



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **65598** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У ТЕСТ-СИСТЕМІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ССАВЦІВ

1

(21) u201106197

(22) 18.05.2011

(24) 12.12.2011

(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.

(72) ЛАВРЕНЧУК ГАЛИНА ЙОСИПІВНА, ЧОБОТЬКО ГРИГОРІЙ МИХАЙЛОВИЧ, ТАЛЬКО ВІКТОРІЯ ВАСИЛІВНА, СЕРГІЄНКО АНДРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, ВЛАСКО ОЛЕНА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб оцінки токсичності іонів важких металів у тест-системі культури клітин ссавців, який включає комплексне дослідження життєздатності клітин, який **відрізняється** тим, що проводиться комплексне дослідження життєздатності клітин (проліферативна, мітотична активність та кількість гігантських полікаріоцитів) в динаміці (кінетика росту) та відрізняється від подібних способів розрахунком за даними кінетики росту питомої швидкості росту (μ) культури (у фазі логарифмічного росту), часу подвоєння культури клітин (t_d) та швидкості розмноження клітин (n), що дозволяє за

2

стандартних умов аналізувати та порівнювати цитотоксичність різних ксенобіотиків і розраховується по наступним формулам:

$$\mu = (\ln X - \ln X_0) t^{-1},$$

де

X - кількість клітин через проміжок часу t (на 5-у добу культивування);

X_0 - кількість клітин на 1-у добу культивування;

t - час спостереження;

за даними питомої швидкості росту (μ) розраховують час подвоєння культури клітин (t_d):

$$t_d = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$$

та швидкість розмноження клітин:

$$n = 3,32 \log(X / X_0),$$

де

X - кількість клітин на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$ на 5-у добу культивування;

X_0 - кількість клітин на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$ на 1-у добу культивування.

Корисна модель стосується біології, зокрема цитології та токсикології, і може бути використана для оцінки концентрації та токсичності іонів важких металів за допомогою тест-системи культури клітин в установах санітарного контролю та гігієни праці.

Масштаби використання хімічних речовин у промисловості, сільському господарстві та побуті надзвичайно великі і на цей час перевищують потенціал біосферної екосистеми та створюють реальну загрозу для здоров'я населення. Забруднення атмосфери, води та ґрунтів важкими металами, як потужний екологічний фактор, суттєво лімітує життєдіяльність багатьох біооб'єктів і їх угруповань, що підтверджується фізіологічними та біохімічними змінами на усіх рівнях структурної організації - клітинному, організмовому та популяційному [1].

Біологічна індикація дії важких металів (ВМ) на довкілля в деяких її напрямках досягла значного прогресу. Розроблено методи фітоіндикації атмосферних забруднень, включаючи біохімічні і біофізичні дослідження [2, 3], нові методичні підходи щодо оцінки змін структури та функціонування мікробіоценозу ґрунту в умовах забруднення металами-токсикантами [3, 4], розроблено системи показників для мікробіологічного моніторингу ґрунтів, забруднених ВМ [5], запропоновано систему біотестів [6], яка складається з визначення чисельності основних еколого-трофічних груп мікроорганізмів, активності ґрунтових ферментів, фітотоксичної активності ґрунту, вуглецю мікробної біомаси, сумарного біологічного показника, показника біологічної деградації. Вибір показників визначається чутливістю тест-показника до дії фактора забруднення. Однак, питання оцінки реакції біологічних систем на забруднення ВМ досить

(13) **U**

(11) **65598**

(19) **UA**

складне внаслідок існування проблеми вибору біологічних індикаторів, необхідності урахування критеріїв вибору показників для тестування.

