнні алкоголем / Т. П. Якимова, Г. О. Ковальов: заявник і патентотримач Харківська медична академія післядипломної освіти. - № и200503691; заявл. 18.04.2005; опубл. 15.12.2005, бюл. № 12.

2. Пат. 2293332RU, МПК G01N33/68 (2006.01). Способ определения динамики скрытой активности изоферментов ЛДГ гомогената лейкоцитов: /М. В. Кусков, В. Я. Семке, С. А. Иванова, С. С. Теровский, О. Ю. Федоренко, Е. М. Епанчинцева: заявитель и патентообладатель ГУ НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН. - № 2005115615/15; заявл. 23.05.2005; опубл. 10.02.2007, бюл. № 4.

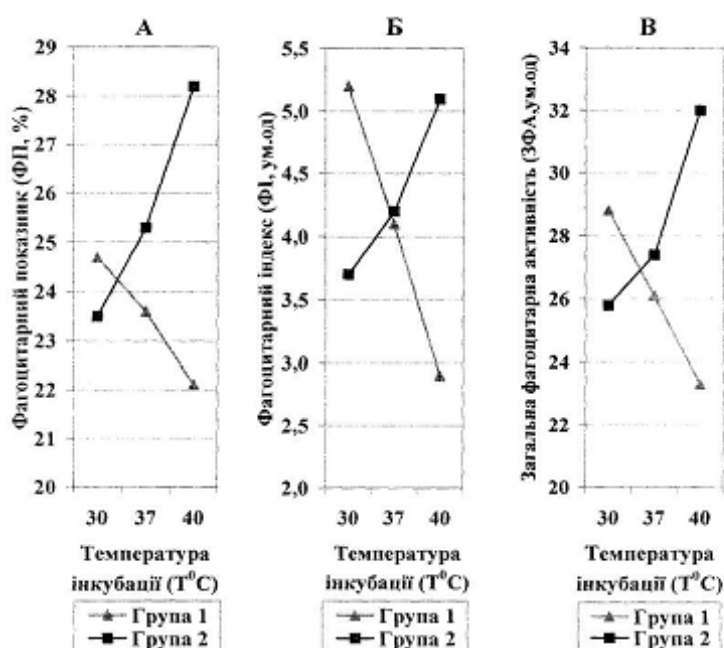
3. Заявка WO2007099341, МПК G01N33/50 (2006.01). T cell assays / Baker M. (GB), Carr F. (GB), Rust A. (GB), Davies L. (GB). - № WO2007GB00736; заявл. 2007.03.02; опубл. 2007.09.07.

4. Заявка 2005118125RU, МПК G01N33/52 (2006.01). Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови человека по степени гашения биoluminesценции / С. В. Ширшев, Е. М. Куклина, С. А. Заморина и др.: заявитель и патентообладатель Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. - № 2005118125/15; заявл. 10.06.2006; опубл. 20.12.2006, бюл. № 35.

5. Заявка 2006100448RU, МПК G01N33/487 (2006.01). Способ комплексного анализа параметров живых клеток, устройство для его осуществления и его вариант / Е. П. Сухенко, Т. С. Бакиров, А. А. Соловьев, и др.: заявитель и патентообладатель НТУ "Инженерно-технический центр" ОАО "Ижевский мотозавод". - № 2006100448/15; заявл. 10.01.2006; опубл. 20.07.2007, бюл. № 20.

6. Погонцева І. М. Функціональний стан гранулоцитарної ланки гемопоезу в учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.08 / Погонцева Ірина Михайлівна. - К., 2002. - 166 с.

7. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса / Потапова С. Г., Хрустиков В. С., Демидова Н. В. и др. // Проблемы гематологии и переливания крови. - 1977. - №9. - С. 58-59.



Фіг. Залежність значень фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів контрольної і досліджуваної груп від температури

А - температурна залежність фагоцитарного показника (ФП)

Б - температурна залежність фагоцитарного індексу (ФІ)

В - температурна залежність загальної фагоцитарної активності (ЗФА)

Група 1 - контрольна група

Група 2 - досліджувана група (учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС без гематологічних порушень)

Час інкубації - 60 хвилин