

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «**ДЕЯКІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ У**
БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ГАЛУЗЯХ»

Виконав: здобувач вищої освіти групи ПБтм23(1,6l) 01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Руслан КУШКА

Керівник: професорка закладу вищої освіти кафедри
біотехнології, д.б.н., проф. Ольга ФІЛІПЦОВА

Рецензенти: провідний науковий співробітник Інституту
проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, к.мед.н.,
с.н.с., Володимир ПРОКОПЮК

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

Клітинні лінії широко застосовуються в найрізноманітніших дослідженнях у галузі біології, біотехнології, медицини, фармації та косметології як з фундаментальною, так і з прикладною метою. Одним із важливих і поширених аспектів роботи з клітинними лініями є вивчення різних видів активності потенційних лікарських засобів.

У роботі розглядається загальний підхід до використання клітинної лінії та, зокрема, методика підготовки та аналізу природних екстрактів рослин, а також ліпосомних частинок, що можуть бути використані для визначення токсичності, антиоксидантної активності, і цитотоксичності.

Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 45 сторінок, кількість таблиць – 2, рисунків – 10, джерел літератури – 29, додатків – 1.

Ключові слова: клітинні культури, цитотоксичність, токсикологія.

ANNOTATION

Cell lines are widely used in a wide variety of research in biology, biotechnology, medicine, pharmacy and cosmetology, both for fundamental and applied purposes. One of the important and widespread aspects of working with cell lines is the study of various types of activity of potential drugs.

The paper considers a general approach to the use of cell lines and, in particular, the methodology for the preparation and analysis of natural plant extracts and liposomal particles that can be used to determine toxicity, antioxidant activity, and cytotoxicity.

The paper consists of an introduction, three chapters, and a conclusion. The total volume of the work is 45 pages, the number of tables – 2, figures – 10, references – 29, appendices – 1.

Key words: cell cultures, cytotoxicity, toxicology.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ ПОНЯТТЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ IN VITRO.....	7
1. Тестування цитотоксичності in vitro.....	7
Висновки до розділу 1.....	15
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ	16
2. Оцінка цитотоксичності методом in vitro.....	16
2.1. Методи визначення цитотоксичності.....	17
2.2. Вимірювання апоптозу і некрозу.....	18
2.3. Принцип цитофлуориметрії.....	19
2.4. Тести визначення цитотоксичності.....	23
2.5. Дослідження цитотоксичності за допомогою природніх сполук.....	24
2.6. Хімічний склад природніх екстрактів.....	29
Висновки до розділу 2.....	32
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ АНАЛІЗУ РІЗНИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ.....	33
3.1 Методи аналізу рослинних екстрактів.....	33
3.2. Методи аналізу ліпосом.....	34
3.3. Методи аналізу культури клітин шкіри.....	36
Висновки до розділу 3.....	40
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	43
ДОДАТОК.....	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МТТ – тест МТТ ((3-[4,5-диметилтіазол-2-ил]-2,5-дифенілтетразолію бромід))

АТСС – Американська колекція тканин та культур

ЕСАСС – Європейська колекція клітинних культур

DMSO – диметилсульфоксид

LC₅₀ – середня летальна концентрація

IC₅₀ – інгібуюча концентрація

ABTS – 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфофокислота)

ВСТУП

Актуальність теми. Дослідження клітинних ліній обумовлена стрімким розвитком біотехнології та суміжних галузей, де клітинні лінії займають важливе місце у вирішенні багатьох актуальних проблем, пов'язаних із виробництвом лікарських засобів, вакцин, а також у фундаментальних наукових дослідженнях. Клітинні лінії є необхідним інструментом для розробки нових методів лікування, створення клітинних імунних терапій, вивчення біологічних процесів на клітинному рівні та моделювання різних захворювань. Завдяки своїй здатності до нескінченного поділу та можливості підтримувати стабільність генетичних характеристик у процесі тривалого культивування, клітинні лінії стали основою для значної кількості досліджень у таких галузях, як медицина, фармацевтика, біотехнологія та генетика.

Клітинні лінії, що були отримані з різних тканин, органів або навіть тварин, є цінним інструментом для розробки нових терапевтичних засобів, дослідження метаболізму, токсичності та фармакології. Вони використовуються для виробництва моноклональних антитіл, вакцин, а також у вивченні механізмів розвитку різних патологій. Дослідження клітинних ліній дозволяє отримувати детальну інформацію про молекулярні механізми хвороб, їх розвиток і можливі стратегії для корекції порушень.

Предмет дослідження цієї роботи полягає в аналізі використання клітинних ліній у біотехнології та суміжних галузях, а також їх ролі у розробці медичних і фармацевтичних продуктів. Досліджуються методи та техніки культивування клітин, а також способи оцінки їх життєздатності та ефективності при використанні в різних аспектах біотехнологічних виробництв. Увагу приділено застосуванню клітинних ліній для вивчення токсичного впливу природних сполук.

Об'єкт дослідження — це клітинні лінії, що застосовуються в біотехнології для вирішення різноманітних медичних і фармацевтичних проблем, зокрема для виробництва біофармацевтичних продуктів, розробки

методів лікування різних захворювань, а також вивчення біологічних процесів і механізмів їх порушень.

Завдання роботи є вивчення сучасних підходів до використання клітинних ліній у біотехнології та суміжних галузях, оцінці їхніх можливостей у створенні нових терапевтичних засобів та медичних технологій. В рамках цієї роботи розглядаються методи культивування клітинних ліній, а також роль клітинних ліній у фармацевтичних розробках. Одним із важливих аспектів є аналіз ефективності клітинних ліній у процесах токсикологічних і фармакологічних досліджень.

Методи наукових досліджень, що застосовуються в роботі, включають методи описового дослідження - проаналізовані літературні і доступні в інтернеті джерела; графічні методи - складені схеми, таблиці та діаграми.

Практичне значення отриманих результатів. Представлені у роботі підходи щодо використання клітинних ліній для аналізу цитотоксичності можуть бути основою для використання конкретних клітинних ліній та інших конкретних сполук при вивченні біологічних видів активності потенційних лікарських засобів.

Апробація результатів дослідження і публікації.

1. Кушка Р.О. (наук. керівник Філіпцова О.В.) Використання клітинних ліній для дослідження токсичності природних речовин. Youth Pharmacy Science: матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (10-11 грудня 2024 р., м. Харків). – С. 157-158.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи

Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 45 сторінок, кількість таблиць – 2, рисунків – 10, джерел літератури – 29, додатків – 1.

РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ ПОНЯТТЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ IN VITRO

1. Тестування цитотоксичності in vitro

Метод тестування полягає у використанні пробірок, чашок Петрі тощо, тобто «in vitro» - з латиниці – «у склі», імітуючи середовище організму, подібного до живого. Для тестування використовують клітинні лінії з багатьох причин, але найголовніша – відсутність шкоди тваринам або людині, як об'єкт тестування. Цитотоксичністю речовин слід розуміти здатність речовин знищувати клітини [1].

Токсичність

Усі речовини, що потрапляють в організм людини (перорально, ін'єкційно тощо) мають бути протестовані на токсичність – ступінь впливу речовини на організм, так як не існує жодної безпечної речовини у світі. Звідси варто процитувати найвідомішу фразу Парацельса: «Усе є отрутою. Лише доза визначає отруту». Дисципліна, що займається токсичністю речовин – називається токсикологією [2].

Тканини та культури клітин

Культури тканин представлені сукупністю клітин, які між собою не відокремлені, тому вони взаємодіють між собою як в організмі. Це означає що вони широко використовуються при тестуванні лікарських або косметичних засобів.

