

## МОРФОМЕТРИЧНА ОЦІНКА СТАНУ КЛІТИН У КУЛЬТУРІ HerG2 ПІД ВПЛИВОМ ЛІОЛІВУ, ГЛУТАРГІНУ ТА СИЛІБОРУ НА ФОНІ УРАЖЕННЯ ТЕТРАЦИКЛІНОМ

*І.В.Волчик, К.В.Дрогвоз*

Національний фармацевтичний університет

*Ключові слова: культура клітин HerG2; морфометричні показники; тетрациклін; глутаргін; ліолів; силібор*

*Наведені результати морфометричної оцінки впливу гепатопротекторів глутаргіну, силібору та ліоліву на фоні ураження культури клітин гепатоцитів тетрацикліном. Використання методу морфометричної оцінки клітин дало змогу додатково оцінити стан клітин у культурі під впливом токсичних або фармакологічно активних речовин. Встановлено, що на тлі ураження тетрацикліном найбільшу гепатопротекторну дію виявили глутаргін та силібор. Використання культур клітин на етапах доклінічного вивчення фармакологічно активних речовин є доцільним як з точки зору наукової значущості, так і з точок зору гуманного відношення до тварин і економії фінансових витрат та часу. Таким чином, використання культури клітин на основі гепатоцитів людини є доцільним для вивчення фармакологічної активності та токсичності перспективних і традиційних лікарських засобів.*

Сучасна людина все більше стикається з проблемами, які негативно впливають на її стан здоров'я. Така ситуація призводить до необхідності лікування за допомогою багатьох ліків, які не можуть не спричинити виникнення побічних явищ, що, в свою чергу, теж буде потребувати лікування. Але органом, що найбільш страждає від будь-якого лікування, є печінка. Ураження печінки дією ліків складають сьогодні від 10% до 20% усіх побічних реакцій організму і призводять до виникнення важких захворювань [1, 7].

Звісно, що така ситуація потребує розробки нових гепатопротекторних лікарських засобів (ЛЗ) та більш глибокого вивчення вже існуючих. Але розробка будь-якого нового ЛЗ є багатоетапним та досить затратним процесом.

Одним з ефективних альтернативних шляхів є заміна експериментальних тварин на більш дешеві об'єкти. Такі системи вже

використовуються країнами ЄС. Ними є культури клітин тварин та людини [10, 11]. Використання таких експериментальних об'єктів корисно з кількох точок зору:

- ідентичності кожного з об'єктів;
- можливості стандартизації;
- виключення екзогенного впливу;
- зменшення кількості експериментальних тварин у подальших дослідженнях;
- легкості утримання тест-об'єктів;
- вартості та утримання культур клітин набагато дешевше, ніж тварин, а проведення експерименту займає набагато менше часу.

Крім того, слід зауважити, що заміна тварин на інші об'єкти цілком укладається в концепцію директиви ЄС 86/609/ЄЕС, де у статті 7(3) зазначено: "У виборі експерименту перевага віддається тому, виконання якого вимагає мінімальної кількості тварин, причому таких, які володіють низькою нейрофізіологічною чутливістю; якщо ж при експерименті тварина повинна зазнавати стре-

су, то він має бути зведений до мінімуму".

На теперішній час в експериментальній практиці застосовуються різні клітинні лінії людини. Серед них досить поширені довгострокові лінії на основі гепатоцитів людини, створені за допомогою генно-інженерних методів. Ці лінії створені таким чином, щоб наділити їх максимально тими ж властивостями, що й клітини цілісного організму [9].

Для того, щоб оцінити вплив тієї чи іншої речовини на клітини в культурі, існує багато маркерів та методів. Одним з поширених методів є оцінка морфометричних характеристик клітин [5, 6, 8]. Цей метод дозволяє оцінити розмір і форму клітин та їх органодів.

