



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **68137**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/68** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 12075**

(22) Дата подання заявки: **14.10.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **12.03.2012**

(46) Публікація відомостей **12.03.2012, Бюл.№ 5**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Сокурєнко Людмила Михайлівна (UA),  
Чайковський Юрій Богданович (UA),  
Трахтенберг Ісак Михайлович (UA),  
Кудрявець Юрій Йосипович (UA),  
Бездєнєжних Наталя Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,  
бул. Т. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)**

## (54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОЇ ОЦІНКИ НЕЙРОТОКСИЧНОЇ ДІЇ РТУТІ (НА КУЛЬТУРІ НЕРВОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ)

(57) Реферат:

Спосіб кількісної оцінки нейротоксичної дії ртуті (на культурі нервових клітин людини) шляхом розрахунку кількості живих та мертвих клітин, визначення індексів цитопатичних змін за мертвими ( $IC_{CD}$ ) та за живими клітинами ( $IC_{CL}$ ), індексів проліферації за мертвими ( $IP_d$ ), за живими клітинами ( $IP_d$ ) та за загальною кількістю клітин ( $IP_g$ ).

**UA 68137 U**



Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до токсикології та професійних патології, гігієни та морфології, і може бути використана для визначення наявності нейротоксичної дії сполук ртуті на клітини нервової тканини.

Проблема нейротоксичності важких металів залишається остаточно не вирішеною [7, 8]. У той же час актуальність та значимість її велика: обсяги виробництва хімічних речовин та їх викидів у навколишнє середовище постійно зростають, а ефективність класичних методів дослідження ступеня їх токсичності і небезпечності недостатня, що обумовлює розвиток нових напрямків оцінки токсичності речовин, таких як визначення цитотоксичної дії на культуру нервових тканин людини [6].

Нейробластома та гліобластома є типовими представниками ембріональних злоякісних пухлин нервової системи, проте вони здатні до спонтанної регресії; за певних умов можуть слідувати програмі диференціювання нейрона, демонструють синтез нейромедіаторів і специфічних ферментів, наявність електричної і хімічної збудливості мембрани. Основна властивість клітин нейробластоми та гліобластоми полягає у можливості прижиттєвого аналізу динаміки морфологічних і функціональних змін цих клітин в умовах *in vitro* під впливом біологічно активних речовин, які вводяться в культуральне середовище.

У літературі [3, 4] описані способи кількісної оцінки нейротоксичності, однак вони мають недоліки і не завжди відповідають вимогам до оцінки результатів експериментальних моделей цитонейротоксичності.

Відомий спосіб визначення кількісних показників дії хімічних речовин на нервову систему, суть якого полягає у розробці визначення відсотків живих та мертвих клітин, після культивування живі та мертві клітини підраховували в гемоцитометрі за допомогою барвника трипанового синього [1].

Недоліком цього способу є не врахування таких явищ, як руйнування мертвих клітин та здатність до поділу живих клітин, що утруднює порівняльну оцінку цитотоксичної дії речовин на клітини у динаміці.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб оцінки цитонейротоксичних ефектів [5], вибраний нами як прототип, суть якого полягає у розробці визначення у відсотках кількості Hoechst-позитивних клітин, які підраховували на 100 клітин кожної проби.

Недоліком цього способу є неврахування вірогідності руйнування мертвих клітин та здатність до поділу живих клітин і, як наслідок, неможливість об'єктивної характеристики змін оцінки цитотоксичної дії речовин на клітини у часі.

Задача, яка поставлена в основу способу, що заявляється, полягає в підвищенні точності кількісної оцінки нейротоксичної дії ртуті за умов експозиції важкими металами (хлорид ртуті).

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який включає розрахунок відсотків живих та мертвих клітин, згідно з корисною моделлю, додатково визначають індекси цитопатичних змін за мертвими клітинами ( $ICC_D$ ) та за живими клітинами ( $ICC_L$ ), індекси проліферації за мертвими ( $IP_d$ ), за живими клітинами ( $IP_l$ ) та за загальною кількістю клітин ( $IP_q$ ) і при зміні їх кількості оцінюють нейротоксичну дію ртуті.

Запропонований засіб виконується наступним чином.

Цитотоксична дія хлориду ртуті вивчалась методом двократних серійних розведень на постійних лініях клітин IMR-32 (нейробластома людини) та U-373 MG (гліобластома людини), які були вирощені за стандартних умов і утворювали моношар. Культури отримані з банку культури клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Е. Кавецького НАН України. Вибір культур клітин обумовлений походженням з клітин організму людини, порівняною легкістю культивування, а також нейрогенним походженням, що дає змогу екстраполювати результати на нейрони *in vivo* [2].