Культури клітин – це рослинні, тваринні або людські клітини, що були вирощені штучним шляхом в лабораторії, де мають бути створені оптимальні умови для розмноження. Різні спеціалізовані клітини можуть бути вирощені за допомогою різних методів. Первинні клітинні культури та клітинні лінії для тестування цитотоксичності можна отримати в організаціях, наприклад у ATCC (*Американська колекція тканин та культур, англ. - American Tissue and Cultures Collection*) та ECACC (*Європейська колекція клітинних культур, англ. - European Collection of Cell Cultures*). Ці організації надають клітинні лінії не лише людини, але тварин та рослин. Клітини зберігаються в замороженому

вигляді та можуть бути в будь який момент вилучені зі зберігання у лабораторії для подальшої праці з ними. Найбільш відомою клітинною лінією є клітинна лінія клітин HeLa, яка була виділена з клітин онкології шийки матки Генрієти Лакс. Це – епітеліоїдний тип клітин. Окрім того, більш ніж 50 років використовуються у практиці клітинні лінії, відомі як лінія клітин L, яка представлена клітинами, що були отримані зі сполучної тканини миші, та є клітинами фібробластного типу [3][4]

Первинні клітинні культури

Первинні культури – це клітини, отримані безпосередньо з зібраної тканини, коли тканина дробиться на клітинну суспензію. Ця суспензія має декілька типів різних клітин, і для отримання конкретного типу клітин необхідне подальше культивування. Клітини в первинній культурі розмножуються дуже повільно, але вони утворюють так званий моношар клітин. Після цього цей безперервний шар клітин не може ділитися, і необхідно здійснити пересів у інші ємності та нове середовище. Таким чином формується вторинна клітинна культура [4].

Вторинні клітинні культури

Вторинні клітинні культури походять від первинної. Це клітини нормальних диплоїдних клітин, які були хоча б один раз культивовані. На відміну від первинних клітин, вони складаються лише з одного обраного типу клітин. У зв'язку з тим, що з кожним поділом вторинної культури скорочуються теломери (старість клітин), кількість можливих поділів обмежена [4].

Клітинна лінія

Клітинні лінії здатні до необмеженого поділу клітин. Вони виникають з клітин пухлин, або шляхом відбору з ембріональних клітин – цим вони відрізняються від первинних клітин, які походять від подрібнених тканин організму. Клітини пухлин легше культивувати та розмножувати. У таких клітинах не відбувається скорочення теломер завдяки теломеразі. Знову ж таки, клітини, отримані з ембріональних тканин, легше вирощувати і вони

мають довшу тривалість життя. Однак, ембріональні клітини, як правило, більш схильні до фенотипових змін [4].

Типи клітинних культур

За морфологією розрізняють:

- фібробластних клітин, які мають видовжену та розгалужену форму;
- лімфобластних клітин, які мають сферичну форму в суспензії;
- епітеліальні клітини, які мають сплюснену та полігональну форму[6].

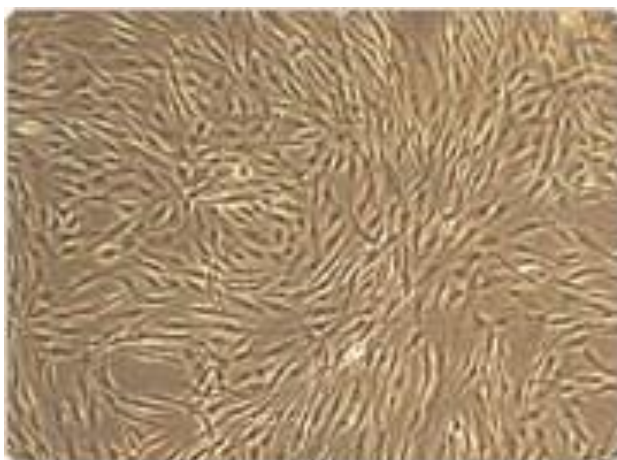


Рис. 1.1. Фібробластні клітини



Рис. 1.2. Лімфобластні клітини

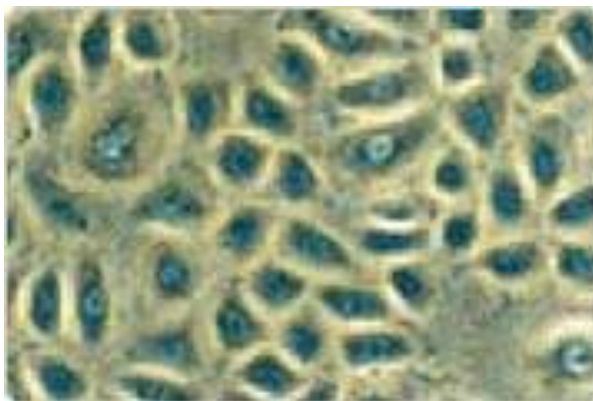


Рис. 1.3. Епітеліальні клітини

Додатково можна класифікувати культури клітин відповідно до способу їх культивування. Суспензійні культури – це клітини переважно кров'яного походження, і їх важливо вирощувати в суспензії, щоб запобігти адгезії, яка у свою чергу може призвести до диференціювання у інший тип клітин. Тому суспензійні клітини вільно диспергуються у середовищі. Адгезивні, тобто ті що зливаються у шар культури, вирощують на відповідній культуральній поверхні – найчастіше використовують пластикові або скляні контейнери. Необхідна фаза адгезії у таких контейнерах досягається за допомогою електростатично зарядженого матеріалу пластикового контейнеру – полістиролу. В деяких випадках, щоб досягти адгезії, поверхню контейнеру покривають еластином або колагеном [5].

Ріст клітин

Ріст клітинної культури проходить в кілька етапів. Спершу, коли клітину висівають на поверхню, вони спочатку адаптуються до середовища, не розмножуючись та готуючись до поділу. Ця початкова фаза називається Lag-фаза.

