



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85700** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00
G01N 33/533 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 07402	(72) Винахідник(и): Салига Юрій Тарасович (UA), Влізло Василь Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.06.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2013	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, вул. В. Стуса, 38, м. Львів-34, 79034 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2013, Бюл.№ 22	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ НЕЙРОТОКСИЧНОСТІ ХЛОРПІРИФОСУ В УМОВАХ КУЛЬТУРИ НЕРВОВИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб вивчення нейротоксичності хлорпірифосу в умовах культури нервових клітин включає можливість прижиттєвого дослідження впливу хлорпірифосу на ріст, розвиток і функціонування нейронів гіпокампа в умовах культури клітин. У культуральне середовище з нейронами вносять хлорпірифос у дозах 5, 15 і 30 μM і через 24, 48 і 72 години здійснюють флуоресцентне мікроскопування і аналіз живих клітин при кожних експериментальних умовах.

UA 85700 U

Корисна модель належить до біохімії, фізіології, токсикології і нейробіології, зокрема до методів прижиттєвого вивчення нейротоксичної дії хімічних сполук на нервові клітини. Спосіб може використовуватися у наукових дослідженнях у біологічній науці, експериментальній медицині та ветеринарії.

Для дослідження токсичного впливу різних чинників на клітини нервової системи часто використовують культивування первинних нейронів *in vitro* [G. Giordano, L.G. Costa. Primary neurons in culture and neuronal cell lines for *in vitro* neurotoxicological studies // *Methods Mol. Biol.* - 2011. - Vol. 758. - P. 13-27]. Такі культури отримують переважно з ембріонів гризунів і застосовують для вивчення основних фізіологічних властивостей нейронів і являють собою корисний інструмент для вивчення потенційної нейротоксичності хімічних речовин. Первинні культури нервових клітин гіпокампа та кори головного мозку щурів і мишей також широко використовуються для вивчення нейронних властивостей, таких як аксональний ріст і розвиток, процеси синаптичної передачі, ексайтотоксичність [Meberg P.J., Miller M.W. Culturing hippocampal and cortical neurons. // *Methods Cell Biol.* - 2003. - Vol. 71. - P. 111-127].

Відомі такі способи токсикологічних досліджень нервових клітин:

- Деклараційний патент України № 54997, А61В 10/00. "Спосіб визначення морфофункціональних можливостей нейронів" / Г.І. Губіна-Вакулік, У.А. Фесенко (Україна). - Опубл. 25.11.2010, бюл. № 22. У цьому патенті висвітлено спосіб визначення морфофункціональних можливостей нейронів, який здійснюють шляхом гістологічного дослідження мікропрепарату головного мозку експериментальних тварин.

- Деклараційний патент України № 25410, С12N5/08, G01N24/00. "Метод ранньої діагностики апоптотичних процесів в культурах клітин" / І.О. Комаревцева, О.М. Клімочкіна, О.А. Орлова, І.В. Шипілова, М.Є. Андросова, Д.В. Бріндак (Україна). - Опубл. 10.08.2007, бюл. № 12. У патенті викладено метод ранньої діагностики апоптотичних процесів в культурах клітин, який включає використання методу Н'-ЯМР-релаксометрії.

- Деклараційний патент України "Спосіб оцінки функціонального стану гіпокампа" / В.О. Туманський, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко, О.М. Кучковський, Ю.В. Єщенко (Україна). - Опубл. 15.12.2003, бюл. № 12. У патенті викладено спосіб оцінки функціонального стану гіпокампа, що полягає у приготуванні заморожених зрізів головного мозку, обробці їх барвником та визначенні інтенсивності нейромедіаторної функції, у якому зрізи одночасно фіксують та забарвлюють ацетоновим розчином 8-(бензолсульфоніламіно)-хіноліну, досліджують їх в світлі люмінесценції і за зміною інтенсивності світіння нейронів гіпокампа визначають стан його нейромедіаторної функції.

Проте, способи викладені у цих патентах, не дозволяють проводити прижиттєвого дослідження нервових клітин, а тільки у зафіксованих препаратах, що суттєво обмежує можливості методів і є основним недоліком аналогів.

