

Рекомендована д.м.н., професором І.М.Риженко

УДК 615.03:615.9

ЦИТОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЛУТАРГІНУ У ВІДНОШЕННІ КЛІТИН ЛІНІЇ HepG2 ПРИ ТОКСИЧНОМУ ВПЛИВІ ГЕНТАМІЦИНУ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

І.В.Волчик, С.М.Дроговоз, О.В.Доровський, Т.М.Зубченко, О.В.Супрун

Національний фармацевтичний університет
ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я"

Проведено вивчення цитопротекторних властивостей гепатопротектора глутаргіну. Показано, що цей препарат підвищує виживаемість клітин у культурі на фоні токсичного ураження гентаміцином на 19,9-33,6% у порівнянні з інтактною групою на моделі з однократним уведенням антибіотику в культуру і на 5,7-19,8% у порівнянні з інтактною групою на моделі з повторним уведенням токсину в культуру. У порівнянні з контрольною групою виживаемість гепатоцитів у культурі зросла на 53,44-67,14% на моделі з однократним уведенням гентаміцину в культуру і на 43,94-58,04% на моделі з повторним уведенням токсину в культуру. Запропонований авторами метод становить великий практичний інтерес. Він економічний за часом та є гуманним у відношенні тварин.

Останнім часом дослідження, проведені на тваринах з метою прогнозування токсичної дії лікарських засобів, часто зазнають критики. Вона стосується не тільки етичних норм, але і наукової значимості одержуваних результатів [4]. Через фундаментальні розходження в анатомії, фізіології, патології і метаболізмі людини і тварин дані ефективності і токсичної дії лікарських препаратів, отримані на моделях з використанням тварин, часто не знаходять адекватного підтвердження в клініці [8, 9]. Тому цілком обгрунтованими є розробка і впровадження адекватних альтернативних методів дослідження [6, 10, 11], які передбачають заміну тварин на культуру клітин і тканин, у тому числі отриманих від людини. Особливого значення набувають дослідження з використанням тест-систем *in vitro* на основі печінки, органа, де в основному здійснюється метаболізм, утворення і виведення з організму токсичних сполук, у силу чого вона і є їхньою первинною мішенню. Такі методи припускають використання перфузованої печінки, окремих її часток, зрізів, гомогенату і субклітинних фракцій, суспензії і культури гепатоцитів (клітинні лінії гепатоми, гепатоцити,

що перевиваються, первинна моношарова культура, у тому числі іммобілізована на колагеновому гелі, побудова за типом "сендвіча") [5].

Незважаючи на ряд недоліків (низька активність ферментів у гомогенатах печінки, нестабільність ферментів I і II фаз біотрансформації у свіжоізольованих клітинах печінки і первинній культурі гепатоцитів різних видів тварин і людини тощо), тест-системи, розроблені на основі клітин печінки, дозволяють досліджувати гепатотоксичні властивості речовин, порушення специфічних функцій гепатоцитів, опосередковані метаболізмом ефекти на клітини-мішені [7].

З огляду на дані літератури про підвищення активності сироваткових амінотрансфераз при застосуванні гентаміцину [1] ми поставили за мету вивчення токсичної дії гентаміцину на клітини печінки HepG2 *in vitro*, а також гепатопротекторні властивості глутаргіну. Глутаргін — антиоксидант і гепатопротектор, діюча речовина — L-аргініну L-глутамат. У результаті субстратної індукції активує глутамінсинтетазну реакцію, зв'язуючи аміак [3].

Матеріали та методи

У роботі використовували гентаміцину сульфат у вигляді 4% розчину, виробленого ВАТ "Фармацевтична фірма "Здоров'я", м. Харків. У якості гепатопротектора був використаний глутаргін (L-аргініну L-глутамат) — субстанція виробництва ВАТ "Фармацевтична фірма "Здоров'я", м. Харків. Лінія гепатоцитів HepG2 надана ТОВ "ВИРОЛА", Україна.

Клітини печінки розсіювали в планшети по 96 чарунок, кожна з яких містила приблизно $2 \cdot 10^4$ клітин, та інкубували протягом 24 год у поживному середовищі DMEM, Sigma. Після цього інкубаційне середовище видалялося. Для визначення параметрів цитотоксичної дії гентаміцину у відношенні клітин печінки та середньооефективної дози, яка викликає загибель клітин (EC₅₀), вносили 0,2 мл свіжого середовища DMEM, що містить гентаміцин у таких концентраціях: 0,22; 1,10; 2,20; 4,40; 5,30 мкмоль/мл. EC₅₀ розраховували за методом D.J.Litchfield, E.Wilcoxon.

