



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **89196**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/48** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 13621**

(22) Дата подання заявки: **25.11.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.04.2014**

(46) Публікація відомостей **10.04.2014, Бюл.№ 7**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Чехун Василь Федорович (UA),  
Налескіна Леся Анатоліївна (UA),  
Лук'янова Наталія Юріївна (UA),  
Швець Юлія Вікторівна (UA),  
Тодор Ігор Миколайович (UA),  
Демаш Дмитро Віталійович (UA),  
Лозовська Юлія Валеріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ  
ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ  
ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,  
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)**

## (54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗМІН АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У КЛІТИНАХ В СИСТЕМІ *IN VIVO* ПІД ВПЛИВОМ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛОВМІСНИХ МАТЕРІАЛІВ

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення змін активних форм кисню у клітинах в системі *in vivo* під впливом наночастинок металовмісних матеріалів. Визначення змін генерації активних форм кисню під впливом наночастинок магнітної рідини та наночастинок колоїдного золота проводять безпосередньо у пухлинних клітинах, зафарбованих специфічним барвником, без порушення їх структурної цілісності за допомогою проточної цитофлуориметрії.

**UA 89196 U**



Корисна модель, що заявляється, належить до медико-біологічних наук, а саме онкології, і спрямована на вирішення актуальної задачі - оцінку особливостей цитотоксичної дії металовмісних наноматеріалів на окисно-відновні процеси при створенні систем спрямованого транспорту цитостатиків до пухлинної тканини.

На сьогодні відомо, що металовмісні наноматеріали, а саме наночастинки магнітної рідини та колоїдного золота завдяки своїм фізико-хімічним перевагам перед аналогічними частинками більших розмірів, знаходять застосування в онкології, в тому числі при створенні наносистем таргетної доставки протипухлинних засобів безпосередньо до тканини-мішені [1-3]. Вже існують певні надбання щодо біологічного впливу наночастинок магнітної рідини та колоїдного золота на структурно-метаболичні зміни у пухлинних клітинах в системі *in vivo* [4, 5]. Проте відомостей про наслідки дії цих металовмісних чинників на окисно-відновні процеси у клітинах як вирішальні в метаболізмі, зокрема на генерацію активних форм кисню (АФК), яка пов'язана із проліферацією та станом ДНК [6], і може бути використана для підсилення цитотоксичного ефекту цитостатиків, обмаль.

Існує ряд способів для оцінки кількості АФК у клітинах як показника токсичності наносполук, які базуються на застосуванні електронно-парамагнітного резонансу [8] або спектрофотометрії [9]. Загальним недоліком зазначених аналогів є відсутність специфічності, недостатня точність досліджень та низька відтворюваність результатів.

За найближчий аналог запропонованого нами способу кількісного визначення у пухлинних клітинах генерації АФК як показника порушення окисно-відновних процесів під впливом наночастинок магнітної рідини та колоїдного золота з використанням проточної цитофлуориметрії можна вважати спосіб оцінки кількості АФК у клітинах за допомогою флуоресцентної мікроскопії [10]. Перевагою найближчого аналога є використання флуоресцентного барвника, який специфічно реагує з АФК, що забезпечує високу відтворюваність результатів. Недоліком найближчого аналога є використання методу мікроскопії з візуальною оцінкою генерації АФК, яка дозволяє скласти суб'єктивне, недостатньо точне уявлення про досліджений об'єкт, і тому для більшої достовірності результатів необхідні повторні відтворення досліджень, і внаслідок цього відповідні додаткові витрати на реактиви і матеріали.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу розробити об'єктивний спосіб кількісної реєстрації змін генерації АФК, як показника порушень окисно-відновних процесів у клітинах, під впливом різних концентрацій наночастинок магнітної рідини та колоїдного золота протягом певного часу, що досягається шляхом введення тваринам з перещепленою асцитною карциномою Ерліха (АКЕ) цих чинників у черевну порожнину із подальшою оцінкою ефекту їх дії на клітини методом проточної цитофлуориметрії із застосуванням специфічного барвника.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

Тваринам із АКЕ внутрішньочеревно вводять частинки магнітної рідини у концентрації 3 та 6 мг/кг маси тіла та колоїдного золота у концентрації 30 та 60 мг/кг. У видалених з асцитичної рідини пухлинних клітинах, зафарбованих специфічним барвником, кількісно оцінюється утворення АФК у різні терміни дії цих чинників за допомогою методу проточної цитофлуориметрії.

Схема застосування способу, що заявляється.