Досліджувані клітини культивували в повному поживному середовищі RPMI-1640 (SIGMA, США), що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти (SIGMA, США), у зволоженій атмосфері з 5 %  $CO_2$  при 37 °C. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину версена (0,02 %, "БіоТест-лабораторія", Україна) при утворенні клітинами на субстраті суцільного моношару (4-та доба росту) заміщали середовищем, яке містило хлорид ртуті (II) в концентраціях від 1000 до 0,1 мкмоль/мл. Кожне розведення хімічного агента досліджувалось у 4 паралельних серіях. За контроль взяли клітини без додавання хімічних сполук.

Чутливість клітин до дії хлориду ртуті в присутності досліджуваних антидотів вивчали за інгібіцією цитотоксичного ефекту ртуті при фарбуванні клітин трипановим синім, підрахунок клітин здійснювали за допомогою гемоцитометра. При цьому клітини висівали на 24-лункові планшети з концентрацією  $4 \times 10^4$  клітин/лунку (в 1 мл середовища), через 24 години вносили хлорид ртуті з антидотами та інкубували протягом 48 годин за стандартних умов. Підрахунок клітин здійснювали за допомогою гемоцитометра, фарбували клітини вітальним барвником -

0,4 % трипановим синім, кількість клітин визначали за формулою:  $A/80 \times 2 = X \times 10^6$  (клітин в мілілітрі середовища), де А - кількість клітин, що була порахована у камері Горяєва (в 5-ти квадратах);  $\times 2$  - розведення з трипановим синім (1:1). Забарвлені клітини рахували за допомогою світлового мікроскопа. Для приготування цитологічних препаратів готували суспензію досліджуваних клітин у фізіологічному розчині в концентрації від 0,2 до  $0,3 \times 10^6$  клітин/мл, в цитоцентрифугальні кювети вносили по 50 мкл даної суспензії та центрифугували протягом 10 сек. при 1500 об./хв., висушували та фарбували. Для цього наносили на препарат барвник Майн-Грюнвальда на 3 хв., покривали скло зверху дистильованою водою рівномірно "гіркою", залишали ще на 3 хв., промивали дистильованою водою та наносили барвник Романовського розведений 1:10 дистильованою водою на 20 хв. Промивали препарат під дистильованою, а потім проточною водою та висушували. Аналізували під світловим мікроскопом (AxioStarPlus (Carl Zeiss, Німеччина).

Вивчення кожного об'єкта дослідження здійснювалось чотирикратно. Для підвищення об'єктивної оцінки отриманих результатів зроблені такі показники, як відсотковий вміст клітин, індекси цитопатичних змін та індекси проліферації. У зв'язку з тим, що відбувався поділ живих та руйнування мертвих клітин, визначали такі середні показники: відсотки живих (нейробластів та нейрогліобластів) ( $L$ , %), індекси цитопатичних змін за мертвими клітинами ( $ICC_D$ ) та за живими клітинами ( $ICC_L$ ), індекси проліферації за мертвими ( $IP_d$ ), за живими клітинами ( $IP_1$ ) та за загальною кількістю клітин ( $IP_q$ ).

Розрахунки показників проводили наступним чином:

$$L_{ex} = l/g \times 100 \%, \text{ де}$$

$l$  - кількість живих клітин;

$g$  - кількість всіх клітин у дослідженні.

$$D_{ex} = d/g \times 100 \%, \text{ де}$$

$d$  - кількість мертвих клітин;

$g$  - кількість всіх клітин у дослідженні.

Для досліджень з різними дозами хлориду ртуті:

$$ICC_L = L_{ex}/L_{hq}, \text{ де}$$

$L_{ex}$  - відсотки живих клітин від загальної кількості клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$L_{hq}$  - відсотки живих клітин від загальної кількості клітин у контролі.

$$ICC_D = D_{ex}/D_{hq}, \text{ де}$$

$D_{ex}$  - відсотки мертвих клітин від загальної кількості клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$D_{hq}$  - відсотки мертвих клітин від загальної кількості клітин у контролі.

$$IP_G = g_{ex}/g_k; IP_L = l_{ex}/g_k; IP_D = d_{ex}/g_k, \text{ де}$$

$g_{ex}$  - кількість всіх клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$g_k$  - кількість всіх клітин у контролі;

$l_{ex}$  - кількість живих клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$d_{ex}$  - кількість мертвих клітин у досліді з хлоридом ртуті.

Статистичну обробку результатів вимірів структур спинного мозку та чутливих вузлів, а також даних досліджень *in vitro* проводили з використанням пакета статистичних програм Statistica 4.0 (Statistica Inc. США), Biostat і MS Excel. Відмінності між групами встановлювали використанням непараметричного критерію Манна-Утні-Вілкоксона. Достовірними вважали відмінності з рівнем значущості більше 95 % ( $p < 0,05$ ).

