



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81863** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 01528	(72) Винахідник(и): Трахтенберг Ісаак Михайлович (UA), Марченко Марина Леонідівна (UA), Легкоступ Людмила Анатоліївна (UA), Мележик Ірина Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 08.02.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2013, Бюл.№ 13	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МЕДИЦИНИ ПРАЦІ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Саксаганського, 75, м. Київ, 01033 (UA)
	(74) Представник: Кравець Наталія Леоніївна, реєстр. №382

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ГОСТРОЇ ОРГАННОЇ ТОКСИЧНОСТІ СПОЛУК ВАЖКИХ МЕТАЛІВ IN VITRO В МОДЕЛІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення органної токсичності сполук важких металів in vitro в моделі культур клітин для різних концентрацій сполук важких металів. Як моделі оцінки гострої органної токсичності сполук важких металів in vitro використовують культури клітин органів людини, у поживне середовище яких вносять досліджувані концентрації сполук важких металів, за допомогою тестів з метилтіазолілтетразолієм, нейтральним червоним та сульфородаміном В визначають показники цитотоксичної дії та EC₅₀, порівнюють їх для різних культур, таким чином знаходять органоспецифічну культуру клітин, що була найбільш чутливою до дії досліджуваної речовини.

UA 81863 U

Корисна модель належить до галузі профілактичної медицини, зокрема гігієни, та застосовується для визначення та прогнозування органної токсичності сполук важких металів під час їх комплексної токсиколого-гігієнічної оцінки.

Відомий спосіб визначення органної токсичності ксенобіотиків в гострих дослідів *in vivo* із використанням тварин за допомогою техніки гістологічних, імуноцитохімічних, біохімічних досліджень, описаний для оцінки токсичності хімічних речовин *in vivo*. З цієї метою відбирають 5 тварин одного віку, статі, виду, лінії. Першій тварині (перорально, інтерперитонеально або внутрішньовенно) вводять дозу досліджуваної речовини, нижчу від передбачуваного показника ЛД₅₀ (летальна доза, що викликає загибель 50 % тварин в експерименті). Якщо тварина виживе протягом 48 годин, наступну концентрацію речовини збільшують в 3,2 разу від першої досліджуваної. У випадку загибелі тварини наступну дозу навпаки зменшують у 3,2 разу. При загибелі тварини після введення наступної концентрації дослід зупиняють. За тваринами обов'язково спостерігають протягом 48 годин. За результатами експерименту розраховують ЛД₅₀ та конфедидційні інтервали і відносну похибку. Для дослідження гострої органної токсичності проводять розтин кожної піддослідної тварини, відбирають органи для патоморфологічного дослідження. При патоморфологічному дослідженні проводять аналіз ураження кожного досліджуваного органу (якісний аналіз) (OECD/OCDE 425 Adopted: 3 October 2008 © OECD, (2008) You are free to use this material for personal, non-commercial purposes without seeking prior consent from the OECD, provided the source is duly mentioned. Any commercial use of this material is subject to written permission from the OECD. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP))

Недоліками відомого методу визначення гострої токсичної дії речовин *in vivo* є – необхідність використання значної кількості піддослідних тварин, його достатня трудомісткість та довготривалість.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення та прогнозування гострої органної токсичності *in vitro*, що включає внесення розчинів сполук важких металів до ростового середовища разом із культивованими клітинами людини органного походження та оцінку цитотоксичної дії, вказаних хімічних речовин через 24 години, подальше порівняння рівня цитотоксичної дії на органоспецифічні клітини за показником EC₅₀ (ефективна концентрація речовини, що викликає 50 % загибелі клітин в культурі).

Поставлена задача вирішується тим, що спочатку шляхом експерименту було підібрано метод визначення цитотоксичної дії, а потім розроблено спосіб оцінки органної токсичності *in vitro*.