Таблиця 1

Цитотоксичні ефекти гентаміцину у відношенні клітин HepG2 у залежності від його концентрації в культуральному середовищі

Дослідні групи	Поглинання при 550 нм (M±m)	Загибель клітин (%)	Параметри токсичності (мкмоль/мл)
Контроль	0,599±0,009	0	EC ₁₆ 0,33 EC ₅₀ 0,94 (0,75±1,20) EC ₈₄ 2,60
Гентаміцин, 0,22 мкмоль/мл	0,581±0,009 p>0,05	3,00±1,50	
Гентаміцин, 1,10 мкмоль/мл	0,225±0,031 p<0,001	62,44±5,20	
Гентаміцин, 2,20 мкмоль/мл	0,134±0,002 p<0,001	77,63±0,33	
Гентаміцин, 4,40 мкмоль/мл	0,075±0,008 p<0,001	87,48±1,30	
Гентаміцин, 5,30 мкмоль/мл	0,006±0,001 p<0,001	99,00±0,17	

Примітка. Вірогідність розрахована в порівнянні з контролем

Інкубування гепатоцитів з гентаміцином здійснювали в двох режимах: а) антибіотик вносився в кількості EC₅₀ і залишався в інкубаційному середовищі протягом 48 год (експеримент 1); б) антибіотик вносили в кількості EC₅₀, через 24 год інкубаційне середовище видаляли і вносили нову порцію середовища, які містить гентаміцин у тій же концентрації, з наступною інкубацією протягом 24 год (експеримент 2). Зазначені модифікації дозволили відтворити дві моделі токсичного впливу ксенобіотика на печінку — гостру (дослід 1) і хронічну (дослід 2) [12].

По закінченні періоду інкубації клітин з гентаміцином до половини з них для кожного режиму введення антибіотика додавали глутаргін у кількостях, що забезпечують його вміст в інкубаційному середовищі в концентраціях 0,060; 0,600 і 6,000 мг/мл. Використовувані концентрації глутаргіну були підібрані в ході проведених раніше дослідів. Усі пробі продовжували інкубувати протягом 24 год. Клітини, що інкубувалися протягом 96 год без додавання гентаміцину і глутаргіну, склали контрольну групу. Після закінчення зазначеного періоду визначали і розраховували відсоток живих клітин, використовуючи реактив МТТ — 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум. Будучи

акцептором водню, він здатен перетворюватися мітохондріями живих клітин на формазанову сіль, що дає кольорову реакцію, яка реєструється спектрофотометрично за довжини хвилі 550 нм. Статистичну обробку даних проводили, використовуючи критерій Ст'юдента [2].

Результати та їх обговорення

Результати дослідження цитотоксичної дії гентаміцину у відношенні клітин лінії HepG2 у досліді *in vitro* представлені в табл. 1.

Відсоток загибелі клітин після їх інкубування протягом 24 год з гентаміцином прямо пропорційно збільшувався в залежності від концентрації антибіотика (рис.). Якщо при концентрації 0,22 мкмоль/мл він не здійснював пагубної дії на клітини в культурі, то при концентрації 1,10 мкмоль/мл гепатоцити гинули, що склало 62% (p<0,001). Подальше збільшення концентрації гентаміцину до 2,20 мкмоль/мл і 4,40 мкмоль/мл приводило до загибелі вже майже 80 і 90% клітин у культурі відповідно, а внесення в культуральне середовище гентаміцину в концентрації 5,30 мкмоль/мл спричиняло загибель 100% клітин.

Отримані дані дозволили розрахувати параметри токсичності гентаміцину, згідно з якими EC₅₀ склала 0,94 мкмоль/мл.

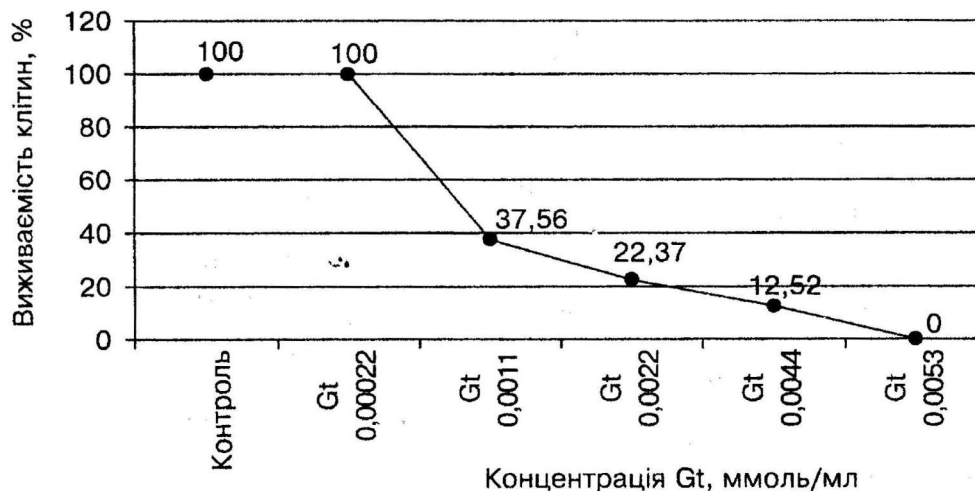


Рис. Загибель клітин печінки в залежності від концентрації гентаміцину в культуральному середовищі.

