



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95489 (13) C2
(51) МПК
G01N 33/483 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ/ЦИТОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ ДЕСТАБІЛІЗУЮЧИХ ФАКТОРІВ

1

(21) а200901726

(22) 27.02.2009

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) ДОБРОВА ВІКТОРІЯ ЄВГЕНІВНА, МАЛОШ-
ТАН ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА, СТЕПАНОВА КА-
ТЕРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ДОЛЖИКОВА ОЛЕНА
ВІКТОРІВНА(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(56) US 6132979 A, 17.10.2000

JP 2007143465 A, 14.06.2007

RU 2208786 C1, 20.07.2003

(57) 1.Спосіб визначення цитотоксич-
ної/цитопротекторної дії дестабілізуючих факторів
на моделі клітин кісткового мозку щурів шляхом
приготування суспензії клітин кісткового мозку щу-
рів, здійснення впливу на неї дестабілізуючого
фактора з подальшим додаванням до одержаної
проби барвника та підрахунком забарвлених мер-
твих клітин, який **відрізняється** тим, що для одер-
жаня статистично доказових результатів визна-
чають вибірковий критерій Z_B за емпіричною
формулою:

2

$$Z_B = \frac{|\bar{p}_k - \bar{p}_d| - 0,5 \left(\frac{1}{n_k} + \frac{1}{n_d} \right)}{\sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})} \left(\frac{1}{n_k} + \frac{1}{n_d} \right)}, \text{ де}$$

\bar{p}_k, \bar{p}_d - вибірка середня частка мертвих клітин у
контрольній та дослідних пробах відповідно,

\bar{p} - середня частка мертвих клітин у всіх пробах,

причому $\bar{p}_k = \frac{m_k}{n_k}$, $\bar{p}_d = \frac{m_d}{n_d}$, $\bar{p} = \frac{m_k + m_d}{n_k + n_d}$, де

m_k, m_d - сумарна кількість мертвих клітин у конт-
рольній пробі та дослідних пробах відповідно,

n_k, n_d - сумарна загальна кількість клітин у конт-
рольних та дослідних пробах відповідно,

при $Z_B > 1,96$ визначають статистично доказову
дію дестабілізуючого фактора на клітинах кістково-
го мозку, яка при $\bar{p}_k < \bar{p}_d$ є цитотоксичною, а при

$\bar{p}_k > \bar{p}_d$ - цитопротекторною.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ви-
ключають різке коливання температур, а як барв-
ник використовують трипановий синій.

Винахід належить до біології та медицини, а
саме до способів визначення впливу на клітини
біологічних об'єктів дестабілізуючих факторів різ-
ної природи (хімічних, фізичних, механічних) і мо-
же бути використаний при проведенні доклінічних
досліджень біологічно активних речовин як потен-
ційних лікарських засобів.

Різні дестабілізуючі фактори (хімічні сполуки,
електромагнітне випромінювання, звук, світло і т.і.)
здатні впливати на біологічні об'єкти на клітинному
рівні. При руйнуванні клітинних мембран та заги-
белі клітин під впливом таких факторів констату-
ють їх цитотоксичну дію, а при збереженні мем-
бран та підвищенні життєздатності клітин роблять
висновок про наявність цитопротекторної дії де-
стабілізуючого фактора. Враховуючи життєву важ-
ливість цього питання необхідно забезпечити ста-
тистично доказову оцінку впливу дестабілізуючих
факторів на стан клітин біологічних об'єктів.

Відомий спосіб визначення цитотоксичної ак-
тивності лікарських засобів та хімічних сполук [Ма-
ркова В.М. Модифікація метода Шрека для опре-
деления антитоксической активности препаратов
и вновь синтезированных соединений // Тез. докл.
III съезда фармацевтов Туркменской СССР. - Аш-
хабад, 1987. - С. 225-226.] передбачає визначення
токсичних властивостей речовин у дослідах "in
vitro" при безпосередньому контакті з клітинами
кісткового мозку щурів. Згідно з відомим способом
препарують трубочасті кістки верхніх і нижніх кінці-
вок декапітованих щурів і вимивають на холоді
клітини кісткового мозку фізіологічним розчином.
Визначають масу клітин кісткового мозку в усій
одержаній суспензії та підраховують їх загальну
кількість за допомогою камери Горяєва. До речо-
вин, що досліджуються, додають рівну кількість
клітинної суспензії. Проби витримують на льоду.
Через певні відрізки часу (15,30,60 хвилин) одер-
жані проби досліджують шляхом додавання мети-

(13) C2

(11) 95489

(19) UA

ленового синього і підрахунку під мікроскопом кількості забарвлених у синій колір клітин (з порушеною мембраною) на 100 клітин у пробі на предметному склі. Цитотоксичну дію досліджуваних речовин визначають за кількістю (на 100) забарвлених у синій колір клітин (%).