Тваринам із перещепленою АКЕ внутрішньочеревно вводять наночастинки магнітної рідини: одній групі у концентрації 3 мг/кг маси тіла, другій - 6 мг/кг маси тіла, аналогічно іншим двом групам тварин вводять дві концентрації колоїдного золота - 30 та 60 мг/кг маси тіла відповідно. Результати дії цих металовмісних матеріалів оцінюють у пухлинних клітинах через 24 та 48 годин за допомогою методу проточної цитофлуориметрії з використанням специфічного барвника CM-H2DCFDA. Останній, проникаючи через мембрану клітини, піддається ряду ферментативно-метаболических перетворень, внаслідок яких із нефлуоресцентної форми переходить у флуоресцентну під впливом АФК, і набута таким чином флуоресценція генерується прямо пропорційно кількості АФК [7]. Вилучені із черевної порожнини у складі асцитної рідини пухлинні клітини двічі відмивають фізіологічним розчином та після підрахунку у камері Горяєва відбирають у дослід.

Визначення АФК клітин АКЕ методом проточної цитофлуориметрії здійснюється за наступною схемою:

1. Вихідна концентрація клітин АКЕ становить  $0,5 \cdot 10^6$  клітин на пробу.

2. Проби готують в трьох варіантах: дослід - фарбування барвником CM-H2DCFDA: контроль 1 (нефарбований); контроль 2 - позитивний контроль (фарбування барвником CM-H2DCFDA з додаванням  $H_2O_2$ ), який характеризується тим, що, завдяки присутності разом з барвником  $H_2O_2$ , флуоресценція АФК спостерігається при будь-якій їх кількості у клітинах.

3. Відмивають клітини розчином PBS (2 мл) та відцентрифугуюють ( $1500 \text{ хв}^{-1}$ , 5 хв), надосадову рідину зливають.

4. Пробу розводять у 250 мкл PBS (+ 200 мкл PBS).

5. У контроль 2 додають 3 мкл  $\text{H}_2\text{O}_2$  та інкубують протягом 15 хв за  $37^\circ\text{C}$ .

6. Всі проби відмивають розчином PBS (2 мл) та відцентрифугуюють ( $1500 \text{ хв}^{-1}$ , 5 хв), надосадову рідину зливають.

7. У контроль 2 та дослід додають CM-H2DCFDA (+ 2,5 мкл), інкубують 20 хв за  $37^\circ\text{C}$ .

8. Всі проби відмивають розчином PBS (2 мл) та відцентрифугуюють ( $1500 \text{ хв}^{-1}$ , 5 хв), надосадову рідину зливають.

9. Розводять розчином PBS (0,5 мл).

Приготовлені проби аналізують за допомогою проточного цитофлуориметра або зберігають у холодильнику в темряві (не більше 1 доби).

Приклади практичного застосування способу:

Приклад 1. Дослідження кількісних змін АФК під впливом наночастинок магнітної рідини проводили на моделі АКЕ. Одній частині білих безпородних мишей вагою 35 г з перещепленою внутрішньочеревно карциномою Ерліха із розрахунку  $2 \cdot 10^6$  клітин на тварину на 7 день після перещеплення внутрішньочеревно вводили наночастинок магнітної рідини в концентрації 3 мг/кг маси тіла тварини. Результати оцінювали через 24 та 48 годин після дії цього чинника. Отримані з асцитної рідини проби пухлинних клітин після фарбування барвником CM-H2DCFDA за вище наведеною схемою оцінювали кількісно за допомогою проточного цитофлуориметра (проточний цитофлуориметр Beckman Coulter, USA, оснащений аргонним лазером із довжиною хвилі 488 нм). Аналіз результатів дослідження показав, що через 24 години після впливу наночастинок магнітної рідини у концентрації 3 мг/кг у клітинах АКЕ значно підвищувалась генерація АФК порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни АФК у клітинах АКЕ після введення наночастинок магнітної рідини різної концентрації

Група тварин	Показники зміни АФК	
	24 години	48 годин
Контроль	$4,2 \pm 0,7$	$3,7 \pm 0,5$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 3 мг/кг	$6,6 \pm 0,7^*$	$5,4 \pm 0,5^*$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 6 мг/кг	$7,7 \pm 0,9^*$	$7,8 \pm 1,0^*$

Примітка: \* - зміни показників достовірні порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).

Через 48 годин дії наночастинок магнітної рідини у цій же концентрації кількість АФК також зростала порівняно з відповідним контролем (табл. 1).