Найближчим аналогом-прототипом заявленого способу є методологічні підходи, описані у наступних роботах: M.D. Saulsbury, S.O. Heyliger, K. Wang, at al. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells // *Toxicol.* - 2009. - No. 259. - P. 1-9; C Pellegrino, O. Gubkina, H. Becq, at al. Knocking-down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival // *The J. Physiol.* - 2011. - Vol. 589. - № 10. - P. 2475-2496. Там розкрито процедуру підготовки первинної культури нервових клітин, її інкубування, трансфекції зеленим флуоресцентним білком, візуалізації і дослідження трансфектованих клітин за допомогою люмінесцентної мікроскопії.

Проте, описаний вище спосіб стосується дослідження впливу хлорпірифосу на клітини-попередники олігодендроцитів, а не на клітини гіпокампа.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу і забезпечує можливість прижиттєвого дослідження впливу різних концентрацій хлорпірифосу на ріст, розвиток і функціонування нейронів гіпокампа в умовах культури клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити ефективний та високоінформативний спосіб прижиттєвого дослідження нейронів гіпокампа в умовах культури клітин за дії хлорпірифосу, як токсичного чинника.

Технічний результат досягається шляхом мікроскопування первинної культури клітин гіпокампа з метою дослідження їх росту, розвитку і життєдіяльності при внесенні в інкубаційне середовище різних концентрацій хлорпірифосу. Для візуалізації нервових клітин проводять їх генетичне модифікування зеленим флуоресцентним білком (GFP) методом магнетофекції.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку виявлене технічне рішення, в якому є ряд суттєвих ознак, спільних із заявленим [C. Pellegrino, O. Gubkina, H. Becq, at al. Knocking-down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival // *The J. Physiol.* - 2011. - Vol. 589. - № 10. - P. 2475-2496], а саме: отримання

первинної культури гіпокампіальних клітин, трансфекція нейронів зеленим флуоресцентним білком, мікроскопічне дослідження і аналіз трансфетованих нейронів.

Однак, даних суттєвих ознак недостатньо для одержання технічного результату заявленого рішення. Технічних рішень, які б за сукупністю ознак співпадали із заявленим способом, у

5 доступній патентній і науково-технічній інформації не виявлено.

У джерелах патентної і науково-технічної інформації не знайдено технічних рішень, в яких би були описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату: прижиттєве мікроскопування первинної

10 культури клітин гіпокампа з метою дослідження їх росту, розвитку і життєдіяльності при внесенні в інкубаційне середовище різних концентрацій хлорпірифосу.

Корисна модель може бути використана у науково-дослідницьких біологічних та токсикологічних лабораторіях.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення корисної моделі.

Для реалізації заявленої корисної моделі необхідно:

15 1. Отримати від вагітних самок щурів ембріони 18-добового віку.

2. Провести виділення головного мозку у отриманих ембріонів.

3. Провести виділення з ембріонального мозку гіпокампа.

4. З отриманого гіпокампа провести посів первинної культури нейронів.

5. У віці 7-10 днів *in vitro* провести трансфекцію (магнетофекцію) культивованих *in vitro*

20 нейронів зеленим флуоресцентним білком з використанням набору "Magnetofection Kit" (OZ Biosciences, Франція) та ліпофектаміну 2000, як описано [Buerli T., Pellegrino C, Baer K., et al., Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. // Nature Protocols.,-2007. - Vol. 2. - P. 3090-3101].

6. Через 3 доби після трансфекції внести у культуральне середовище з трансфетованими

25 нейронами дослідні дози хлорпірифосу.

7. Через 1, 2 і 3 доби провести прижиттєву візуалізацію досліджуваних клітин за допомогою інвертованого мікроскопа, обладнаного спеціальною камерою для підтримання необхідних умов культивування культури клітин, і провести аналіз виживання нейронів.

Описаний вище алгоритм дозволяє з високим рівнем інформативності та достовірності

30 проводити дослідження токсичної дії хлорпірифосу на нервові клітини в умовах *in vitro*.

Приклад конкретного виконання.

Ефективність заявленого способу і його переваги в порівнянні з прототипом підтверджено

науковими дослідженнями, результати яких наведені нижче.

У роботі використовували 99,9 % хлорпірифос (CAS № 2921-88-2) (О, О-диетил-О-3,5,6-

35 трихлор-2-піридилфосфоротіоат ($C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$) компанії Sigma Chemical (США). Для приготування маточного розчину хлорпірифосу його розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) у концентрації 100 μM . Для кожного експерименту використовували свіжоприготовлені розчини хлорпірифосу необхідних концентрацій.