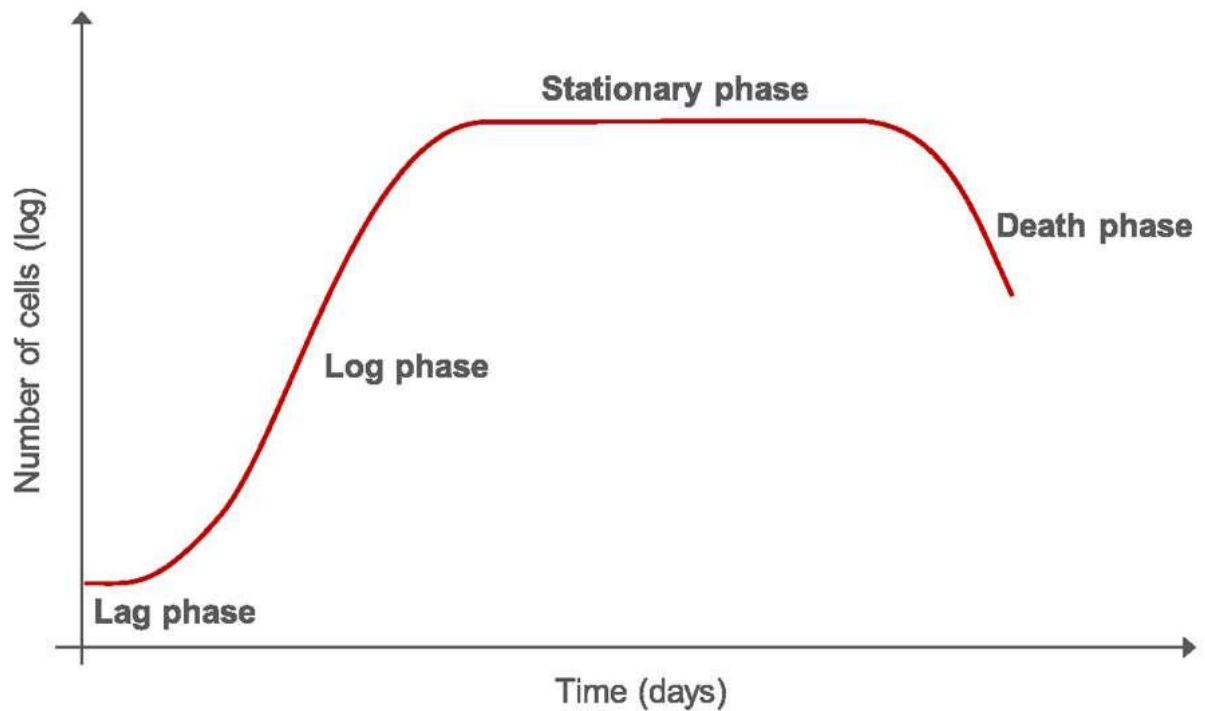


Рис. 1.4. Графік росту клітин

Коли клітини адаптуються до середовища, вони починають розмножуватися в геометричній прогресії. Це називається log-фаза (логарифмічна фаза). Після того, як клітини розмножилися, відбувається поступове виснаження поживних речовин з середовища. Швидкість росту поступово зменшується, і спрацьовують інгібуючі механізми, такі як контактне інгібування, коли клітини перестають ділитися, торкаючись одна одної. Ця фаза називається стаціонарною фазою. Коли поживні речовини в середовищі вичерпуються, клітини поступово гинуть. Ця фаза називається фазою загибелі клітин. Більшість клітинних культур з часом досягають злиття, тобто щільного, безперервного шару клітин, які торкаються одна одної на поверхні культури. Вони розташовується в один шар (моношар), після чого подальший ріст та розмноження припиняється[5].

Культивування клітин та умови

Щоб зберегти клітини якомога довше, необхідно забезпечити їм відповідне середовище з придатними умовами для росту клітин. Необхідно забезпечити відповідні культуральну посудину, культуральне середовище

та/або температуру та умови середовища. Важливо визначити тип клітин, які будуть культивуватися, і відповідно керувати процесом культивування [6].

Поживне середовище

Щоб клітини могли рости, їх потрібно помістити у відповідне живильне середовище, яке замінить позаклітинну рідину - розчин, що містить кілька десятків компонентів. Поживне середовище має забезпечувати клітини необхідними поживними речовинами, забезпечувати правильний рівень рН розчину або осмолярність [7]. Різні компоненти середовища та їхня роль наведені в таблиці 1.1:

Таблиця 1.1

Склад середовища та роль компонентів

Компоненти	Роль
Натрій хлорид (NaCl)	Регулює осмотичний тиск
Неорганічні солі	Баланс електролітів
Бікарбонат натрію (NaHCO ₃)	Буферний розчин
Глюкоза	Джерело енергії
Амінокислоти	Джерело Нітрогену
Вітаміни	Кофактори
Фактори росту та гормони	Стимулятори росту
Антибіотики	Запобігання контамінації сторонніми мікроорганізмами
Хімічні індикатори (феноловий червоний)	Індикація зміни рН середовища
Сироватка	Для підтримки росту клітин
Антиоксиданти	Для запобігання утворення радикалів кисню

pH

Вважається, що правильний рівень pH культурального середовища для належного росту клітин становить близько 7,4. Однак, вибір правильного pH розчину залежить від типу клітин, що культивуються. Наприклад, фібробластоїдні клітини найкраще ростуть при pH від 7,4 до 7,7. Правильний рівень pH підтримується додаванням до середовища кислотно-лужного індикатора - фенолового червоного. При pH 7,4 культуральне середовище має яскраво-червоний колір, який змінюється на жовтий при зниженні pH, тоді як у більш лужному середовищі він стає фіолетовим. Пожовтіння середовища є ознакою того, що його потрібно замінити [4].

CO₂

Клітини культивують у спеціальних інкубаторах. Атмосфера в інкубаторі збагачена вуглекислим газом, кількість якого становить близько 5 %. Підвищена кількість CO₂ сприяє підтримці pH бікарбонатного буферного середовища (NaHCO₃ розчин). Крім того, вища концентрація розчиненого CO₂ краще відповідає співвідношенням у позаклітинній рідині [8].

Кисень

Через відсутність певних транспортних молекул, присутніх у позаклітинній рідині, таких як гемоглобін, кисень стає токсичним для клітин. Незаряджена форма кисню спричиняє утворення вільних радикалів, які руйнують клітинні структури. З цієї причини необхідно додавати антиоксидантні речовини в середовище або сироватку, які вже містять ці речовини [9].

Осмолярність, температура, в'язкість

Вважається, що правильна осмолярність становить від 320 до 340 мОсм/кг. Оптимальною температурою для культивування клітин є температура, близька до температури тіла, тобто 37°C. Рівень в'язкості має важливе значення при використанні механічних мішалок, оскільки якщо він є занадто низьким або високим, це може призвести до пошкодження [10].

Обладнання

Робота з культурами клітин повинна проводитися в дуже стерильному середовищі, щоб уникнути зовнішнього забруднення. Необхідно працювати в спеціальній лабораторії, щоб звести до мінімуму кількість забруднюючих частинок у повітрі. Основним обладнанням лабораторії є ламінарний бокс, який дозволяє стерильно працювати в середовищі з фільтрованим повітрям. Крім того, для культури клітин необхідний інкубатор, де температура точно підходить для культивування клітин, а також відповідна атмосфера з контрольованою подачею вуглекислого газу. Серед іншого, потрібен оптичний мікроскоп, оснащений фазовим контрастом, і звичайне лабораторне обладнання, таке як центрифуга, морозильна камера, водяна баня тощо [11].

Кріоконсервування культивованих клітин

Кріоконсервування сьогодні є однією з частин у клітинній технології. Вже культивовані клітини можна заморозити за потреби і таким чином зберегти їх на довший період часу. Однак, клітини повинні бути заморожені таким чином, щоб вони не були пошкоджені. Щоб запобігти пошкодженню клітин, до культурального середовища необхідно додати відповідний кріопротектор, який захистить культивовані клітини від пошкодження кристалами води. Найпоширенішим кріопротектором є диметилсульфоксид (DMSO) [4][11].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

Дослідження цитотоксичності *in vitro* є невід'ємною складовою сучасної токсикології, що забезпечує можливість оцінки токсичності речовин безпосередньо на клітинному рівні. Застосування клітинних культур дозволяє отримати стандартизовані, легко відтворювані та етичні результати, уникнувши експериментів на тваринах чи людях. Завдяки використанню первинних клітин, вторинних культур та клітинних ліній дослідники мають змогу обирати найбільш відповідну модель для кожного конкретного дослідження.

Успіх культивування клітин залежить від багатьох факторів, серед яких ключову роль відіграють оптимальні фізико-хімічні параметри середовища, такі як температура, рН, рівень CO₂, а також асептичність під час роботи. З використанням технологій кріоконсервування клітин збільшуються можливості для тривалого зберігання біологічного матеріалу, що є важливим для багатофазних і довготривалих досліджень.

Методи культивування клітин і тестування цитотоксичності *in vitro* відкривають широкі перспективи для оцінки токсичності та безпечності нових сполук, сприяючи розвитку фармакології, біотехнології та медицини. Вони не лише дозволяють досліджувати механізми дії токсичних агентів на клітини, але й створюють надійний науковий інструмент для вдосконалення процесу розробки лікарських засобів.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ

2. Оцінка цитотоксичності методом *in vitro*

Клітини під час контакту з токсичною речовиною реагують різним способом. Пошкодження клітин відбуваються тоді, коли клітина переходить в аномальний стан – стан відхилення від нормального функціонування клітини, та настає клітинна смерть. Однак, спонтанна гибель клітин також є невід’ємною частиною функціонування організму та слугує регулятором чисельності клітин. У фізіологічних умовах клітина активує свою програму самознищення (апоптоз) та настає смерть клітини. Цей механізм називається апоптозом. І навпаки, коли клітина під дією екстремальних умов, відбувається її гибель. Ця смерть відбувається тоді, коли пошкодження клітин незворотно пошкоджує структуру клітини або її органели. Такий тип смерті називається некрозом (часткове або повне відмирання частини клітини або повністю) [12].