Примітка: по осі абсцис — концентрація гентаміцину в середовищі (мкмоль/мл); по осі ординат — загибель клітин (%).

Таблиця 2

Цитопротекторні властивості глутаргіну в умовах токсичного впливу гентаміцину в концентрації 1,10 мкмоль/мл (EC_{50}) на клітини печінки в досліджах *in vitro*

Дослідні групи	Поглинання при 550 нм ($M \pm m$)	P_1	P_2	Кількість живих клітин (% від контролю)
Контроль	1,258 \pm 0,105	<0,01		100
Дослід 1 (без зміни середовища)				
Гентаміцин	0,836 \pm 0,040		<0,01	66,46
Гентаміцин + глутаргін, 0,060 мг/мл	1,521 \pm 0,054	<0,001	>0,05	120,9
Гентаміцин + глутаргін, 0,600 мг/мл	1,680 \pm 0,080	<0,001	<0,05	133,6
Гентаміцин + глутаргін, 6,000 мг/мл	1,508 \pm 0,081	<0,001	>0,05	119,9
Дослід 2 (зі зміною середовища)				
Гентаміцин	0,777 \pm 0,0293		<0,001	61,76
Гентаміцин + глутаргін, 0,060 мг/мл	1,330 \pm 0,094	<0,001	>0,05	105,7
Гентаміцин + глутаргін, 0,600 мг/мл	1,494 \pm 0,094	<0,001	>0,05	118,8
Гентаміцин + глутаргін, 6,000 мг/мл	1,507 \pm 0,0327		<0,05	119,8

Примітка. P_1 — вірогідність у порівнянні з клітинами, на які чинив вплив гентаміцин без додавання глутаргіну; P_2 — вірогідність у порівнянні з контролем.

Таким чином, гентаміцин в інтервалі концентрацій (0,75÷1,20) мкмоль/мл може бути використаний для моделювання гострої і хронічної патології в культурі.

При дослідженні гепатопротекторних властивостей глутаргіну гентаміцин вводили в культуральне середовище в концентрації, рівній 1,10 мкмоль/мл, що згідно з даними табл. 1 входить у межі довірчих границь EC_{50} для даної речовини. Результати дослідження впливу глутаргіну на виживаємість клітин HepG2 представлені в табл. 2. Їх аналіз свідчить про те, що внесення глутаргіну в інтервалі концентрацій 0,060–6,000 мг/мл у культуру клітин, які попередньо протягом 48 г інкубувалися у присутності гентаміцину (1,10 мкмоль/мл) без проміжної зміни культурального середовища (дослід 1), дозволило цілком попередити загибель клітин ($p < 0,001$). Більше того, спостерігалася тенденція до збільшення їхньої кількості в порівнянні з контролем, однак ці дані були статистично достовірними ($p < 0,05$) лише у відношенні концентрації глутаргіну 0,600 мг/мл.

Аналіз даних, отриманих у результаті введення глутаргіну в культуру клітин печінки, попередньо інкубованих з гентаміцином (EC_{50}) у модифікації досліді, обумовленої проміжною зміною культурального середовища (дослід 2), свідчить про відсутність загибелі клітин, що підтверджує наявність у глутаргіну цитопротекторних властивостей. У даній серії дослідів також спостерігалася збільшення кількості клітин на 20% у порівнянні з контролем при концентрації глутаргіну в культуральному середовищі рівній 6,000 мг/мл — 119,8%.

Отримані результати свідчать про те, що глутаргін, підвищуючи життєздатність клітин, є ефективним цитопротектором, що збігається з даними *in vivo* відносно його гепатопротекторних властивостей.

Той факт, що введення даного препарату в досить високих концентраціях (6,000 мг/мл) не викликало загибелі клітин, вказує на його низьку токсичність. Підвищення життєздатності клітин, які регенерує печінка під впливом глутаргіну, можна розглядати як позитивний процес, спрямований на відновлення клітин, ушкоджених ксенобіотиком (гентаміцином). Разом з тим, у подальших дослідженнях на це варто звернути увагу з метою виключення потенційної канцерогенності препарату.