Метою нашого експерименту була оцінка впливу гепатопротекторів глутаргіну, силібору та ліоліву на фоні ураження культури клітин гепатоцитів тетрацикліном. Цей антибіотик є ЛЗ, який виявляє безпосередню ушкоджуючу дію на печінку [4]. Ліолів, глутаргін та силібор є представниками різних класів гепатопротекторів: синтетичних, амінокисло-

**Оцінка морфометричних показників гепатоцитів у культурі НерG2 під впливом гепатопротекторів на фоні ураження тетрацикліном**

Експериментальні групи	Цитоплазма (мкм)		Ядро (мкм)		S <sup>2</sup> <sub>ядро</sub> /S <sup>2</sup> <sub>цитопл.</sub>	P <sub>ядро</sub> /P <sub>цитопл.</sub>
	S <sup>2</sup>	P	S <sup>2</sup>	P		
Інтактна група	594,83±45,07	98,54±3,76	111,5±3,15	38,82±2,41	0,19±0,01	0,40±0,03
T	940,67±51,03*	127,40±9,80*	398,67±48,65*	77,97±4,52*	0,42±0,05*	0,62±0,02*
L	681,00±52,26**	101,86±3,90**	117,44±2,33**	46,74±2,11**	0,18±0,02**	0,46±0,02**
Glu	573,50±20,29**	95,54±1,79**	120,80±3,86**	43,92±1,94**	0,21±0,01**	0,47±0,03**
Sb	599,9±51,78**	97,10±4,60**	120,10±2,80**	44,92±2,98**	0,22±0,02**	0,47±0,04**

Примітки:

- 1) S<sup>2</sup> — площа; P — периметр; T — тетрациклін; L — ліолів; Glu — глутаргін; Sb — силібор;
- 2) \* — вірогідна відмінність від інтактної групи;
- 3) \*\* — вірогідна відмінність від групи з токсином.

тоутримуючих і рослинного походження, відповідно.

### Матеріали та методи

Для створення моделі ураження клітин у культурі нами була використана культура трансформованих гепатоцитів НерG2. Лінія використовується для вивчення токсикологічних і фармакологічних властивостей різних ксенобіотиків [2, 3]. Морфометрична оцінка гепатоцитів у культурі проводилася за допомогою програм "Live 3000" і "Scion Image" (www.scioncorp.com). Для створення ураження клітин тетрациклін використовувався у концентрації 0,062 мкмоль/мл, гепатопротектори — у концентрації ЕС<sub>50</sub>: ліолів — у концентрації 160 мкг/мл, глутаргін — 300 мкг/мл, силібор — 40 мкг/мл. Усі вищенаведені концентрації ЛЗ були визначені у попередніх експериментах.

### Результати та їх обговорення

Після внесення тетрацикліну в культуру НерG2 у токсичній концентрації спостерігалися значні зміни морфометричних характеристик клітин (табл.): площа цитоплазми збільшилася у 1,58 рази, периметр — у 1,29 рази, площа ядра — у 3,58 рази, периметр — у 1,79 рази, ядерно-цитоплазматичні відносини також зросли: по площі — у 2,21 рази, по периметру — у 1,55 рази.

Внесення в культуру трансформованих гепатоцитів гепато-

протекторів ліоліву, глутаргіну і силібору на фоні її ураження токсином призвело до позитивних змін морфометричних параметрів клітин у культурі (табл.).

На фоні внесення ліоліву площа цитоплазми зменшилась у 1,38 рази в порівнянні з групою клітин, де був внесений тетрациклін, периметр цитоплазми — у 1,25 рази, площа ядра — у 3,39 рази, його периметр — у 1,67 рази, співвідношення площі ядра до площі цитоплазми — у 2,33 рази та співвідношення периметрів ядра і цитоплазми — у 1,35 рази. Дія глутаргіну привела до таких позитивних змін морфологічних показників клітин культури: площа цитоплазми зменшилась у 1,58 рази, її периметр — у 1,33 рази, площа ядра — у 3,3 рази, його периметр — у 1,78, співвідношення площин — у 2,0 рази, периметрів — у 1,3 рази. Вплив силібору викликав аналогічні зміни: площа цитоплазми зменшилась у 1,57 рази, її периметр — у 1,3 рази, площа ядра — у 3,3 рази, його периметр — 1,7 рази, співвідношення площин — у 1,9 рази, співвідношення периметрів — у 1,3 рази.