Токсичність вимірюється як середня летальна концентрація LC_{50} , тобто концентрація токсичної речовини, що здатна вбити не менш як 50% клітинної популяції. Цитотоксичність також оцінюється за значенням IC_{50} - це середня інгібуюча концентрація. Це концентрація, яка викликає 50% пригнічення росту або функції клітин. Тобто, чим токсичніша речовина, тим нижчий показник IC_{50} вона демонструє. Ступінь цитотоксичності оцінюється за допомогою кривої, яка називається кривою «доза-відповідь». На осях кривих відкладають концентрацію токсичної речовини (дозу) (вісь абсцис) і частку клітин, що вижили (вісь ординат). Ця залежність потім представляється гіперболічною кривою. Однак, якщо ми використовуємо логарифмічне представлення концентрації, ми отримаємо сигмоїдну криву. Значення IC_{50} тоді виражається як точка перегину на сигмоїдній кривій [13].

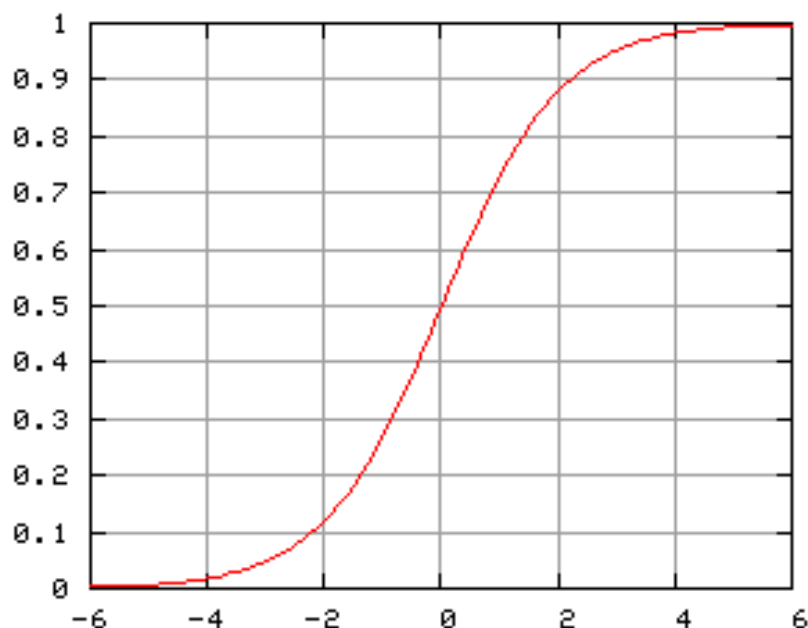


Рис. 2.1. Приклад сигмоїди

2.1 Методи визначення цитотоксичності

Тести на цитотоксичність базуються на різних методах. Одним з найпоширеніших є колориметричний метод. Це оптичний метод, заснований на спостереженні за кольором досліджуваної суспензії. Абсорбція (поглинання світла при різних довжинах хвиль) використовуваних барвників вимірюється за допомогою спектрофотометра. Зразки вносяться мікропіпеткою в певні багатолункові планшети, найчастіше 96-лункові, які потім оцінюються зчитувачем у спектрофотометрі [12].

Цитофлуориметрія

Іншим методом є проточна цитофлуориметрія – метод підрахунку, аналізування та сортування клітин завислих у потоці рідини, яка досягла значного прогресу. У проточній цитометрії лазерний промінь використовується для визначення хімічних і фізичних властивостей досліджуваних речовин. Наприклад, кількість клітин у суспензії можна визначити на основі різних оптичних властивостей клітин [14].

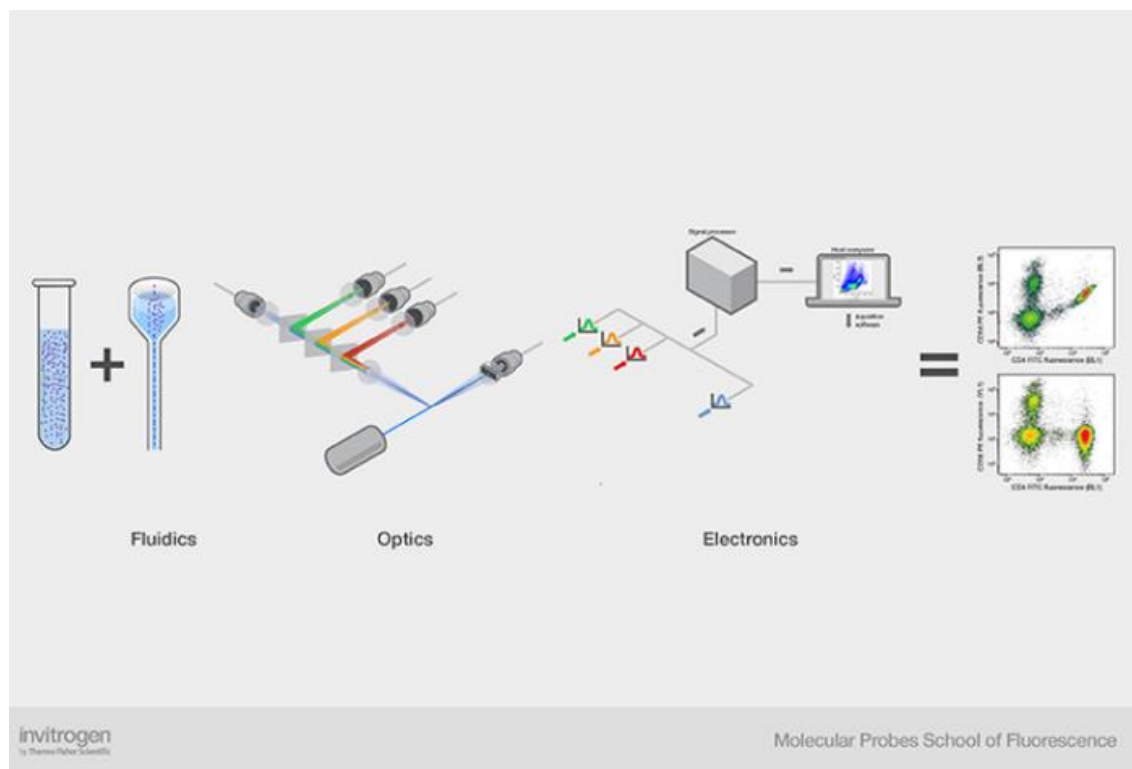


Рис. 2.2. Схема основних компонентів цитрофлуориметрії

Функціональний аналіз

За допомогою цього методу можна визначити біологічну активність всередині клітин, таку як утворення активних форм кисню, зміни мітохондріальної мембрани під час апоптозу, швидкість фагоцитозу у мічених бактерій, вміст кальцію, зміну вмісту металів у відповідь на дію ліків тощо.[14]

Визначення життєздатності клітин

Цей метод також можна використовувати для оцінки життєздатності клітин після додавання патогенних організмів або ліків. Будь-яке порушення цілісності клітинної мембрани можна визначити за допомогою барвників, які можуть проникати через проколоти клітинну мембрану. Флуоресцентні зонди, такі як біс-оксонол, можуть зв'язуватися з білками, присутніми на клітинній мембрані, що дозволяє ідентифікувати різні стадії некрозу.[14]

2.2. Вимірювання апоптозу і некрозу

Апоптоз або запрограмована загибель клітин супроводжується характерними змінами форми клітин, втратою структур, відшаруванням

клітин, конденсацією цитоплазми, скороченням клітин, фагоцитозом клітинних залишків і змінами в ядерній оболонці. Деякі з біохімічних змін включають протеоліз, денатурацію ДНК, зневоднення клітин, зшивання білків і підвищення рівня вільних іонів кальцію. Ці фізичні та біохімічні зміни можна виявити за допомогою проточної цитофлуориметрії. Онкоз - це некротична подія, коли клітина починає набухати, а не зменшуватися. Це призводить до розриву плазматичної мембрани і вивільнення протеолітичних ферментів, які також можуть пошкодити навколишні тканини. Ці зміни плазматичної мембрани та форми клітин можна оцінити за допомогою проточної цитофлуориметрії.