Приклад 2. Дослідження кількісних змін генерації АФК під впливом наночастинок магнітної рідини проводилось на моделі АКЕ. Одній частині білих безпородних мишей вагою 35 г з перещепленою аденокарциномою Ерліха із розрахунку  $2 \cdot 10^6$  клітин на тварину на 7 день після перещеплення пухлинних клітин внутрішньочеревно вводили наночастинок магнітної рідини в концентрації 6 мг/кг маси тіла тварини. Результати дії наночастинок магнітної рідини у цій концентрації оцінювали через 24 та 48 годин після впливу чинника у пухлинних клітинах видалених з черевної порожнини і зафарбованих барвником CM-H2DCFDA.

Аналіз даних, отриманих за допомогою проточної цитофлуориметрії (проточний цитофлуориметр Beckman Coulter, USA, оснащений аргонним лазером із довжиною хвилі 488 нм), показав, що при збільшенні концентрації наночастинок магнітної рідини до 6 мг/кг маси тіла тварини через 24 години їх дії відбувається суттєве підвищення кількості АФК у пухлинних клітинах порівняно з відповідним контролем (табл. 1). Через 48 годин після впливу магнітної рідини на клітини АКЕ у зазначеній концентрації генерація АФК збільшується у порівнянні з контролем, але суттєво не відрізняється від показника, який був зареєстрований через 24 години дії магнітної рідини у концентрації 6 мг/кг маси тіла тварини (табл. 1). Отже, подовження тривалості дії наночастинок магнітної рідини у концентрації 6 мг/кг маси тіла тварини не призводить до суттєвих цитотоксичних змін, про що свідчать показники генерації АФК.

Приклад 3. Визначення кількісних змін генерації АФК під впливом наночастинок колоїдного золота проводили на моделі АКЕ. Одній частині білих безпородних мишей вагою 35 г з перещепленою аденокарциномою Ерліха із розрахунку  $2 \cdot 10^6$  клітин на тварину на 7 день після

перещеплення пухлинних клітин внутрішньочеревно вводили наночастинки колоїдного золота в концентрації 30 мг/кг маси тіла тварини. Оцінку результатів дії наночастинок колоїдного золота у цій концентрації проводили через 24 та 48 годин після впливу чинника у клітинах АКЕ, зафарбованих барвником CM-H2DCFDA, з використанням методу проточної цитофлуориметрії (проточний цитофлуориметр Beckman Coulter, USA, оснащений аргоновим лазером із довжиною хвилі 488 нм).

Згідно з отриманими даними, через 24 години після використання як металовмісного чинника наночастинок колоїдного золота у концентрації 30 мг/кг маси тіла тварини у клітинах АКЕ відбувається найбільш активне утворення АФК, і цей показник достовірно вищий за цифрове значення відповідного контролю (табл. 2). Проте через 48 годин генерація АФК зазнала деякого не суттєвого спаду порівняно з величиною, визначеною після 24 годин дії наночастинок колоїдного золота, тобто залишалась на стабільному рівні. Але порівняно з відповідним контролем була достовірно вищою (табл. 2).

Таблиця 2

Зміни АФК у клітинах АКЕ після введення наночастинок колоїдного золота різної концентрації

Група тварин	Показники зміни АФК	
	24 години	48 годин
Контроль	4,2±0,7	3,7±0,5
Au 30, мг/кг	9,8±1,2*	7,6±1,0*
Au 60, мг/кг	8,4±0,5*	9,2±0,7*

Примітка: \* - зміни показників достовірні порівняно з контролем (p<0,05).

Приклад 4. Дослідження кількості утворених АФК у клітинах АКЕ, що зазнали впливу наночастинок колоїдного золота у концентрації 60 мг/кг маси тіла тварини, проведено з використанням білих безпородних мишей вагою 35 г з перещепленою аденокарциномою Ерліха із розрахунку  $2 \cdot 10^6$  клітин на тварину. На 7 день після перещеплення пухлини тваринам внутрішньочеревно вводили наночастинки колоїдного золота у концентрації 60 мг/кг маси тіла тварини. Оцінку результатів дослідження проводили через 24 та 48 годин після дії цього чинника за допомогою методу проточної цитофлуориметрії (проточний цитофлуориметр Beckman Coulter, USA, оснащений аргоновим лазером із довжиною хвилі 488 нм) у клітинах АКЕ, зафарбованих барвником CM-H2DCFDA.