Нейрони виділяли з гіпокампа ембріонів щурів лінії Вістар 18-денного віку. При цьому всі

40 маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції "Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей" (Страсбург, 1986 р.). З метою ферментативної дезагрегації клітин застосовували їх обробку 0,25 % трипсином протягом 15 хв. при 37 °С. Після цього нервові клітини висівали на поверхню покривних скелець, покритих поліетиленіміном, дотримуючись щільності 70000 клітин на см. Нейрони

45 культивували в мінімальному поживному середовищі Ігла (MEM).

Для трансфекції нейронів зеленим флуоресцентним білком (GFP) використовували метод магнетофекції - спосіб перенесення генетичної інформації на основі доставки ДНК на металевих наночастинках під дією спрямованого магнітного поля. У віці 7 днів *in vitro* (DIV) змішані

50 культури клітин гіпокампа були трансфетовані з використанням Magnetofection Kit (OZ Biosciences, Франція) та ліпофектаміну 2000, як описано в [Buerli T., Pellegrino C, Baer K., et al., Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. // Nature Protocols.-2007. - Vol. 2. - P. 3090-3101].

Після трансфекції у культуральне середовище з нейронами вносили хлорпірифос у дозах 5, 15 і 30 μM і продовжували інкубувати клітини протягом трьох наступних діб. Через 24, 48 і 72

55 години здійснювали підрахунок живих клітин при кожних експериментальних умовах, а також проводили флуоресцентне мікроскопування вибраних нейронів у вказані проміжки часу. Мікроскопію нервових клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа марки "Nikon TE300", який був обладнаний спеціальною CO_2 -камерою (Princeton Instruments) у якій безперервно контролювався рівень вуглекислого газу і температура. Протягом трьох діб підряд

60 з використанням камери Micro-MAX CCD і програмного забезпечення MetaMorph (Roper

Scientific) отримували і аналізували зображення одних і тих же 20-30 трансфектованих нейронів за кожних окремих умов експерименту, знаходячи їх щоразу за системою координат. Одразу після процесу мікроскопування нейронів чашки з культурами переносили у CO₂-інкубатор. Нейрони з нормальним розвитком дендритів, у яких спостерігався рівномірний розподіл GFP враховувалися як живі, тоді як нейрони з кластеризованим розподілом GFP або ті клітини, де GFP зникав, вважалися мертвими.

На фото видно, що в контролі, тобто за відсутності у середовищі для культивування хлорпірифосу (мікрофото I, II і III), нервова клітина нормально живе і розвивається протягом усього дослідного періоду, зелений флуоресцентний білок розміщений у сомі, аксоні, дендритах нейрону рівномірно. На відміну від неї нейрон, який інкубувався у середовищі з додаванням 15 μM хлорпірифосу (мікрофото IV, V і VI), має зовсім інший вигляд, розміщення GFP у тілі нейрона і його відростках кластеризоване. За таких умов під дією токсиканту відбуваються інтенсивні нейродегенеративні процеси. Через 48 годин інкубації з хлорпірифосом (мікрофото V) спостерігається чітко виражена вакуолізація його аксона та дендритів, що свідчить про наступний лізис клітини і як наслідок її загибель, яка була в даному випадку констатована нами на 72 год. після внесення досліджуваного нейротоксину до середовища (мікрофото VI).

Результати підрахунку кількості живих гіпокампіальних нейронів за умов впливу на них різними дозами хлорпірифосу протягом однієї, двох чи трьох діб показали, що всі використані нами у дослідженні дози хлорпірифосу чинили токсичну дію на культивовані клітини, яка виражалася у зменшенні кількості живих нейронів у середовищі з додаванням хлорпірифосу порівняно до аналогічних умов, але без застосування цього токсиканту. Через 24 години інкубування статистично достовірні зміни у кількості клітин спостерігали за найбільшої експериментальної концентрації хлорпірифосу - 30 μM. Такий вміст цієї токсичної речовини призводив до зниження кількості живих нейронів майже на 20 % у порівнянні до контролю.

Концентрації у 5 і 15 μM хлорпірифосу в середовищі викликали тенденцію до зменшення виживання клітин через 24 години інкубування. Через 48 годин 30 μM доза хлорпірифосу викликала загибель близько 45 % ($p < 0,05$) нейронів, а через 72 години – 85 % ($p < 0,05$) нервових клітин порівняно до контрольних умов інкубування, тобто без внесення токсиканту у середовище. Внесення хлорпірифосу у концентрації 5 μM спричиняло тенденцію до зменшення кількості живих клітин через 24 і 48 годин, а через 72 години зниження числа клітин, що вижили, було статистично вірогідним ($p < 0,05$). Виявлено, що всі застосовані експериментальні концентрації досліджуваної фосфорорганічної сполуки (5, 15 і 30 μM) через 72 години призводили до статистично вірогідного ($p < 0,05$) зменшення кількості нейронів гіпокампа *in vitro* на 25 %, 45 % і 85 % відповідно. За умов, коли хлорпірифос у культуральне середовище не додавали, більшість (до 85 %) нейронів нормально розвивалися протягом 3 діб після початку експерименту.