Аналіз клітинного циклу

Кількість ДНК, присутньої в ядрі, змінюється протягом кожної фази клітинного циклу. Ці зміни вмісту ДНК можна оцінити за допомогою флуоресцентних барвників, які зв'язуються з ДНК, або моноклональних антитіл, що дозволяє виявити експресію антигенів. Інші фактори, включаючи вміст клітинних пігментів, таких як хлорофіл, варіації кількості копій ДНК, внутрішньоклітинні антигени, ферментативну активність, окислювальні сплески, глутатіон і адгезію клітин, також можуть бути виміряні за допомогою цього методу.[14]

2.3. Принцип цитофлуориметрії

Проточна цитофлуориметрія

Під час проточної цитофлуориметрії рідина в оболонці гідродинамічно фокусує суспензію клітин через невелику насадку таким чином, що лазерне світло проходить тільки через одну клітину за один раз. Перед лазерним променем розміщується детектор, який може вловлювати світло, розсіяне клітинами в прямому напрямку, а з боків також розміщується кілька детекторів для вимірювання кількості та інтенсивності світла, розсіяного в кожному напрямку. Пряме розсіювання - це світло, заломлене клітиною, яка рухається в тому ж напрямку, в якому вона рухалася спочатку. Частка світла, що

розсіюється в прямому напрямку, корелює з розміром клітини, де більші за розміром частинки виробляють більше світла, що розсіюється в прямому напрямку. Бічне розсіювання - це заломлене світло, яке ортогональне до напрямку проходження світла. Бічне розсіювання світла надає інформацію про гранулярність, де високогранульовані клітини виробляють більше бічного розсіювання світла в порівнянні з клітинами з низькою гранулярністю. Наприклад, при виконанні проточної цитометрії зразків крові великі і гранульовані гранулоцити показують високе пряме і бічне розсіювання; моноцити, які є великими, але не гранульованими, показують високе пряме розсіювання, але нижче бічне розсіювання. Таким чином, на основі пропорції світла, що розсіюється вперед і в сторони, можна розділити різні типи популяцій.[14]

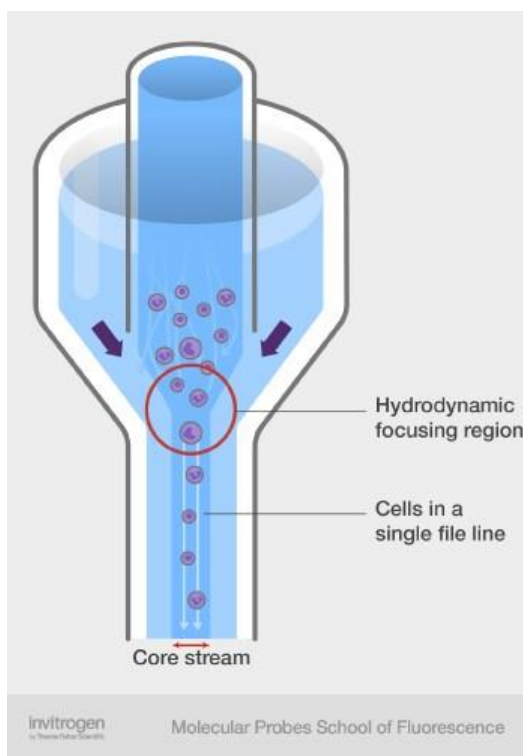


Рис. 2.3. Схематичне зображення проточного каналу

Розділення на основі флуоресцентного випромінювання

Крім прямого і бічного розсіювання, різні типи клітин можна також розділяти на основі світла, випромінюваного флуоресцентними молекулами. Ця флуоресценція може бути зумовлена природною флуоресценцією

матеріалів всередині клітини або флуоресцентно-міченими антитілами. Наприклад, флуорохром використовується для забарвлення досліджуваного білка, щоб падаюче лазерне світло відповідної довжини хвилі дозволило виявити клітини, що містять цей білок. Коли клітина проходить через лазерний промінь, створюється імпульс випромінювання фотонів. Цей імпульс реєструється фотоелектронним помножувачем і перетворюється в імпульс напруги, який може бути інтерпретований проточним цитофлуориметром. Чим вища інтенсивність флуоресценції, тим вищий імпульс напруги.

Інтерпретація даних

Кожна клітина, яка проходить крізь лазерне світло, реєструється як окрема подія. Крім того, різним типам виявленого світла: прямому розсіюванню, бічному розсіюванню і певним довжинам хвиль флуоресцентного випромінювання, присвоюється окремий канал. Дані для кожної з цих подій будуються незалежно і можуть бути представлені двома методами: гістограмами і точковими графіками. Гістограми порівнюють один параметр, де на одній осі відкладається інтенсивність, а на окремій осі - кількість подій. Точкові діаграми можуть порівнювати кілька параметрів одночасно, де кожна подія відображається у вигляді однієї точки, а значення інтенсивності двох або трьох каналів представлені на різних осях. У цьому випадку події, які мають схожу інтенсивність, групуються разом на точковій діаграмі. Хоча точкові діаграми дозволяють порівнювати декілька параметрів, гістограми легше читати і розуміти. У багатьох випадках точкові графіки і гістограми не є взаємовиключними, і в багатьох експериментах з проточної цитофлуориметрії для представлення та оцінки багатопараметричних даних будують обидва типи графіків.

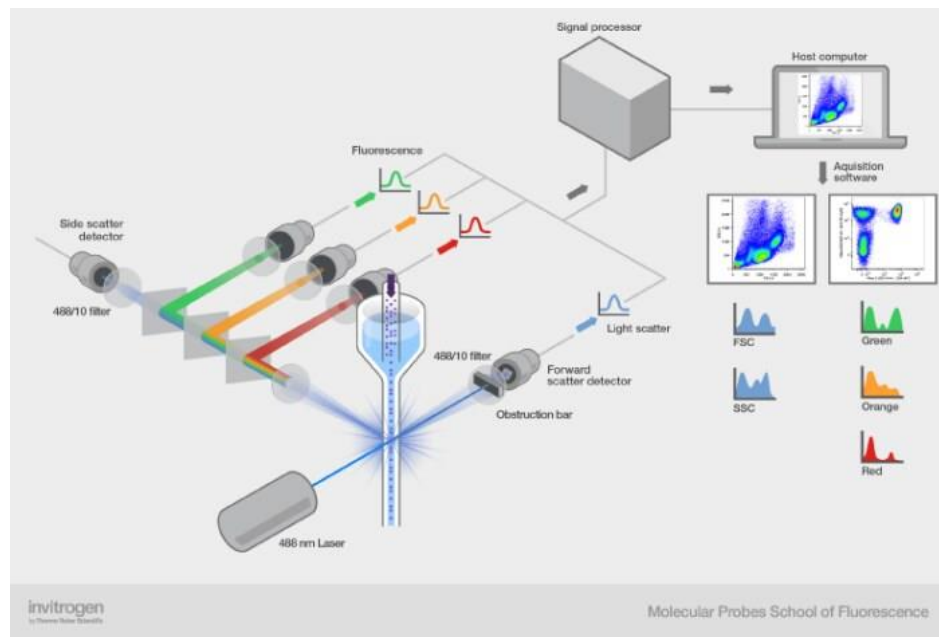


Рис. 2.4. Загальний вигляд цитофлуориметричного методу

Підрахунок клітин

Базовою процедурою для вирощування клітин є визначення кількості клітин. Зазвичай достатньо визначити кількість клітин шляхом підрахунку кількості клітин у полі зору мікроскопа при заданому збільшенні.