До недоліків відомого способу слід віднести низьку точність та обмеженість одержаних результатів внаслідок суб'єктивності оператора-лаборанта, який відрховує лише 100 клітин у пробі, нанесеній на предметне скло, та визначає скільки з них мертвих. Спосіб не містить чітких рекомендацій щодо підрахунку та обробки результатів, що не відповідає вимогам доказової медицини до проведення доклінічних випробувань. У свою чергу використання льоду під час досліджень призводить до коливання температур, що також впливає на життєдіяльність клітин та виступає як додатковий дестабілізуючий фактор, через що знижується точність та достовірність одержаних результатів. Крім того не є доцільним використання метиленового синього як фарбника у зв'язку з його властивістю фарбувати скло, що знижує точність підрахунку забарвлених (мертвих) клітин у пробі, нанесеній на предметне скло мікроскопу.

Задача винаходу полягає у створенні способу визначення дії дестабілізуючих факторів різної природи (хімічних, фізичних, механічних) на життєздатність клітин біологічного об'єкту, в якому шляхом використання запропонованого кількісного критерію, розрахованого за емпіричною формулою, визначається статистично доказова цитотоксична або цитопротекторна дія дестабілізуючого фактора. Причому точність способу додатково підвищується за рахунок використання камери Горяєва для підрахунку клітин під мікроскопом, а також барвника, який не фарбує скло, та виключення, як додаткового дестабілізуючого фактора впливу коливання температур досліджуваної проби.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі визначення цитотоксичної/цитопротекторної дії дестабілізуючих факторів на моделі кісткового мозку щурів виконується приготування суспензії клітин кісткового мозку щурів у природних умовах, здійснюється вплив на неї дестабілізуючого фактора з подальшим додаванням до одержаної проби барвника - трипановий синій та проводиться підрахунок забарвлених мертвих клітин. Відповідно із винаходом передбачається, що для одержання статистично доказових результатів визначають вибірковий критерій Z_B за емпіричною формулою:

$$Z_B = \frac{|\bar{p}_k - \bar{p}_d| - 0,5 \left(\frac{1}{n_k} + \frac{1}{n_d} \right)}{\sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})} \left(\frac{1}{n_k} + \frac{1}{n_d} \right)}, \text{ де}$$

\bar{p}_k, \bar{p}_d - вибірка середня частка мертвих клітин у контрольній та дослідних пробах відповідно,
 \bar{p} - середня частка мертвих клітин у всіх пробах, причому $\bar{p}_k = \frac{m_k}{n_k}$, $\bar{p}_d = \frac{m_d}{n_d}$, $\bar{p} = \frac{m_k + m_d}{n_k + n_d}$, де

m_k, m_d - сумарна кількість мертвих клітин у контрольній пробі та дослідних пробах відповідно,
 n_k, n_d - сумарна загальна кількість клітин у контрольних та дослідних пробах відповідно.

При $Z_B > 1,96$ констатують статистично доказову дію дестабілізуючого фактора на клітини біологічного об'єкту, зокрема при $\bar{p}_k < \bar{p}_d$ визначають цитотоксичну, а при $\bar{p}_k > \bar{p}_d$ - цитопротекторну дію.

Згідно з винаходом як барвник використовують трипановий синій.

Авторами вперше запропоновано використання вибіркового критерію Z_B , розрахованого за наведеною вище емпіричною формулою, для оцінки достовірності факту наявності або відсутності цитотоксичної або цитопротекторної дії дестабілізуючого фактора на клітини біологічного об'єкту.

Спосіб забезпечує точність досліджень та їх статистично доказові результати.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Препарують трубчасті кістки верхніх та нижніх кінцівок декапітованого щура. Вимивають клітини кісткового мозку фізіологічним розчином в об'ємі 2 мл. Дослідні проби клітинної суспензії піддають дії дестабілізуючого фактора (додають досліджувану речовину, впливають електромагнітним випромінюванням тощо). Контрольні проби залишають без змін. До дослідних та контрольних проб обережно додають трипановий синій та змішують. Краплю забарвленої суспензії з кожної проби по черзі вносять до камери Горяєва, яку розміщують на предметному столику мікроскопу та під об'єктивом проводять підрахунок клітин (у 80 малих квадратах), використовуючи лічильник для підрахунку формених елементів крові: на лічильнику фіксують кількість клітин забарвлених у фіолетовий колір (клітини зі зміненою функцією мембран, в результаті чого їх цитоплазма забарвлюється барвником), і безбарвні, клітини у яких ці функції не порушені. Визначають кількість мертвих клітин та загальну кількість клітин у дослідних та контрольних пробах. Оцінюють функціональний стан мембран клітин кісткового мозку за інтенсивністю забарвлення клітин.