Запропонований метод, що ми прийняли за аналог, дозволяє використовуючи мікроорганізми *Salmonella typhimurium*, *E. coli* [3] одночасно реєструвати токсичну і мутагенну дію забруднень. Токсичність важких металів і ґрунту оцінювали відсотком інгібування росту тест-культури досліджуваним агентом. Проникаючи у клітини, іони важких металів можуть призводити до сповільнення ростових процесів унаслідок зниження інтенсивності клітинних поділів і зміни співвідношення клітин в окремих фазах мітозу. Недоліком відомого способу є необхідність використання як тест-культуру мікроорганізми *Salmonella typhimurium* та *E. coli*, що не дозволяє екстраполювати отримані результати на клітинний чи організмний рівень теплокровних ссавців.

Токсикокінетика важких металів в організмі дуже складна, різноманітна, залежить від якості металу як токсиканту чи мікроелемента, його концентрації, особливостей метаболізму та інше. Найбільш об'єктивно характеризує загальне забруднення організму металами кров та сеча.

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 біolumінесценції (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 до запропонованого є спосіб диференційованої оцінки ступеня ушкодження гепатоцитів при хронічному отруєнні алкоголем (1), який реалізується шляхом характеристики морфологічних змін гепатоцитів (виявлення жирової дистрофії) з використанням відповідних барвників і за допомогою мікроскопу. Останній був прийнятий нами за прототип. Недоліком відомого способу, крім інвазивності, є візуальна оцінка змін у досліджуваних об'єктах, яка не може бути повністю позбавлена суб'єктивного фактора, обумовленого досвідом конкретного дослідника.

Технічною задачею запропонованого способу є створення способу оцінки стану клітин *in vitro* з використанням відповідних барвників і за допомогою мікроскопа при інкубації їх з іонами важких металів на основі можливості виявлення порушення здатності клітин до утворення щільного моношару за кінетикою росту, оцінки мітотичної актив-

ності досліджуваних клітин за показниками швидкості розмноження та часу подвоєння.

Технічна задача вирішується за рахунок того, що проводять комплексне дослідження впливу сполук важких металів на тест-систему - асинхронну культуру фібробластоподібних клітин (лінія L₉₂₉). Спосіб дозволяє визначити як загальний (мінімум декілька складових) стан клітин у культурі (за кінетикою росту клітинної популяції та мітотичної активності), так і окремі його характеристики (мінімум одна складова: кількість багатоядерних гігантських клітин), виявити відмінності у функціональному стані клітин, які перебувають у фізіологічних умовах та клітин, за наявності в поживному середовищі різних концентрацій іонів важких металів.

Використовуючи метод порівняння характеристик відповіді клітин у тест-системі, які перебувають у нормальних фізіологічних умовах (інтактних), та в умовах інкубації їх з іонами важких металів, роблять висновок щодо патологічного стану клітин *in vitro*. Здійснення способу пояснюється прикладами дослідження показників життєздатності клітин у тест-системі культури фібробластоподібних клітин, які відображають різні складові функціонального стану клітини. Спосіб застосовується наступним чином. До культури фібробластоподібних клітин лінії L₉₂₉, посаджених в культуральні флакони з покривними скельцями в кількості 5 тис. клітин в 1мл поживного середовища складу RPMI 1640, фетальної телячої сироватки (10 %) та антибіотиків додають розчини сполук важких металів у тій концентрації, що досліджується. Кожної доби упродовж 6 діб готують препарати для оптичної мікроскопії: фіксація етиловим спиртом 10 хв., відмивання проточною водою - 5 хв., фарбування гематоксилином-еозином, просвітлення в ксилолі та наклеювання на предметне скло канадським бальзамом. Під мікроскопом при збільшенні у 1000 разів у 30 полях зору підраховують середню кількість клітин у полі зору, кількість мітозів (‰) та кількість полікаріоцитів (‰).

За отриманими даними будують залежності кінетики росту, мітотичної активності та кількості багатоядерних клітин (як показника репродуктивної здатності клітин). За кривими росту клітинної популяції розраховують наступні показники: питому швидкість росту (μ) культури клітин (у фазі логарифмічного росту)

Приклад 1.