При порівнянні відмінностей між морфометричними показниками інтактної та експериментальних груп з гепатопротекторами між ними не було знайдено вірогідних відмінностей.

Якщо провести порівняння морфометричних показників клітин під впливом гепатопротекторів між

собою, то після внесення глутаргіну та силібору до уражених тетрацикліном клітин цифри показників більше наблизилась до показників групи інтактного контролю (табл.).

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що морфометричні показники клітин культури НерG2 різко зросли під впливом тетрацикліну, але після внесення до ураженої культури гепатопротекторів ці показники значно зменшились (під впливом глутаргіну та силібору більше, ніж під впливом ліоліву) та вірогідно не відрізнялись від інтактної групи.

Слід також зауважити, що постановка самого експерименту зайняла 4 дні, а проведення морфометричних досліджень — ще 1 день. У той же час проведення такого ж експерименту на тваринах зайняло б не менше 1 місяця.

### ВИСНОВКИ

1. Використання культури клітин на основі гепатоцитів людини є доцільним для вивчення фармакологічної активності та токсичності перспективних і традиційних ЛЗ.

2. Шляхом порівняння 3 гепатопротекторів, які належать до різних класів цієї групи: синтетичних (ліолів), амінокислотоутримуючих (глутаргін) і рослинного походження (силібор)? виявлено, що 2 останні ЛЗ виявили більшу протекторну дію на уражені тетрацикліном клітини.

3. Використання методу морфометричної оцінки клітин дає

зможу додатково оцінити стан клітин у культурі під впливом токсичних або фармакологічно активних речовин.

4. Використання культур клітин на етапах доклінічного вивчення фармакологічно активних речовин є доцільним як з точки

зору наукової значущості, так і з точок зору гуманного відношення до тварин і економії фінансових витрат та часу.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Байкова И.Е., Никитин И.Г. // *Болезни органов пищеварения*. — 2009. — Т. 11, №1. [www.rmj.ru](http://www.rmj.ru).
2. Киселева А.Ф., Горюнова Л.Е., Медведева Н.В. и др. // *Биохимия*. — 1999. — №64. — С. 543-552.
3. Киселева А.Ф., Горюнова Л.Е., Медведева Н.В. и др. // *Биомембраны*. — 2000. — №17. — С. 163-172.
4. Коваленко В.М. // *Фармакол. вісник*. — 1998. — №3-4. — С. 19-23.
5. Махонина М.М., Чуян Е.Н., Журавлева Л.В. // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.Вернадского. Сер. "Биология, химия"*. — 2007. — Т. 20 (59), №2. — С. 54-61.
6. Минина В.И. // *Современные проблемы науки и образования*. — 2008. — №6. — С. 10.
7. Скрипник И.Н. // *Здоров'я України*. — 2009. — №4. — С. 36-37.
8. Ткаченко А.В., Губина-Вакулик Г.И. // *Буковинський медичний вісник*. — 2006. — Т. 10, №2. — С. 111-114.
9. Crespi C.L. // *Advances in Drug Res.* — 1995. — Vol. 95, №26. — P. 179-235.
10. Lipnick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N. et al. // *Food and Chemical Toxicol.* — 1995. — Vol. 117, №33. — P. 223-231.
11. Rodrigues A.D. // *Biochemical Pharmacol.* — 1994. — Vol. 4, №48. — P. 2147-2156.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,  
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 706-30-69.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 30.04.2010 р.