Якщо дослід проводиться вперше для будь-якого фактора то перший підрахунок мертвих клітин проводять через 15 хвилин: при виявленні цитопротекторної дії пропонується і далі проводити вимірювання через 30, 60 та 90 хвилин для вивчення динаміки життєдіяльності клітин. Якщо виявляється цитотоксична дія в досліді після отримання перших даних (через 15 хвилин) далі проводять підрахунок при необхідності через 30 або 60 хвилин.

Оцінку результатів здійснюють наступним чином:

1) розрахунок частки мертвих клітин у пробі для одного вимірювання проводять за формулою:

$$p = \frac{m}{n},$$

де m - кількість мертвих клітин у пробі,
 n - загальна кількість клітин у пробі.

Для серії вимірювань визначається середня частка мертвих клітин:

$$\bar{p} = \frac{\sum_{i=1}^j m_i}{\sum_{i=1}^j n_i},$$

де m_i - кількість мертвих клітин в i -тій серії,
 n_i - загальна кількість клітин в i -тій серії;

2) стандартне відхилення сукупності для одноразового вимірювання:

$$\delta = \sqrt{p(1-p)},$$

для серії j вимірювань:

$$\delta_j = \sqrt{p(1-p)};$$

3) стандартна похибка частки для однократно-го вимірювання:

$$\delta_p = \frac{\delta}{\sqrt{n}},$$

для серії n вимірювань:

$$\delta_{\bar{p}} = \frac{\delta_j}{\sqrt{\sum_{i=1}^j n_i}};$$

4) довірчий інтервал для істинної частки при критерії значимості α розраховують за формулою:

$$(\bar{p} - Z_{\alpha} \delta_p)_{\text{контроль}} < p < (\bar{p} + Z_{\alpha} \delta_p)_{\text{дослід}},$$

де Z_{α} - квантиль нормального розподілу при $\alpha=0,05$, тобто довірчий імовірності 95 %, дорівнює $Z_{0,05}=1,96$

$$(\bar{p} - 1,96 \cdot \delta_p)_{\text{контроль}} < p < (\bar{p} + 1,96 \cdot \delta_p)_{\text{дослід}}.$$

Для одержання статистично доказових результатів визначають вибіркового критерій Z_B за емпіричною формулою:

$$Z_B = \frac{|\bar{p}_k - \bar{p}_d| - 0,5 \left(\frac{1}{n_k} + \frac{1}{n_d} \right)}{\sqrt{\bar{p}(1-\bar{p}) \left(\frac{1}{n_k} + \frac{1}{n_d} \right)}}, \text{ де}$$

\bar{p}_k, \bar{p}_d - вибіркова середня частка мертвих клітин у контрольній та дослідних пробах відповідно,

\bar{p} - середня частка мертвих клітин у всіх пробах,

причому $\bar{p}_k = \frac{m_k}{n_k}$, $\bar{p}_d = \frac{m_d}{n_d}$, $\bar{p} = \frac{m_k + m_d}{n_k + n_d}$, де

m_k, m_d - сумарна кількість мертвих клітин у контрольній пробі та дослідних пробах відповідно,

n_k, n_d - сумарна загальна кількість клітин у контрольних та дослідних пробах відповідно.

Для визначення критичного значення критерію, при перевищенні якого оцінкою вибіркового критерію (Z_B) відхиляється нульова гіпотеза, був

використаний стандартний нормальний розподіл. Для рівня значущості $\alpha=0,05$ критичне значення складає: $Z_{\text{кр}}=1,96$.

При $Z_B < 1,96$ вплив дестабілізуючих факторів на клітини відсутній.

При $Z_B > 1,96$ визначають статистично доказову дію дестабілізуючого фактора на клітини, причому при $\bar{p}_k < \bar{p}_d$ відбувається цитотоксична, а при $\bar{p}_k > \bar{p}_d$ цитопротекторна дія.

Здійснення заявленого способу передбачає використання барвника, прийнятного для забарвлення клітин з пошкодженими мембранами, такого, що відповідає умовам досліджень і не зафарбовує предметне скло мікроскопу для запобігання помилок при підраховуванні забарвлених клітин.

Спосіб виключає використання різкого охолодження проб, тобто суттєвого коливання температур, які можуть впливати на клітини як додатковий дестабілізуючий фактор.

Винахід ілюструється прикладом.

Приклад 1.