Аналіз результатів дослідження показав, що на незабарвлених препаратах живої культури визначаються щільно розміщені клітини фібробластичного та нейробластичного рядів веретеноподібної форми та мультиполярні клітини з відростками, а також незначна кількість клітин зі зруйнованою структурою за дії концентрацій хлориду ртуті 1 та 0,1 мкМоль/мл на 24 годину. Кількість зруйнованих клітин на 48 годину зростає. Цитологічне дослідження визначає переважно великі круглі клітини та, в меншій кількості, дрібні базофільні клітини округлої форми з крупними ядрами. Зустрічаються нейробласти з мітотичними ядрами, а також зруйновані клітини. При більших дозах сулему відбулась масова загибель усіх клітин. Різні дози хлориду ртуті впливають на життєздатність та проліферацію клітин лінії IMR-32 в різному ступені: в концентраціях 1000 та 100 мкМоль/мл більш проявляється цитотоксичний ефект, а за дії хлориду ртуті в концентраціях 1,0 та 0,1 мкМоль/мл - пригнічення проліферації, обидва патологічних механізми спостерігаються за дії концентрації 10 мкМоль/мл.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє провести оцінку цитотоксичної активності сполук металів щодо впливу на різні органи і тканини, з яких вони побудовані, та з'ясувати їх властивості впливати на життєздатність та проліферацію.

Джерела інформації:

1. Кудрявец Ю.Й. Підвищення чутливості пухлинних клітин людини до цитотоксичних чинників в умовах пролонгованої дії інтерферону *in vitro* / Кудрявец Ю.Й., Безденежних Н.О., Марченко М.Л. // Современные проблемы токсикологии - 2008. - № 4. - С. 20-25.

2. Марченко М.Л., Безденежних Н.О., Кудрявец Ю.Й. Порівняльна характеристика цитотоксичного впливу сполук важких металів на клітини людини, культивовані *in vitro* // Укр. журн. з проблем медицини праці. - 2008. - Т. 3. - № 15. - С. 27-32.

3. Трахтенберг І.М. Альтернативні методи і тест-системи / Трахтенберг І.М., Коваленко В.М., Кокшарева Н.В. та ін. - ВД "Авіцена", 2008. - 268 с.

4. Трахтенберг І.М. Переваги методу дослідження токсичного впливу сполук важких металів в культурі клітин людини *in vitro* порівняно з традиційним методом *in vivo* на тваринах як більш достовірного та адекватного / Трахтенберг І.М., Марченко М.Л., Безденежних Н.О., Кудрявец Ю.Й. // Современные проблемы токсикологии - 2010. - № 2-3. - С. 69-72.

5. Экспериментально-морфологическая оценка чувствительности глиом головного мозга к  $\alpha$ -интерферону. / Семенова В.М., Лисяный Н.И., Любич Л.Д., Стаино Л.П. // Український нейрохірургічний журнал. - 2005. - № 4. - С. 26-34.

6. Da-Zhi W. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates / Da-Zhi Wang // A Brief Review Mar Drugs. - 2008. - Iss.2, № 6. - P. 349-371.

7. Duruible J.O., Ogwuegbu M.O.C., Egwurugwu J.N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects // Internat. J. of Physical Sciences.-2007. - V. 2, № 5. - P. 233-307.

8. Scudiero D, Evaluation of a Soluble Tetrasolium / Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in Culture using human and other cell lines / D. Scudiero [et al.] // Cancer Res. - 1988. - V. 48. - P. 4827-4833.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб кількісної оцінки нейротоксичної дії ртуті (на культурі нервових клітин людини), що включає розрахунок кількості живих та мертвих клітин, який **відрізняється** тим, що додатково визначають індекси цитопатичних змін за мертвими ( $ICC_D$ ) та за живими клітинами ( $ICC_L$ ), індекси проліферації за мертвими клітинами ( $IP_d$ ), за живими клітинами ( $IP_g$ ) та за загальною кількістю клітин ( $IP_g$ ), розрахунки показників проводять наступним чином для досліджень з різними дозами хлориду ртуті:

$$ICC_L = L_{ex} / L_{hg}, \text{ де}$$

$L_{ex}$  - відсотки живих клітин від загальної кількості клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$L_{hg}$  - відсотки живих клітин від загальної кількості клітин у контролі,

$$L_{ex} = l/g \times 100 \%, \text{ де}$$

$l$  - кількість живих клітин;

$g$  - кількість всіх клітин у дослідженні,

$$ICC_D = D_{ex} / D_{hg}, \text{ де}$$

$D_{ex}$  - відсотки мертвих клітин від загальної кількості клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$D_{hg}$  - відсотки мертвих клітин від загальної кількості клітин у контролі,

$$D_{ex} = d/g \times 100 \%, \text{ де}$$

$d$  - кількість мертвих клітин;

$g$  - кількість всіх клітин у дослідженні,

$$IP_G = g_{ex} / g_k; IP_L = l_{ex} / g_k; IP_D = d_{ex} / g_k \text{ де}$$

$g_{ex}$  - кількість всіх клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$g_k$  - кількість всіх клітин у контролі;

$l_{ex}$  - кількість живих клітин у досліді з хлоридом ртуті;

$d_{ex}$  - кількість мертвих клітин у досліді з хлоридом ртуті.

---

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

---

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