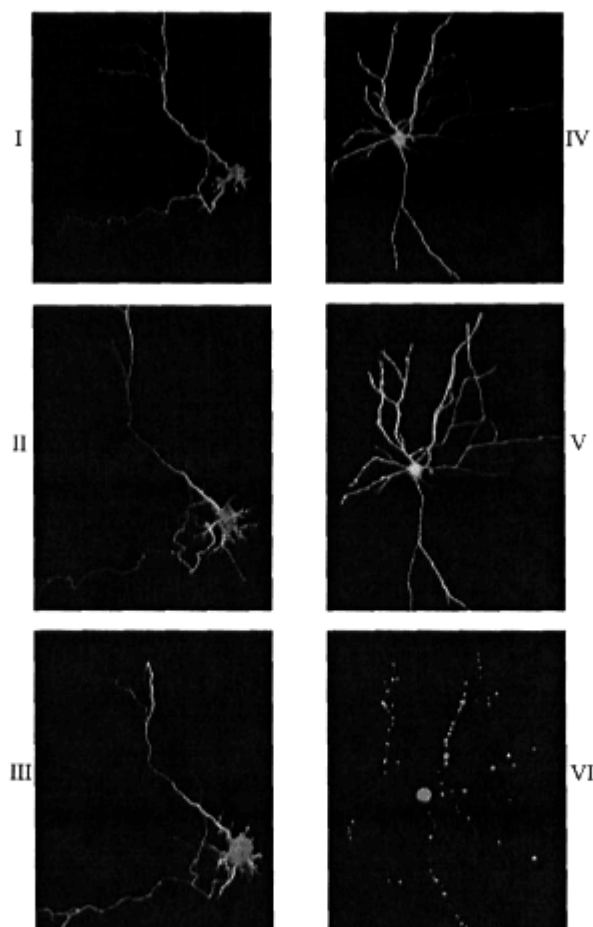
Отже, вдалось встановити, що хлорпірифос викликає дозозалежне ушкодження та, як наслідок, загибель нейронів гіпокампа в умовах *in vitro*. Водночас мають місце значні відмінності у показниках життєздатності нейронів залежно від тривалості дії на них досліджуваної фосфорорганічної сполуки.

Таким чином, нам вдалося підтвердити на первинній культурі гіпокампіальних нейронів нейротоксичний ефект хлорпірифосу, що свідчить про його пошкоджуючу дію на процеси нормального розвитку і функціонування нервової системи ссавців, зокрема щурів.

Виявлено нейротоксичну дію хлорпірифосу і її дозозалежні показники в умовах первинної культури гіпокампіальних клітин. Встановлено, що хлорпірифос при його внесенні до культурального середовища в концентраціях 5; 15 і 30 μM викликає статистично вірогідне ($p < 0,05$) дозозалежне ушкодження та, як наслідок, загибель нейронів гіпокампа в умовах *in vitro*. Водночас виявлено статистично вірогідні ($p < 0,05$) відмінності у показниках життєздатності гіпокампіальних нейронів залежно від тривалості дії на них досліджуваної фосфорорганічної сполуки.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб вивчення нейротоксичності хлорпірифосу в умовах культури нервових клітин, який включає можливість прижиттєвого дослідження впливу хлорпірифосу на ріст, розвиток і функціонування нейронів гіпокампа в умовах культури клітин, який **відрізняється** тим, що у культуральне середовище з нейронами вносять хлорпірифос у дозах 5, 15 і 30 μM і через 24, 48 і 72 години здійснюють флуоресцентне мікроскопування і аналіз живих клітин при кожних експериментальних умовах.



Вживання нейронів трансфєкованих зеленим флуорисцентним бїлком у культурах без додавання хлорпїрифосу (I, II, III) і аналогічних умовах, але з додаванням у культуральне середовище хлорпїрифосу (IV, V, VI). I, II, III і IV, V, VI - зображення

Комп'ютерна верстка Л. Цїхановська

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