



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **104495**

(13) **C2**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2012 06639**

(22) Дата подання заявки: **31.05.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.02.2014**

(41) Публікація відомостей
про заяву: **25.11.2013, Бюл.№ 22**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.02.2014, Бюл.№ 3**

(72) Винахідник(и):

**Шляховенко Володимир Олексійович
(UA),
Орловський Олексій Аркадійович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

Доклінічні дослідження лікарських засобів.
Методичні рекомендації / О.В. Стефанов,
ред. - Київ: "Авіценна", 2001. - С. 361-370.
RU 2342712 C2, 27.12.2008.

US 2005079564 A1, 14.04.2005.

JP 2008039415 A, 21.02.2008.

Доклінічне вивчення безпеки лікарських
засобів біотехнологічного походження.

Методичні рекомендації. Укладачі:

докт.біол.наук, проф.В.М.Коваленко,
акад.НАМН України, член-кор.НАН України
Г.М.Бутенко. Київ, 2011.

Коваленко В.М. Доклінічні дослідження
лікарських засобів в Україні. Фармакологія
та лікарська токсикологія, 2009, № 5(12),
С.56-61.

Кленов О.О. та співав. Перспективи
застосування соєвих продуктів у
лікувальному харчуванні онкологічних
хворих. Онкологія, 2009, т.11, № 3, С.231-
235.

Тарасова О.М. Сравнение методов лечения
рака по степени тяжести побочных
эффектов. Порівняння методів лікування
раку за ступенем шкідливих ефектів. Укр.
радіол. ж.. 2009, N 1, с. 35-42.

Гуськова Т.А., Елисеева З.М., Чувильская
Л.М., Трещалина Е.М. Оценка безопасности
препаратов сопровождения химиотерапии
онкологических больных: Тез. [6
Всероссийская научно-практическая
конференция "Отечественные
противоопухолевые препараты", Москва,
24-26 марта, 2007]. Рос. биотерапевт. ж..
2007. 6, N 1, с. 32.

(54) СТАНДАРТИЗОВАНИЙ СПОСІБ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ОЦІНКИ ПОБІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ
ЛІКУВАЛЬНИХ ЧИННИКІВ

UA 104495 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до стандартизованого способу експериментальної оцінки побічної токсичності лікувальних чинників і може бути застосований у медицині, зокрема в онкології, фармакології та токсикології. Відповідно до способу в лізатах досліджуваних органів визначають вміст ДНК та в'язкість, після чого коефіцієнт токсичності (КТ) лікувального чинника щодо певного органа обчислюють за формулою

$$КТ = \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Контролю}} : \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Досліджу}},$$

де m - маса зразка тканини; V - об'єм одержаного лізату; Δt - різниця між часом протікання крізь віскозиметр одиниці об'єму лізату після вирівнювання концентрації ДНК в лізатах та часом протікання чистого лізуючого розчину через віскозиметр; C_{DNA} - концентрація ДНК у вихідному лізаті або будь-яка величина, прямо пропорційна концентрації ДНК, наприклад, екстинкція вихідного лізату при довжині хвилі випромінювання 260 нм, і одержані результати обчислень інтерпретують наступним чином: якщо $КТ > 1$ - наявна побічна токсичність лікувального чинника щодо даного органа, і токсичність тим більша, що більшою є величина КТ; якщо ж $КТ < 1$ - лікувальний чинник сприяє виживанню клітин даного органа. Винахід дозволяє набагато швидше визначати органоспецифічну побічну токсичність лікувального чинника, дешевше й простіше, ніж зазвичай, до того ж стандартним для всіх органів методом, що дає змогу кількісно порівнювати результати для різних органів.

Корисна модель стосується медицини, зокрема онкології та токсикології.

Аналогом та водночас прототипом способу, що заявляється, є не якийсь окремий спосіб, а в цілому методологічний підхід, згідно якого патологічна зміна стану певних органів після введення необхідних доз лікувальних чинників порівняно з їх станом до введення таких лікувальних чинників оцінюється для кожного органа за окремою, специфічною для даного органа методикою або групою методик, наприклад, стану нирок - за вмістом сечовини та креатиніну в сироватці крові; стану печінки - за вмістом білірубину та активністю ферментів АлАТ і АсАТ у сироватці крові, тощо [1]. Перевагами такого підходу є його висока чутливість на ранніх стадіях розвитку побічного токсичного ефекту лікувальних чинників та його пристосованість до застосування як у клініці, так і в експерименті. Головний же його недолік стосується головним чином дослідження новостворених лікувальних чинників на лабораторних тваринах та полягає саме в різноманітності критеріїв токсичного впливу на різні органи тварин, яка робить неможливим кількісне порівняння токсичного впливу на різні органи тварин за одним і тим самим параметром. Власне опис винаходу, що заявляється.