Пропонований спосіб ґрунтується на визначенні цитотоксичної дії сполук важких металів в тесті із застосуванням культур клітин людини органного походження з урахуванням кількості клітин та оцінки активності мітохондріальних дегідрогеназ в метилтіазолілтетразолієвому тесті (MTT), цілісності мембран лізосом в тесті з нейтральним червоним та рівня синтезу загального білка клітинами в тесті з сульфородаміном В.

Спосіб виконують наступним чином: готують стокові розчини сполук важких металів, які потім методом двократних розведень вносять в лунки 96-лункової планшети, де знаходяться інкубовані клітини та поживне середовище.

Приклад

1. Для дослідження чутливості клітин різного органного походження (Клітини недрібноклітинного раку легені людини – лінія A-549. 2. Іморталізовані нормальні кератиноцити людини – лінія HaCaT. 3. Нормальні фібробласти людини. 4. Епітеліальні клітини карциноми печінки людини – лінія HepG2. 5. Клітини епітеліальної морфології колоректального раку людини – лінія Colo-205. 6. Ембріональні клітини нирки людини – лінія 293. 7. Нейробласти нейробластоми людини – лінія IMR-32. 8. Клітини астроцити-гліобластоми людини – лінія клітин U-373) до впливу солей та наночастинок важких металів в умовах гострої експозиції суспензії клітин висаджували на 96-лункові пластикові планшети в концентрації 5×10^3 - 1×10^4 клітин/лунка в 100 мкл середовища RPMI-1640 з глютаміном 2 мМоль /л, що містило 10 % ембріональної сироватки теляти та 40 мкг/мл гентаміцину. Через 24 години інкубації в стандартних умовах при температурі 37 °C та 5 % вмістом CO₂ в повітрі вносили досліджувані речовини в широкому діапазоні концентрацій методом 2-кратних розведень: солі металів (CdSO₄, MnSO₄, HgCl₂ та Pb (CH₃COO)₂·3H₂O), наночастинок (срібла, міді, молібдену та сульфиду свинцю). Знову інкубували клітини за стандартних умов 24 години, після чого проводили тести з МТТ, Сульфородаміном В та барвником нейтральним червоним.

МТТ-тест. Після інкубації клітин протягом 24 годин в кожну лунку 96-лункового планшета вносили по 10 мкл МТТ та інкубували при 36,5 °C в зволоженій атмосфері 3 години; згодом планшет центрифугували (1500 об/хв. протягом 5 хвилин), після чого в клітинах на дні лунок

візуально визначались лілові кристали формагану. Видаляли супернатант і додавали в кожную лунку по 50 мкл розчинника кристалів формагану DMSO. Через 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі відбувалось повне розчинення кристалів. Оптичну густину (ОГ) вмісту лунок визначали за допомогою мультилуноквого спектрофотометру при довжині хвилі – 540 нм.

5 Фарбування сульфородаміном В – тест з СРВ. Після інкубації з досліджуваними речовинами протягом 24 годин клітини фіксували 50 % розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) (кінцева концентрація 10 %) протягом 1 год. при 4 °С і промивали проточною водою. Фарбували фіксовані у лунках клітини 0,4 % розчином сульфородаміну В протягом 30 хвилин. Після видалення барвника лунки промивали 1 % розчином трихлороцтової кислоти і розчиняли фарбник додаванням 10 мМ розчину Tris-base (планшету залишали протягом 10 хв. на шейкері). Результати дослідіу реєстрували за допомогою мультилуноквого спектрофотометру при довжині хвилі – 540 нм.

10 Тест з нейтральним червоним. Після культивування клітин з досліджуваними сполуками на протязі 24 годин, в кожную лунку вносили середовище RPMI-1640 з глютаміном 2 мМоль/л, яке містило 2 % барвник нейтральний червоний та інкубували протягом 3 годин у зволоженій атмосфері при температурі 37 °С, потім видаляли супернатант та промивали клітини теплим фізіологічним розчином. Для фіксації клітин та елюації барвника з лізосом у кожную лунку додавали розчин для розчинення нейтрального червоного (1 % льодяної оцтової кислоти, 50 % етилового спирту, 49 % дистильованої води). Результати дослідіу реєстрували за допомогою мультилуноквого спектрофотометра при довжині хвилі – 540 нм.