- об'єкт дослідження - тест-система: асинхронна культура фібробластоподібних клітин (лінія L₉₂₉) - інтактні клітини;

- значущий параметр - кінетика росту клітин в культурі без додавання в культуральне середовище іонів важких металів, мітотична активність клітин та кількість полікаріоцитів у культурі клітин;

- методика визначення - визначення середньої щільності клітинної популяції на площі препарату 0,05 мм² на 1, 2, 3, 4, 5 та 6 доби культивування та розрахунок на основі цих даних питомої швидкості росту (μ) культури (у фазі логарифмічного росту) в контролі (інтактні клітини):

$$\mu = (\ln X - \ln X_0) t^{-1},$$

де X - кількість клітин через проміжок часу t (на 5-у добу культивування);

X_0 - кількість клітин на 1-у добу культивування;

t - час спостереження.

Для інтактної культури клітин питома швидкість росту $\mu = 0,39$. За даними питомої швидкості росту (μ) розраховуємо час подвоєння культури клітин (t):

$$td = \ln 2 / \mu = 0,693 \mu,$$

який складає - 0,27,

та швидкість розмноження клітин:

$$n = 3,32 \log(X/X_0),$$

де X - кількість клітин на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$ на 5-у добу культивування;

X_0 - кількість клітин на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$ на 1-у добу культивування.

Для інтактної культури клітин швидкість розмноження $n = 2,86$. Одночасно на цих же препаратах підраховували кількість мітозів на 1000 клітин (%), а також кількість гігантських полікаріоцитів на 1000 клітин (%).

Залежність значень показників життєздатності в інтактній культурі клітин ілюструє Фіг. 1.

Приклад 2.

- об'єкт дослідження - тест-система: асинхронна культура фібробластоподібних клітин (лінія L_{929}), до якої після експлантації додавали іони свинцю в концентрації 10 мкг/мл;

- значущий параметр - кінетика росту клітин в культурі при інкубації з іонами свинцю в концентрації 10 мкг/мл, мітотична активність клітин та кількість полікаріоцитів у культурі клітин;

- методика визначення - визначення середньої щільності клітинної популяції на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$ на 1, 2, 3, 4, 5 та 6 доби культивування та розрахунок на основі цих даних питомої швидкості росту (μ) культури (у фазі логарифмічного росту), часу подвоєння культури клітин (td) та швидкості розмноження клітин (n) за умов інкубації клітин з іонами свинцю в концентрації 10 мкг/мл.

Значення цих показників наступне:
 $\mu = 0,16$; $td = 0,1$; $n = 1,16$.

Аналіз вищеназваних показників та порівняння їх з такими в інтактному контролі вказує на те, що іони свинцю в концентрації 10 мкг/мл майже у 2,5 рази інгібують проліферативну та мітотичну активність клітин у тест-системі культури клітин лінії L_{929} , що свідчить про суттєву цитотоксичність свинцю.

Одночасно на цих же препаратах підраховували кількість мітозів на 1000 клітин (%), а також кількість гігантських полікаріоцитів на 1000 клітин (%).

Залежність значень показників життєздатності в культурі клітин за умов інкубації з іонами свинцю в концентрації 10 мкг/мл ілюструє Фіг. 2.

Приклад 3.

- об'єкт дослідження - тест-система: асинхронна культура фібробластоподібних клітин (лінія

L_{929}), до якої після експлантації додавали іони міді в концентрації 250 мкг/мл;

- значущий параметр - кінетика росту клітин в культурі при інкубації з іонами міді в концентрації 250 мкг/мл, мітотична активність клітин та кількість полікаріоцитів у культурі клітин;

- методика визначення - визначення середньої щільності клітинної популяції на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$ на 1, 2, 3, 4, 5 та 6 доби культивування та розрахунок на основі цих даних питомої швидкості росту (μ) культури (у фазі логарифмічного росту), часу подвоєння культури клітин (td) та швидкості розмноження клітин (n) за умов інкубації клітин з іонами міді в концентрації 250 мкг/мл.

Значення цих показників наступне:
 $\mu = 0,30$; $td = 0,21$; $n = 2,16$.