Рис. 2.5. Гемоцитометр (або камера Бюркера)

Більш трудомістким і кропітким методом є підрахунок клітин у цитометричній камері, це більш точний метод. Найчастіше використовується камера Бюркера, яка являє собою спеціально модифіковане предметне скло,

що містить дві сітки певних розмірів. Сітки розділені на дев'ять квадратних полів розміром 1 мм. Клітинна суспензія наноситься на цю решітку і накривається покривним склом, яке фіксується двома затискачами. Між сіткою і предметним склом створюється простір певного об'єму. Підрахувавши кількість клітин на полях сітки, можна визначити кількість клітин в 1 мл досліджуваної клітинної суспензії. Клітини підраховують під мікроскопом при певному збільшенні.

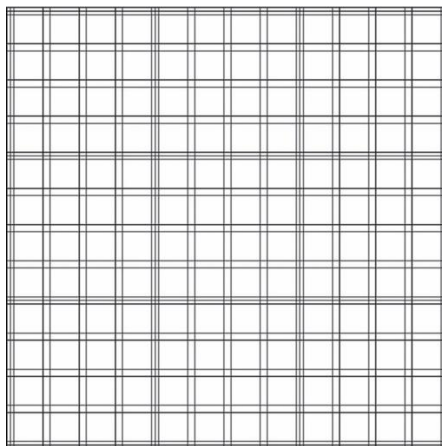


Рис. 2.6. Сітка у камері Бюркера

2.4. Тести визначення цитотоксичності

Тест з трипановим синім

Тест з трипановим синім - це дуже дешевий і швидкий спосіб дізнатися, чи є клітини живими чи мертвими. Він використовує той факт, що трипановий синій не проникає в живі клітини, а лише в клітини з пошкодженою плазматичною мембраною. Цей азобарвник утримується на мертвих або пошкоджених клітинах, які він забарвлює в темно-синій колір. Однак він ніколи не проникає в неушкоджені клітини. Це дозволяє легко відрізнити клітини один від одного. Пошкоджені або непошкоджені клітини потім підраховують під мікроскопом, наприклад, у лічильній камері Бюркера [15].

Тест з нейтральним червоним

Тест з нейтральним червоним є дуже поширеним, недорогим і простим колориметричним методом. Тест полягає в тому, що нейтральний червоний накопичується в лізосомах живих клітин і забарвлює клітину. Мертві клітини

не можуть поглинати цей барвник, тобто клітини не забарвлюються. Чим більша інтенсивність забарвлення, тим вища життєздатність клітин. Цей тест оцінюється за допомогою спектрофотометрії [16].

MTT тест (або мікротитраційний тест)

MTT або 3-[4,5-диметил-2-тіазоліл]-2,5-дифеніл-2Н-тетразолій бромід (або MTT-барвник) - це жовтий солюбілізований розчин солі тетразолію. Це перший колориметричний метод, в якому MTT відновлюється в живих клітинах мітохондріальними дегідрогеназами до фіолетово-синього осаду формагану. Однак цей осад необхідно розчинити перед початком вимірювання. Кількість формагану оцінюється спектрофотометрично і дає нам уявлення про життєздатність клітин. Значення поглинання розчину відповідає кількості живих клітин, тому чим темніший колір, тим вищий відсоток живих клітин. Однак цей аналіз має кілька недоліків, таких як відсутність зниження MTT, а також було показано, що на цей аналіз впливає ряд параметрів, таких як рН середовища. Однак, з іншого боку, аналіз є дуже невибагливим [17].

BrdU тест (Бромодезоксиуридиновий тест)

Завдяки цьому тесту ми можемо оцінити ріст клітин, реплікацію ДНК. Під час S-фази клітинного циклу BrdU, хімічна назва якого 5-бром-2-дезоксиуридин, вбудовується в ДНК клітини. Вбудовування можливе завдяки тому, що BrdU є аналогом попередника ДНК - тиміну, похідного уридину. Виявлення реплікації ДНК стає можливим завдяки реакції специфічних антитіл з BrdU. Цей тест оцінюється в S-фазі за допомогою флуоресцентної мікроскопії [18].

2.5. Дослідження цитотоксичності за допомогою природніх сполук

Лаванда лікарська

Лаванда (лат. - *Lavandula angustifolia*) - це багаторозгалужений напіввічнозелений чагарник, що належить до родини Глухолисті. Ростає в західному Середземномор'ї аж до Греції. Заготовляють квітку або ціле квітуче суцвіття. Серед основних діючих речовин лаванди - ефірні олії, особливо

ліналіацетат, борнеол, гераніол, цинеол, а також дубильні речовини. Інші речовини - це антоціани, смоли та гіркі речовини. Лаванда є природним антимікробним засобом. Її застосовують при лікуванні ревматизму, подагри, змінюючи діяльність кишечника або допомагаючи знизити кров'яний тиск. Серед іншого, ефірні олії лаванди використовуються в ароматерапії для заспокійливого ефекту, а також для допомоги при стресах, головних болях і для кращого сну. Ефірні олії мають найбільше застосування, завдяки їхньому аромату, у парфумерії та косметиці [19][20].

Бузина

Бузина (лат. - *Sambucus nigra*) - це чагарник або навіть дерево, що належить до родини жимолостевих. Вона зустрічається майже по всій Європі. Збирають її переважно заради квітів або плодів, а також листя, кору та коріння. Основними діючими речовинами квітів є глікозиди - рутин, самбунігрин, слиз, холін, дубильні речовини, ефірні олії, а діючими речовинами плодів - антоціани, органічні кислоти, гіркі речовини, ефірні олії, вітаміни А і В. Листя і кора отруйні, містять глікозид самбунігрин і алкалоїд самбуцин.

Квітки бузини в основному використовуються для лікування судин, застуди, сприяють потовиділенню і мають сечогінну дію. Бузина має протимікробну дію, а відвари з квіток допомагають при лікуванні вугрової висипки. Плоди мають протизапальну дію і застосовуються при захворюваннях трійчастого нерва, суглобів і хребта, а також допомагають при мігрені. Листя бузини у вигляді обгортань використовують при лікуванні ревматизму. Бузину використовують не лише в медицині чи косметиці, а й у харчовій промисловості. З ягід бузини роблять мармелад, вина, сиропи, мед та оцет. Однак плоди необхідно готувати, оскільки свіжі плоди викликають діарею [19].

Подорожник лікарський

Подорожник (лат. - *Plantago lanceolata*), - це багаторічна рослина, що належить до родини подорожникових. Подорожник дуже поширений і був інтродукований у багатьох частинах світу. Листя збирають через його

лікувальні властивості. Основними діючими речовинами листя є глікозиди, фенілетаноїди, дубильні кислоти, слизи, кремнієва кислота, калій і кальцій. У вигляді сиропів подорожник в основному використовується для лікування дихальних шляхів. Він знімає подразнення при кашлі та розріджує мокротиння. Настоя подорожника використовують для лікування запалення очей. Жування насіння знижує рівень цукру в крові і може використовуватися як проносний засіб. Подорожник також має протизапальну дію і допомагає загоювати рани, гоїти опіки, запалення і виразки. Завдяки антимікробній дії (глікозид аукубін) його також використовують у косметичі [19].

Ехінацея пурпурова

Ехінацея пурпурова (лат. - *Echinacea purpurea*), - це багаторічна трав'яниста рослина, що належить до родини зірчаних. Ехінацея походить з Північної Америки.