ВИСНОВОК

Таким чином, у результаті проведених досліджень доведена можливість використання в досліді *in vitro* гентаміцину в якості модельної цитотоксичної речовини, в тому числі у відношенні клітин печінки. Визначено параметри його цитотоксичної дії, згідно з якими EC_{50} дорівнює 1,10 (0,75÷1,20) мкмоль/мл. Показано, що глутаргін володіє цитопротекторними властивостями у відношенні клітин печінки, що є підтвердженням його гепатопротекторних властивостей. Культура клітин людини як біологічна тест-система через її простоту, можливості контролю, відтворюваності та екстраполяції отриманих даних на людину, економічність і дотримання принципів біоетики є перспективною при проведенні скринінгу нових хімічних речовин і потенційних лікарських засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аминогликозиды. В сб.: *Информация о лекарственных средствах для специалистов здравоохранения. Вып. 3. Антимикробные и противовирусные лекарственные средства.* — М.: Изд-во РЦ "Фармединфо", 1998. — С. 5.
2. Березовский В.А. *Метод ускоренной статистической обработки в медицинских исследованиях. Методы мед. статистики.* — М.: Наука, 1975. — С. 41-46.
3. Меркулова Ю.В., Белостоцкая Л.И., Вертяева О.Н. и др. // *Провизор.* — 1997. — №5. — С. 18-19.
4. Barnard N.D., Kaufman S.R. *Animal research is wasteful and misleading* // *Scientific American.* — 1997. — P. 80-82.
5. Blaauboer B.J., Boobis A.R., Castell J.V. et al. *The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing* // *The report and recommendations of ECVAM workshop 1.* — ATLA, 1994. — Vol. 22. — P. 231-241.
6. Clemenson C., McFarlane-Abdulla E., Andersson M. et al. // *Alternatives to laboratory animals.* — 1996. — Vol. 24 (suppl. 1). — P. 273-311.
7. Ericsson A.C., Walum E. // *ATLA.* — 1988. — Vol. 15. — P. 208-213.
8. McKenzie R., Fried M.W., Sallie R. et al. // *New Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 333. — P. 1099-1105.
9. Roberts P. // *Drug Metabolism and Disposition.* — 1991. — Vol. 19. — P. 841-843.
10. Shrivastava R. // *Alternatives to Laboratory Animals.* — 1997. — Vol. 25. — P. 339-340.
11. Stephens M. *Replacing animal experiments, in Langley (ed). Animal experimentation: the consensus changes.* — New York: Charman and Hall, 1989. — P. 144-168.
12. Walter Pfaller and others. *Novel Advanced In Vitro Methods for Longterm Toxicity Testing.* // *The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 45^{1,2}.* Reprinted with minor amendments from ATLA, 2001. — Vol. 29. — P. 393-426.

УДК 615.03:615.9

ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГЛУТАРГИНА В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ЛИНИИ HepG2 ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВЛИЯНИИ ГЕНТАМИЦИНА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

И.В.Волчик, С.М.Дроговоз, А.В.Доровский, Т.Н.Зубченко, О.В.Супрун

Проведено изучение цитопротекторных свойств гепатопротектора глутаргина. Показано, что этот препарат повышает выживаемость клеток в культуре на фоне токсического поражения гентамицином на 19,9-33,6% по сравнению с интактной группой на модели с однократным введением антибиотика в культуру; и на 5,7-19,8% по сравнению с интактной группой на модели с повторным введением токсина в культуру. По сравнению с контрольной группой выживаемость гепатоцитов в культуре возросла на 53,44-67,14% на модели с однократным внесением гентамицина в культуру и на 43,94-58,04% на модели с повторным внесением антибиотика в культуру. Предложенный авторами метод представляет большой практический интерес. Он экономичен по времени и является гуманным по отношению к животным.

UDC 615.03:615.9

CYTOPROTECTIVE ACTIVITY OF GLUTARGIN TO CELLS OF HepG2 LINE UNDER TOXIC INFLUENCE OF GENTAMYCIN IN VITRO EXPERIMENT

I.V.Volchik, S.M.Drogovoz, O.V.Dorovskiy, T.M.Zubchenko, O.V.Suprun

We have studied the cytoprotective activity of glutargin hepatoprotector. We have demonstrated that the drug has raised cell's viability in the culture on the background of toxic defeat by gentamycin in 19,9-33,6% in comparison with intact group. It was shown against the background of gentamycin single dosing. Cells viability in the culture had grown in 5,7-19,8% in comparison with intact group against the background of antibiotic repeated dosing. Viability rate had grown in 53,44-67,14% (toxin single dosing) and in 43,94-58,04% (toxin repeated dosing) in comparison with control group. The suggested method has big practical interest. It is an economical method and humane as for animals.