При порівнянні значень вказаних показників з контрольними та при інкубації клітин з іонами свинцю видно, що цитотоксичність іонів міді значно менша, ніж іонів свинцю (в 1,3 рази у порівнянні з контрольними показниками).

Залежність значень показників життєздатності в культурі клітин за умов інкубації з іонами міді в концентрації 250 мкг/мл ілюструє Фіг. 3.

Таким чином, спосіб, який заявляється, є достатньо простим у застосуванні і демонструє значні можливості по виявленню змін в клітинах *in vitro* на різних етапах розвитку патологічного процесу в умовах впливу різних концентрацій важких металів.

На підставі даних порівняльного аналізу показників, які характеризують клітинні реакції на вплив іонів важких металів, роблять висновок про їх цитотоксичність та резервні можливості клітин відносно підтримання гомеостазу.

Джерела інформації:

1. Коцюбинська Н. П. Загальні механізми адаптації рослин до негативних чинників різного походження. - Фізіологія рослин на межі тисячоліть. - Т. 2. - Київ, 2001. - С. 60-67.
2. Щербаченко О. І. *Mox Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. як перспективний вид для біоіндикації забруднення природного середовища // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти: Тези доп. II міжнародної наукової конференції (м. Львів, серпень 2004 р.). - Львів, 2004. - С. 337.
3. Демченко В. Ф., Александрова Л. Г., Андрушишина И. Н. и др. Опыт биомониторинга профессиональной экспозиции тяжелых металлов свинца и кадмия / // Гигиена труда.-2001. - Вып. 32. - С. 230-236.
4. Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Биологические принципы мониторинга и нормирования загрязнения почв (на примере тяжелых металлов). - Ростов-на-Дону: Изд-во ЦВВР, 2001.-64 с.
5. Andrzejak R., Poreba R., Derkacz A. Effect of chronic lead poisoning on the parameters of heart rate variability // Med. Pr.-2004. - Vol. 55 (2). - P. 139-144.
6. Христенко С. І., Шатохіна С. Ф., Мірошніченко М. М., Фатеев А. І. Вплив поліелементного за-

бруднення на формування і функціонування мікробного ценозу чорнозему опідзоленого // Вісник Запорізького держ. ун-ту. Біологічні науки.-2002. - № 2. - С. 153-156.

7. Погорелова О. С. Влияние различных комбинаций солей тяжелых металлов на структурную перестройку миокарда крыс зрелого возраста //Морфология. 2007. - Т. 1, № 4. - С. 71-76.

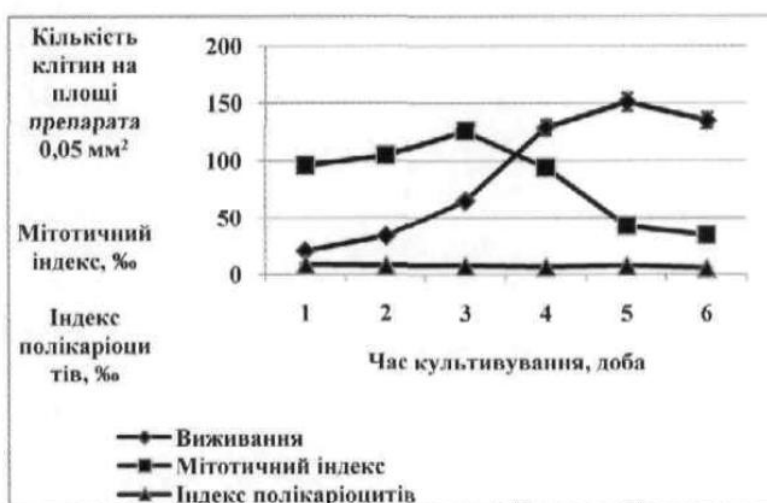
8. Головки Л. Л. Стан захисних систем організму за умов поєднаної дії солей кадмію і свинцю та нітриту натрію // Медична хімія.-2004. - Т. 6, № 3. - С. 176.