У медицині найбільше використовують корінь, а також листя або квітки. Він містить такі активні речовини, як ефіри жирних кислот, полісахариди, ефірні олії, сесквітерпенові спирти, дубильні речовини та інші. В основному застосовується для зміцнення функції імунної системи, як профілактика та підвищення імунітету. Завдяки своїм чудовим дезінфікуючим, антибактеріальним властивостям деревій також використовується в дерматології [19].

Чебрець звичайний

Чебрець (лат. - *Thymus vulgaris*), дуже близький до коров'яку звичайного і належить до родини осокових. Чебрець - дуже ароматна трава і зустрічається як низький напівчагарник.

Росте переважно на півдні Франції, в Іспанії та на півдні Італії, але поширився і в інших частинах Європи. Збирають переважно його квітуче суцвіття. Основними діючими речовинами чебрецю є його ефірні олії, що містять тимол, карвакрол, цинеол, пінен, ліналоол і борнеол. Також присутні дубильні речовини, флавоноїди, флавонові глікозиди, метильовані флавони і різні мінерали. Чебрець має чудові дезінфікуючі властивості, тому його

використовують при лікуванні ротової порожнини, а також загальної травної системи, де він зменшує здуття живота або біль у животі. У домашній медицині його використовують для лікування кашлю або сечового міхура. Зовнішньо застосовується при шкірних захворюваннях, для кровопостачання шкіри і загоєння запалених ран. Використовується не тільки в медицині, але і як спеція для ароматизації їжі завдяки своєму сильному аромату [19][20].

Шавлія

Шавлія (лат. - *Salvia officinalis*), - це багаторічний, сильно ароматний чагарник, що належить до сімейства глухозапашних.

Походить з Південної Європи та Малої Азії. У Європі переважно культивується в центральних країнах. Збирають переважно листя шавлії. Основними діючими речовинами є ефірні олії, які містять туйон, сальвіол, цинеол, камфору, борнеол. Інші речовини - дубильні речовини, органічні кислоти (кавова кислота), тритерпеноїди, лактон, вітаміни групи В та інші. Шавлія має дуже широкий спектр застосування в косметології, медицині та для ароматизації їжі. У медицині його використовують для зменшення потовиділення, допомоги при гінекологічних проблемах, запаленнях або менструаціях, що починаються. Його антибіотичні властивості використовуються при лікуванні тонзиліту, сечовивідних шляхів, а також при проблемах з травленням. Як зовнішнє застосування його використовують для покращення загоєння ран, при лікуванні вугрової висипки або для полоскання горла при ангіні [19][20].

Розмарин лікарський

Розмарин (лат. - *Rosmarinus officinalis*), - вічнозелений, дуже ароматний напівчагарник, що належить до родини глухозапашних. Рoste в Середземномор'ї. Збирають переважно листя. Діючими речовинами розмарину є ефірні олії - борнеол, камфора, лімон, вербенон, а також флавоноїди, дитерпенові гіркі речовини, дубильні речовини та інші. Розмарин в основному використовується для поліпшення роботи травної системи, збільшуючи вироблення травних соків і жовчі. Він також допомагає поліпшити кровообіг,

при м'язових болях, зменшує відчуття холоду в кінцівках, регулює кров'яний тиск. Розмарин має сильну антиоксидантну дію. Його також використовують у парфумерії у вигляді ароматичних олій та ароматерапії. У харчовій промисловості використовується як спеція для ароматизації їжі. Як лікарський засіб не можна перевищувати рекомендовану дозу, оскільки це може викликати судоми. Він також заборонений під час вагітності через його вплив на матку [19][20].

Імбир

Імбир (лат. - *Zingiber officinale*), - це багаторічна трав'яниста рослина, що належить до родини імбирних. Спочатку імбир був екзотичною культурною рослиною, яка походить з Індії. У наш час він більше не зустрічається в дикій природі і культивується в тропічних районах. Найпоширенішою частиною імбиру є його кореневища. Ці кореневища містять ефірні олії - сесквітерпени, зінгіберін, які надають імбиру ароматного запаху, а також бісаболеон, фарнезол, борнеол. Він також містить активну речовину гінгерол, яка зумовлює характерну гіркоту. Підвищуючи температуру, ми також можемо отримати зінгерон - сильно ароматичну речовину. Завдяки цьому типовому для імбиру смаку та аромату, його найбільше використовують у харчовій та парфумерній промисловості. У харчовій промисловості його використовують як спецію. Допомагає при розладах травлення, нудоті. Також знижує рівень холестерину. Завдяки своїм антиоксидантним властивостям допомагає як профілактика застуди. Також знаходить велике застосування в косметології, де допомагає кровообігу шкіри та має дезінфікуючу дію [20].

Гвоздика

Гвоздика (лат. - *Syzigium aromaticum*), - вічнозелене дерево, що належить до родини миртових. Гвоздика походить з Індонезії. Зараз її культивують на острові Пемба, що входить до складу Танзанії. Збирають і сушать переважно бутони гвоздики. Основними діючими речовинами гвоздики є високоароматичні ефірні олії, які містять евгенол і каріофілен. Інші речовини - фенолкарбонові кислоти, дубильні речовини, флавоноїди та інші. Найбільше

гвоздика використовується в харчовій промисловості у вигляді спецій. Також її використовують у стоматології, де вона допомагає полегшити біль і чутливість зубних нервів, ясен, лікує афти та усуває неприємний запах з рота. Гвоздика також сприяє травленню і зменшує здуття живота. Її також використовують у парфумерії, а запашний екстракт - у косметології [20].

Кориця

Корицю отримують з коричних дерев, таких як китайська кориця (лат. - *Cinnamomum casia*). Коричневе дерево - це тропічне дерево, яке належить до родини лаврових. Коричневе дерево вирощують у тропічних районах, таких як Цейлон, Китай та Ява. Збирають кору дерева, і чим старше дерево, тим більше активних речовин воно містить. Активні речовини - це переважно ефірні олії, які містять евгенол, фелландрин і альдегід коричної кислоти.

Також містяться дубильні речовини, слизи, смоли та інші. Кориця в основному використовується як ароматична спеція в їжу, але вона також має корисний вплив на організм людини. Вона має чудові дезінфікуючі властивості, антиоксидантну дію, допомагає поліпшити роботу травної системи і добре допомагає при застуді. Вона знижує рівень холестерину і цукру в крові. Кориця також може зігріти тіло взимку, оскільки вона може прискорити кровотік у венах. Також було доведено, що кориця позитивно впливає на зупинку поширення раку або лейкемії. Її використовують у косметології, а також як чудовий афродизіак [20].

2.6. Хімічний склад природних екстрактів

Антиоксиданти

Антиоксиданти - це речовини, які допомагають поглинати вільні радикали. Вільні радикали - це високоактивні молекули з неспареними електронами, які можуть пошкоджувати клітинні мембрани, білки, ліпіди або ДНК. Ці вільні радикали утворюються під час нормальних метаболічних процесів або під впливом навколишнього середовища. Зі збільшенням віку вироблення вільних радикалів переважає над захисними механізмами. Це

призводить до пошкодження клітинних культур і подальшого прискореного старіння шкіри. Тому ці речовини є одними з найбільш використовуваних у косметичних продуктах [21].

Поліфеноли

Поліфеноли - це речовини, що містять бензольне ядро з гідроксильними групами у своїй структурі. Найбільше поліфенолів міститься в зеленому та чорному чаї. Поліфеноли дуже позитивно впливають на здоров'я людини, протидіючи різним хронічним захворюванням, лікуючи рак, діабет, серцево-судинні проблеми [22].

