



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75710** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 06647	(72) Винахідник(и):	Шляховенко Володимир Олексійович (UA), Орловський Олексій Аркадійович (UA)
(22) Дата подання заявки:	31.05.2012	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.12.2012		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.12.2012, Бюл.№ 23		

(54) СТАНДАРТИЗОВАНИЙ СПОСІБ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ОЦІНКИ ПОБІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ ЛІКУВАЛЬНИХ ЧИННИКІВ

(57) Реферат:

Спосіб експериментальної оцінки побічної токсичності лікувальних чинників включає одержання лізатів за допомогою іонного детергента з матеріалів певного органа, взятих і зважених перед введенням та після введення певного лікувального чинника. Вимірюють вміст ДНК в одержаних лізатах, вирівнюють одержані лізати за вмістом ДНК шляхом розведення більш концентрованого лізату лізуючим детергентним розчином. Вимірюють в'язкість обох лізатів за допомогою віскозиметра і обчислюють коефіцієнт токсичності. За одержаними результатами обчислень встановлюють про наявність побічної токсичності лікувального чинника щодо даного органа або про сприяння лікувального чинника виживанню клітин даного органа.

UA 75710 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема онкології та токсикології.

Найближчим аналогом способу, що заявляється, є в цілому методологічний підхід, згідно з яким 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.

В основу корисної моделі 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 до та після введення певних лікувальних чинників, одержують, окремо для кожного органа, лізати за допомогою іонного детергента, 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 детергента, 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 сироватки тканини органа після введення тестованого лікувального чинника, тобто 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.

Якщо $КТ > 1$ - це свідчить про наявність побічної токсичності лікувального чинника щодо даного органа, і токсичність тим більша, чим більшою є величина $КТ$. Якщо ж $КТ < 1$ - 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, що заявляються, та технічним результатом корисної моделі 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 загинувших клітин та знов-таки укорочення фрагментів ДНК, що призводить до

зменшення питомого вмісту ДНК на одиницю маси сирої тканини. Таким чином, добуток коефіцієнтів кратності зменшення в'язкості розчину ДНК за однакової його концентрації та кратності зменшення питомого вмісту ДНК на одиницю маси сирої тканини органа після введення тестованого лікувального чинника характеризує ступінь токсичності тестованого лікувального чинника щодо даного органа.

Приклади практичного застосування корисної моделі

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 злоякісними пухлинами при лікуванні їх цисплатином.

Пухлини штаму, спеціально селекціонованого для досягнення високої резистентності до цисплатину, були перещеплені однаковою кількістю пухлинних клітин чотирьом щурам, однаковим 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 досягли 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 корисної моделі, що заявляється, саме на початкових стадіях лікування. Іншим двом щурам ін'єкцій цисплатину не проводили (група "Контроль"). У кожній 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 наступні 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.

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

Таким чином, технічного результату корисної моделі досягнуто.

Джерела інформації:

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб експериментальної оцінки побічної токсичності лікувальних чинників, який **відрізняється** тим, що з матеріалів певного органа, взятих і зважених перед введенням та після введення певного лікувального чинника, одержують лізати за допомогою іонного детергента, 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 далі обчислюють коефіцієнт токсичності (КТ) лікувального чинника щодо певного органа за формулою:

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

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 - це свідчить про наявність побічної токсичності лікувального чинника щодо даного органа, і токсичність тим більша, чим більшою є величина КТ; якщо ж КТ < 1 - це свідчить про сприяння лікувального чинника виживанню клітин даного органа.

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

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