20 Цитотоксичну дію досліджуваних речовин для кожної концентрації оцінювали по виживаності клітин (у % до контрольних клітин, життєздатність яких приймали за 100 %). В якості контролю використовували порожні лунки та лунки, лунки з клітинами, в які не додавали сполуки важких металів та лунки з клітинами без додавання досліджуваних речовин, але з вмістом в них до 2 % розчинника (дистильованої води).

25 Після одержання результатів про кількість живих клітин в лунках при дії на них різних концентрацій сполук важких металів, за методом Прозоровського розраховують ефективну концентрацію досліджуваних речовин, яка викликала 50 % загибелі клітин в лунці (див. Таблиця 1 та Таблиця 2).

30 Порівняння величин EC_{50} після дії однієї і тієї ж досліджуваної речовини на клітини різного органного походження дає можливість визначити, що до дії хлориду ртуті та сульфату кадмію найбільш чутливі були клітини нирки (293) та печінки (HepG2), до сульфату марганцю – фібробласти, клітини нервової системи (IMR-32), клітини нирок (293), до ацетату свинцю – клітини кишечника (Colo-205) та печінки.

35 Після впливу наночастинок металів на клітини в культурі, знайдено, що при дії наночастинок срібла найбільше уразилися клітини кишечника (Colo-205), при дії міді – клітини легенів (A-549), наночастинок молібдену мали високий пошкоджуючий ефект на клітини шкіри (HaCaT).

40 Спосіб виявлення органів-мішеней при дії сполук важких металів в культурі клітин людини різного органного походження, що пропонується нами, є ефективним. Використання запропонованого способу є не тільки економічно вигідним, але дає можливість швидко визначати та прогнозувати величину токсичної дії сполук та наночастинок важких металів на різні органи і системи живого організму.

Таблиця 1

Цитотоксична дія сполук на органоспецифічні культури клітин людини за показником EC_{50} (M+m)

Солі металів	Лінії клітин людини						
	A-549	HaCaT	Colo-205	Фібробласти	HepG2	293	IMR-32
	EC_{50} , мг/л (дм ³)						
Хлорид ртуті	12±1	10±2	34±4	45±3	6±0,8	5±0,7	160±10
Сульфат кадмію	25±3	30±2	30±4	12±3	10±2	10±2	20±3
Сульфат марганцю	300±50	500±50	190±3	30±4	400±40	170±30	160±4
Ацетат свинцю	1000±200	2000±300	380±4	1000±100	500±20	3000±300	1800±200

Таблиця 2

Цитотоксична дія наночастинок важких металів на органоспецифічні культури клітин людини за показником EC_{50} (M+m)

Наночастинки металів	срібло	мідь	молібден
Лінія клітин HaCaT, EC_{50} , мг/л	80±4	30±5	160±5
Лінія клітин A-549, EC_{50} , мг/л	27±5	11±0,8	200±5
Лінія клітин Colo-205, EC_{50} , мг/л	13±1	22±3	більше 200
Лінія клітин U-373, EC_{50} , мг/л	97±4	40±5	більше 200

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб визначення органної токсичності сполук важких металів *in vitro* в моделі культур клітин для різних концентрацій сполук важких металів, який **відрізняється** тим, що як моделі оцінки гострої органної токсичності сполук важких металів *in vitro* використовують культури клітин органів людини, у поживне середовище яких вносять досліджувані концентрації сполук важких металів, за допомогою тестів з метилтіазолілтетразолієм, нейтральним червоним та сульфородаміном В, визначають показники цитотоксичної дії та EC_{50} , порівнюють їх для різних культур, таким чином знаходять органоспецифічну культуру клітин, що була найбільш чутливою до дії досліджуваної речовини.
- 10

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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