Дослідження впливу широкосмугового сигналу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону (ЕМВ ММД) низької інтенсивності на клітини кісткового мозку щурів.

Для приготування суспензії клітин кісткового мозку щура, препарували трубчасті кістки верхніх на нижніх кінцівок декапітованого щура і вимивали клітини кісткового мозку фізіологічним розчином в об'ємі 2 мл. Отриману суспензію клітин поділили на 2 рівні частини, одну з яких залишили у пробірці, а іншу розмістили на часовому склі біля приладу "ІХТ-Поріг". Пробу обробили електромагнітним випромінюванням міліметрового діапазону низької інтенсивності протягом 10 хвилин. Через 30,60 та 90 хвилин з пробірки із часового скла відбирали суспензію клітин. Обережно додавали трипановий синій до суспензії клітин та змішували. Краплі забарвленої суспензії клітин вносили до камери Горяєва, яку розміщували на предметному столику мікроскопу та під об'єктивом проводили підрахунок клітин (у 80 малих квадратах), використовуючи лічильник для підрахунку формених елементів крові: на лічильнику фіксували кількість клітин забарвлених у фіолетовий колір (клітини зі зміненою функцією мембран, в результаті чого їх цитоплазма забарвлюється барвником), і безбарвних клітин, у яких ці функції не порушені.

Після проведення дослідів отримали дані та розраховали вибірково середні частки (\bar{p}_k, \bar{p}_d), стандартну похибку частки ($\delta_{\bar{p}}$) та інтервал, у якому знаходиться дійсне значення частки при довірчій імовірності $p=0,95$ (табл. 1).

Таблиця 1

Статистичні оцінки життєздатності клітин після 10-хв. опромінення за допомогою приладу "ІХТ-поріг" при довірчій імовірності $p=0,95$

Показник	Час після опромінення, хв.					
	30		60		90	
	Контроль, %	Дослід, %	Контроль, %	Дослід, %	Контроль, %	Дослід, %
$\bar{p}_k \bar{p}_d$	5,7	4,3	9,2	4,4	9,6	4,8
$\sigma_{\bar{p}}$	0,35	0,34	0,49	0,36	0,5	0,4
P_n	5,0	3,6	8,3	3,7	8,7	4,1
P_v	6,4	4,9	10,2	5,1	10,6	5,6

Дані таблиці 1 свідчать, що через 30 та 60 хвилин у пробах клітин кісткового мозку після опромінення вибірково середні частки мертвих, тобто забарвлених клітин (\bar{p}_d) було у 1,3 рази меншим у порівнянні з аналогічними параметрами контрольної групи (\bar{p}_k), а через 60 та 90 хвилин - у 2 рази. Це свідчить про безпосередній вплив електромагнітного випромінювання, створеного за допомогою приладу "ІХТ-поріг" на підвищення резистентності мембрани та зменшення рівня проникності фарбника у клітину через неї, тобто цитопротекторну дію.

Для статистично доказового визначення ефективності впливу зазначеного випромінювання на підвищення рівня опірності мембрани клітин зовнішньому механічному впливу та порушенню умов біологічної цілісності за допомогою методу статистичних гіпотез було проведено порівняння відсотків у контрольних та опромінених пробах окремо для кожної експозиції.

Результати розрахунку вибіркового критерію (Z_v) для 30,60 та 90 хвилин після опромінення та порівняння його з критичним значенням ($Z_{кр}$) надані у таблиці 2.

Таблиця 2

Визначення ефективності впливу опромінення на клітини кісткового мозку щурів

Час експозиції, хв.	Значення вибіркового критерію, Z_v	Критичне значення $Z_{кр}$ ($\alpha=0,05$)	Статистична доказова цитопротекторна дія
30	2,8	1,96	наявна
60	7,7		наявна
90	7,2		наявна

Результати проведених досліджень свідчать, що для всіх трьох експозицій $Z_v > 1,96$, різниця між середніми частками мертвих клітин для контрольних та дослідних проб є статистично значущою і враховуючи, що $\bar{p}_k > \bar{p}_d$, можна зробити висновок, що ЕМВ ММД має цитопротекторну дію та сприяє підвищенню життєздатності клітин кісткового мозку щурів.

Таким чином заявлено спосіб визначення цитотоксичної/цитопротекторної дії дестабілізуючих

факторів на моделі клітин кісткового мозку щурів. Спосіб дозволяє одержувати з високою точністю статистично доказові оцінки впливу дестабілізуючих факторів різної природи (хімічних, фізичних, механічних) на клітини біологічних об'єктів. Заявлений спосіб може бути використаний для проведення доклінічних досліджень нових лікарських засобів та біологічно активних речовин.