9. Пат. 1103UA, МПК7 А61В10/00 Спосіб диференційованої оцінки ступеня uszkodження гепатоцитів при хронічному отруєнні алкоголем / Т. П. Якімова, Г. О. Ковальов: заявник і патентотримач Харківська медична академія післядипломної освіти.

ти. - № u200503691; заявл. 18.04.2005; опубл. 15.12.2005, бюл. № 12.

10. 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.

11. 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.



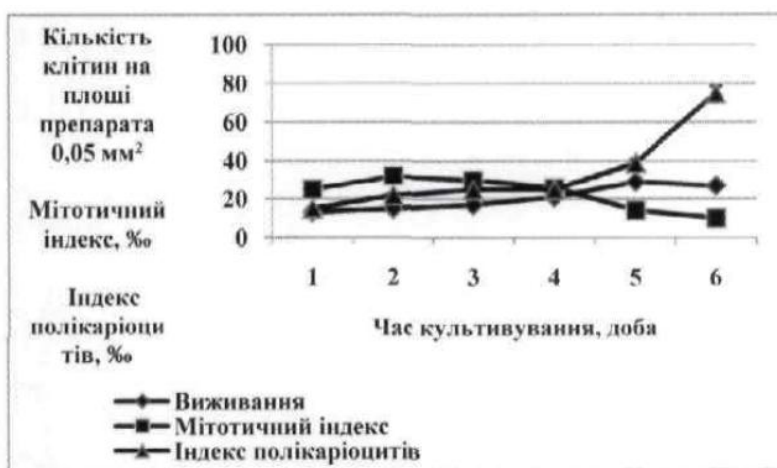
Кінетика росту інтактної культури клітин лінії L929.

Питома швидкість росту: $\mu = 0,39$

Час подвоєння культури: $td = 0,27$

Швидкість розмноження: $n = 2,86$

Fig.1



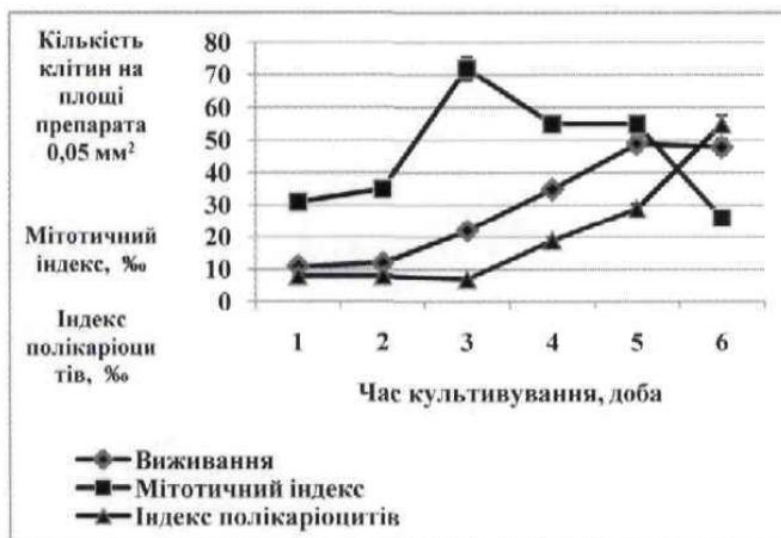
Кінетика росту культури клітин лінії L₉₂₉ за умов інкубації їх з іонами свинцю в концентрації 10 мкг/мл.

Питома швидкість росту: $\mu = 0,16$

Час подвоєння культури: $td = 0,11$

Швидкість розмноження: $n = 1,16$

Фіг.2



Кінетика росту культури клітин лінії L₉₂₉ за умов інкубації їх з іонами міді в концентрації 250 мкг/мл.

Питома швидкість росту: $\mu = 0,30$

Час подвоєння культури: $td = 0,21$

Швидкість розмноження: $n = 2,16$

Фіг.3