Аналіз змін генерації АФК під впливом наночастинок колоїдного золота у концентрації 60 мг/кг маси тіла тварини виявив суттєві відмінності цього показника порівняно із значенням контролю і в той же час залишався на стабільному рівні по відношенню до величин, що визначались при дії меншої концентрації чинника (табл. 2). Через 48 годин після впливу на клітини АКЕ наночастинок колоїдного золота у концентрації 60 мг/кг маси тіла тварини рівень генерації АФК залишався статистично стабільним по відношенню до показника 24 годинного впливу чинника, але достовірно перевищував кількість АФК, визначених у контролі.

Отже, зіставлення результатів кількісного дослідження генерації АФК у клітинах АКЕ під впливом різних концентрацій і термінів дії магнітної рідини та колоїдного золота, проведеного з використанням методу проточної цитофлуориметрії, показало, що через 24 години дії цих чинників спостерігається суттєве рівноцінне при застосуванні обох концентрацій підвищення активності АФК порівняно з контрольними значеннями та стабілізація цього процесу через 48 годин. Це є підставою стверджувати, що з погляду на активність АФК як показника цитотоксичної дії магнітної рідини та колоїдного золота на пухлинні клітини, достатньою при використанні у медико-біологічних дослідженнях для підсилення цитотоксичного ефекту цитостатиків є концентрація цих наноматеріалів 3 мг/кг для магнітної рідини та 30 мг/кг для колоїдного золота і тривалість їх дії 24 години.

Таким чином, спосіб кількісного визначення змін АФК у клітинах в системі in vivo під впливом наночастинок металовмісних матеріалів полягає у реєстрації за допомогою методу проточної цитофлуориметрії рівня генерації АФК у зафарбованих специфічним барвником пухлинних клітинах АКЕ як показника цитотоксичної дії наночастинок магнітної рідини та колоїдного золота і визначенні оптимальної концентрації та часу впливу цих чинників. Спосіб, що заявляється, може використовуватись при конструюванні наносистем для спрямованої доставки до пухлинної тканини цитостатиків з метою підсилення їх цитотоксичної дії.

Джерела інформації:

1. Lübke AS, Bergemann Ch, Riess H, et al. Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors // *Cancer Research*. - 1996. - V. 56. - P. 4686-93.
- 5 2. Cuenca AG, Jiang H, Hochwald S, et al. Emerging Implications of Nanotechnology on Cancer Diagnostics and Therapeutics // *Cancer*. - 2006. - V. 107, N 3. - P. 459-46.
3. Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnology for Molecular Imaging and Targeted Therapy // *Circulation*. - 2003. - V. 107. - P. 1092-95.
4. Шпак А.П., Горбик П.П., Чехун В.Ф. и др. Нанокompозиты медико-биологического назначения на основе ультрадисперсного магнетита. Физико-химия нанокompозитов и супрамолекулярных структур: Сб. трудов / Под ред. А.П. Шпака, П.П. Горбика / Киев: Наук. думка. - 2007. - Т. 1. - С. 45-87.
- 10 5. Бурлака А.П., Сидорик Є.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. - К.: Наукова думка, 2006. - 228 с.
- 15 6. Pankhurst QA, Connolly J. Jones SK, et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // *J Phys Appl Phys*. - 2003. - V. 36. P. 167-81.
7. Марченко А.І. Цитологія: Навчальний посібник для ден. та заоч. відділення природничо-географічного факультету. - Ніжин, 2003. - 66 с.
8. Mrakic-Spota S., Gussoni M., Montorsi M., Porcelli S., Vezzoli A. Assessment of a Standardized ROS Production Profile in Humans by Electron Paramagnetic Resonance // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. - 2012. - V. 2012, ID 973 927.
- 20 9. Guichard Y., Schmit J., Darne C., Gaté L., Goutet M., Rousset D., Rastoux O., Wrobel R., Witschger O., Martin A., Fierro V., Binet S. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and micro-sized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells // *Ann Occup Hyg*. - 2012. - V. 56, N 5. - P. 631-44.
- 25 10. Naqvi S., Samim M., Abidin M., Ahmed F.J., Maitra A., Prashant C., Dinda A.K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress // *Int J Nanomedicine*. - 2010. - V. 16, N 5. - P. 983-989.

30

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35

Спосіб кількісного визначення змін активних форм кисню у клітинах в системі *in vivo* під впливом наночастинок металовмісних матеріалів, який **відрізняється** тим, що визначення змін генерації активних форм кисню під впливом наночастинок магнітної рідини та наночастинок колоїдного золота проводять безпосередньо у пухлинних клітинах, зафарбованих специфічним барвником, без порушення їх структурної цілісності за допомогою проточної цитофлуориметрії.

---

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