В основу винаходу поставлено задачу: розробити стандартизований (придатний для оцінки побічного токсичного впливу лікувального чинника на різні органи), помірний за праце- та матеріаломісткістю (придатний для скринінгових порівняльних досліджень груп лікувальних чинників та різних доз і схем застосування того самого чинника) спосіб експериментальної оцінки побічної токсичності лікувальних чинників.

Поставлена задача вирішується тим, що зі зразків різних тестованих органів піддослідних тварин, взятих перед введенням та після введення певних лікувальних чинників, одержують, окремо для кожного органа, лізати за допомогою іонного детергенту, наприклад насиченого розчину суміші сечовини та натрію хлориду, далі вирівнюють одержані лізати за вмістом ДНК, наприклад вимірюючи за допомогою спектрофотометра поглинання лізатами ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 260 нм, після чого вимірюють та порівнюють в'язкість обох лізатів за допомогою віскозиметра і далі, окремо для кожного органа, за даними віскозиметрії та даними про питомий вміст ДНК на одиницю маси вихідної тканини органа обчислюють коефіцієнт токсичності тестованого лікувального чинника щодо даного органа.

При виконанні способу, що заявляється, зі зразків різних тестованих органів піддослідних тварин, взятих перед введенням та після введення певних лікувальних чинників, одержують, окремо для кожного органа, лізати за допомогою іонного детергенту, наприклад насиченого розчину суміші сечовини та натрію хлориду, далі вирівнюють одержані лізати за вмістом ДНК, наприклад вимірюючи за допомогою спектрофотометра поглинання лізатами ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 260 нм, після чого вимірюють в'язкість обох лізатів за допомогою віскозиметра і далі, окремо для кожного органа, за даними віскозиметрії та даними про питомий вміст ДНК на одиницю маси вихідної тканини органа обчислюють коефіцієнт токсичності (КТ) тестованого лікувального чинника щодо даного органа як добуток коефіцієнтів кратності зменшення в'язкості розчину ДНК за однакової його концентрації та кратності зменшення питомого вмісту ДНК на одиницю маси сирової тканини органа після введення тестованого лікувального чинника, тобто за формулою

$$KT = \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Контролю}} : \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Дослідю}},$$

де m - маса зразка тканини; V - об'єм одержаного лізату; Δt - різниця між часом протікання крізь віскозиметр одиниці об'єму лізату після вирівнювання концентрації ДНК в лізатах та часом протікання чистого лізуючого розчину через віскозиметр; C_{DNA} - концентрація ДНК у вихідному лізаті або будь-яка величина, прямо пропорційна концентрації ДНК, наприклад, екстинкція вихідного лізату при довжині хвилі випромінювання 260 нм. Якщо $KT > 1$, це свідчить про наявність побічної токсичності лікувального чинника щодо даного органа, і токсичність тим більша, що більшою є величина KT . Якщо ж $KT < 1$, це свідчить про сприяння лікувального чинника виживанню клітин даного органа, що може мати місце, наприклад, для деяких адаптогенів та імуномодуляторів.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом винаходу наступний.

Токсичний ефект щодо деякої популяції клітин (зокрема, паренхіми певного органа), за визначенням означає введення частини клітин цієї популяції до стану некробіозу і, якщо він розвивається необоротно, некрозу або апоптозу. Будь-яка ж клітинна смерть або навіть підготовка до неї пов'язана з рестрикцією клітинної ДНК, що починається у процесі, а завершується після загибелі клітини. Загибель клітин та рестрикція їх ДНК призводить

одночасно до двох ефектів: а) зменшення в'язкості розчину ДНК за тієї самої його концентрації, внаслідок укорочення фрагментів ДНК; б) посиленого вимивання ДНК з тканини, внаслідок руйнування загнаних клітин та знов-таки укорочення фрагментів ДНК, що призводить до зменшення питомого вмісту ДНК на одиницю маси сирової тканини. Таким чином, добуток коефіцієнтів кратності зменшення в'язкості розчину ДНК за однакової його концентрації та кратності зменшення питомого вмісту ДНК на одиницю маси сирової тканини органа після введення тестованого лікувального чинника характеризує ступінь токсичності тестованого лікувального чинника щодо даного органа.

Приклади практичного застосування винаходу

Широко вживані в клінічній та експериментальній онкології препарати цис-дихлор-діаміноплатини, зокрема цисплатин, відомі тим, що їх побічна токсичність проявляється головним чином щодо нирок (нефротоксичність), а їх токсичність для серцевого м'язу (кардіотоксичність) є незначною навіть при проведенні повного курсу лікування. Тому нами було проведено дослідження з метою порівняти величини КТ для серця і нирок щурів зі злжжисними пухлинами при лікуванні їх цисплатином.

Пухлини штаму, спеціально селекціонованого для досягнення високої резистентності до цисплатину, були перещеплені однаковою кількістю пухлинних клітин чотирьом щурам, однакою за віком та статтю. Резистентний до цисплатину штам був застосований спеціально для того, щоб виключити можливість маскування власної нефротоксичності цисплатину нефротоксичністю продуктів масивного розпаду пухлинної тканини. Після того, як пухлини досягали приблизно 10 мм в діаметрі, двом щурам було проведено по дві ін'єкції цисплатину в черевну порожнину в дозі 1,2 мг цисплатину на 1 кг маси тіла тварин (група "Дослід"). Слід відзначити, що проведені ін'єкції складали неповний курс лікування для щурів (повний складається, як мінімум, з чотирьох ін'єкцій). Такий неповний курс був проведений навмисно, оскільки було доцільно перевірити можливість досягнення технічного результату винаходу, що заявляється, саме на початкових стадіях лікування. Іншим двом щурам ін'єкцій цисплатину не проводили (група "Контроль"). У кожної тварини дослідної групи були взяті обидві нирки та серце. Ці органи були зважені та лізовані розчином, що містив сечовину в концентрації 8М та натрію хлорид в концентрації 4М. З органами тварин контрольної групи були проведені такі ж маніпуляції.

Приклад 1. Дослідження впливу цисплатину на величину КТ нирок щурів.

В процесі спектрофотометричного та віскозиметричного дослідження лізатів нирок контрольних та дослідних тварин були одержані наступні дані (Таблиця 1). Кожне вимірювання проводили не менш ніж тричі. В таблиці наведені лише середні арифметичні значення, оскільки величини стандартних відхилень не використовуються в подальших розрахунках.

Таблиця 1

Параметри для розрахунку КТ, одержані при дослідженні лізатів нирок тварин, лікованих цисплатином

Матеріал	m, г	Δt , с	$C_{DNA} (E_{260})$	КТ
Контроль	2,83	27	0,15	1,67
Дослід	2,88	14	0,17	

Примітка: Величина V для обох матеріалів була однаковою (50 мл), тому при діленні дробів скорочується і в таблиці не наведена.

З таблиці видно, що при застосуванні цисплатину величина КТ для нирок тварин виявилася значно більшою за одиницю, як це і передбачалося.

Приклад 2. Дослідження впливу цисплатину на величину КТ сердець щурів

В процесі спектрофотометричного та віскозиметричного дослідження лізатів сердець контрольних та дослідних тварин були одержані такі дані (Таблиця 2).

Таблиця 2

Параметри для розрахунку КТ, одержані при дослідженні лізатів сердець тварин, лікованих цисплатином

Матеріал	m, г	Δt, с	C _{DNA} (E ₂₆₀)	КТ
Контроль	1,65	27	0,55	0,56
Дослід	1,57	43	0,65	

Примітка: Величина V для обох матеріалів була однаковою (50 мл), тому при діленні дробів скорочується і в таблиці не наведена.

5

З таблиці видно, що при застосуванні цисплатину величина КТ для сердець тварин не перевищувала одиниці, як це і передбачалося. Більш від того, величина КТ виявилася істотно меншою за одиницю, що свідчить про розвиток компенсаторних реакцій в серцевому м'язі.

Таким чином, технічного результату винаходу досягнуто.

10

Література:

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / О.В. Стефанов, ред. - Київ: «Авіценна», 2001. - С. 90-95.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

15

Спосіб експериментальної оцінки побічної токсичності лікувальних чинників, який **відрізняється** тим, що в ньому з матеріалів певного органа, взятих і зважених перед введенням та після введення певного лікувального чинника, одержують лізати за допомогою іонного детергенту, далі вимірюють вміст ДНК в одержаних лізатах, після чого вирівнюють одержані лізати за вмістом ДНК шляхом розведення більш концентрованого лізату лізуючим детергентним розчином, далі вимірюють в'язкість обох лізатів за допомогою віскозиметра і обчислюють коефіцієнт токсичності (КТ) лікувального чинника щодо певного органа за формулою

20

$$КТ = \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Контролю}} : \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Дослід}} ,$$

25

де m - маса зразка тканини; V - об'єм одержаного лізату; Δt - різниця між часом протікання крізь віскозиметр одиниці об'єму лізату після вирівнювання концентрації ДНК в лізатах та часом протікання чистого лізуючого розчину через віскозиметр; C_{DNA} - концентрація ДНК у вихідному лізаті або будь-яка величина, прямо пропорційна концентрації ДНК, наприклад, екстинкція вихідного лізату при довжині хвилі випромінювання 260 нм; одержані результати обчислень інтерпретують наступним чином: якщо КТ>1 - наявна побічна токсичність лікувального чинника щодо даного органа, і токсичність тим більша, що більшою є величина КТ; якщо КТ<1 - лікувальний чинник сприяє виживанню клітин даного органа.

30

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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