Флавоноїди

Флавоноїди - це група поліфенолів, які відомі як пігменти, що забарвлюють, наприклад, дерева. Найбільшими джерелами флавоноїдів є фрукти та овочі, вони також містяться в чаї та вині. Вони мають дуже високу антиоксидантну дію, коли притягують вільні радикали і таким чином захищають клітини від токсичного впливу шкідливих речовин. Ці ефекти в основному використовуються в медицині - при лікуванні різних інфекцій або в косметології при виробництві косметичних засобів [22][23].

Інкапсуляція

Інкапсуляція[6] - це процес утримання активної речовини в матеріалі-носії. Таким чином, основними причинами інкапсуляції є захист ядра від зовнішнього середовища та контрольоване вивільнення активної речовини [24]. Основною причиною інкапсуляції для косметичного використання є перенесення активної речовини через шкірний бар'єр для досягнення цільового шару шкіри. Основним шкірним бар'єром є роговий шар, який є частиною шкіри. Цей шар є дуже непроникним за своєю природою, і проникнення через нього є однією з основних проблем трансдермальної доставки активної речовини. Одним з методів інкапсуляції для подолання шкірного бар'єру є формування частинок, таких як ліпосоми [25].

Ліпосоми

Ліпосоми - це штучно створені частинки - везикули, які формуються переважно з холестерину та природних фосфоліпідів (яєчний жовток). Їх розмір коливається від 25 до 5000 нм. Вони в основному утворюються як носії, в які можуть бути інкапсульовані активні речовини. Мембрани ліпосом складаються з фосфоліпідного бішару, який оточує внутрішню водну частину. Фосфоліпіди мають амфіфільну природу, складаються з гідрофільної головки і гідрофобного «хвоста», що складається з довгого вуглеводневого ланцюга. У водному середовищі, коли молекули фосфоліпідів збільшуються в розмірах, вони об'єднуються в бішари і утворюють ліпосоми. Мембрана з фосфоліпідів дуже схожа на шкіру людини і тому може легше інтегрувати і вивільняти необхідні активні речовини. Наприклад, ліпосоми утворюються за допомогою ультразвуку [26][27].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2

У Розділі 2 було розглянуто основні методи та підходи для оцінки цитотоксичності за допомогою методів *in vitro*. Цитотоксичність – важливий індикатор впливу токсичних речовин на клітини і відіграє ключову роль у дослідженнях як у фармакології, так і в біомедицині. Визначення показників LC_{50} та IC_{50} дозволяє оцінити ступінь токсичності речовини та її здатність пригнічувати клітинний ріст.

Методи, які наведені в розділі (проточна цитофлуориметрія та функціональні тести), надають можливість оцінити стан клітин при взаємодії з токсичними речовинами. Зокрема, цитофлуориметрія - дозволяє одночасно аналізувати чисельність клітин, їх фізичні та хімічні характеристики, є надзвичайно корисною для детального дослідження цитотоксичних ефектів. Виявлення змін у клітинному циклі, активних формах кисню, стані мітохондріальної мембрани та інших параметрах дозволяє зрозуміти механізми, що лежать в основі клітинної смерті – апоптозу чи некрозу.

Крім того, методи підрахунку клітин, зокрема з використанням гемоцитометрії, дозволяють точно визначати кількість клітин у зразках, що є важливим для подальших аналізів. Підрахунок клітин є невід'ємною частиною всіх біологічних експериментів і є базовим етапом при дослідженні цитотоксичності.

Використання різноманітних методів *in vitro* дозволяє отримати важливу інформацію про взаємодію токсичних речовин з клітинами та їх потенційну здатність викликати патологічні зміни в організмі, та є основою для подальших досліджень та розвитку безпечних фармацевтичних засобів, а також для створення більш точних тестів на визначення токсичності нових сполук.

РОЗДІЛ 3.

МЕТОДИ АНАЛІЗУ РІЗНИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ

3.1. Методи аналізу рослинних екстрактів

Підготовка природніх екстрактів

Для приготування екстрактів рослин для визначення в лабораторних умовах токсичності цих речовин використовується 0.1 грам рослинної сировини. Наважку заливають водою об'ємом 10 мл при температурі 100°C та залишають для екстрагування на 15 хвилин.

Спектрофотометричне визначення концентрації поліфенолів

У пробірки піпеткою вносять 1 мл дистильованої води, 1 мл десятикратно розведеного реактиву Фоліна-Чіокальтеу і 50 мкл зразка. Розчини перемішують і через 5 хвилин додають насичений карбонат натрію. Розчини знову перемішують, та через 15 хвилин вимірюють поглинання світла при довжині хвилі 750 нм. Калібрувальна серія складається з розведеної галової кислоти в концентраціях 0,1-0,7 мг/мл (всього 7 різних концентрацій). Пуста кювета містить дистильовану воду замість зразка.[28]

Спектрофотометричне визначення концентрації флавоноїдів

У пробірки вносять по 1,5 мл дистильованої води, 0,2 мл 5% розчину нітриту натрію і 0,5 мл зразка - розведеного катехіну. Розчини перемішують протягом 5 хвилин, потім додають 10% розчин хлориду алюмінію, знову перемішують і дають відстоятись протягом 5 хвилин. Після цього в пробірки додають 5% розчин гідроксиду натрію і 1 мл води. Розчини востаннє перемішують і через 15 хвилин вимірюють поглинання спектром світла при 510 нм. Для встановлення калібрувальної серії готують 6 розчинів 0,5-0,3 мг/мл з вихідного розчину катехіну з концентрацією 1 мг/мл. Пуста кювета містила воду замість зразка.

Спектрофотометричне визначення активності антиоксидантних речовин за допомогою ABTS

ABTS – скорочена назва реактиву 2,2'-Азіно-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфо кислота). Першим етапом є приготування катіону реактиву шляхом розчинення ABTS у воді до концентрації 7 мМ. Катіон-радикал готують додаванням пероксодисульфату калію до кінцевої концентрації 3,45 мМ. Приготований розчин залишають в темряві на 12 годин. Перед використанням ABTS-катіон-радикалу розбавляють етанолом до поглинання $0,700 \pm 0,02$, а вимірювання проводять при 734 нм проти етанолу. Перед початком вимірювання визначають значення A_0 (поглинання світла) з 1 мл ABTS і 10 мкл дистильованої води, з якого потім віднімали подальші вимірювання поглинання. Фактичне вимірювання проводили в кінчній кюветі, куди додавали 1 мл ABTS з 10 мкл зразка і спостерігали за зменшенням поглинання. Через 10 хвилин фіксували отримане значення поглинання. Для побудови калібрувальної серії розчин Trolox (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхром-2-карбонова кислота) розводили до діапазону концентрацій 50-400 мкг/мл і розчиняли в 60% етанолі. Калібрувальним розчином був етанол.[29] [30]

3.2. Методи аналізу ліпосом

Підготовка ліпосомних частинок

Рослинні екстракти в концентрації 10 мг/мл що були підготовлені згідно пункту 4.1. 10 мг холестерину, 90 мг лецитину зважували в набір склянок і додавали 10 мл екстракту. Розчин перемішували при 85% інтенсивності протягом 1 хвилини за допомогою стрижневого ультразвуку.

Визначення ефективності інкапсуляції

Визначення ефективності інкапсуляції визначало, скільки активної речовини було інкапсульовано в ліпосоми. Ефективність інкапсуляції визначали шляхом визначення концентрації вільних поліфенолів. Різниця між загальною концентрацією поліфенолів у розчині (до інкапсуляції) та концентрацією після інкапсуляції (неінкапсульовані компоненти) була

використана для визначення ефективності інкапсуляції та виражена у відсотках.

Визначення довгострокової стабільності частинок

Для визначення довготривалої стабільності частинки ліпосом консервували у водному середовищі у співвідношенні 1:3 та у карбомерному середовищі у тому ж співвідношенні та зберігали у холодильнику. Стабільність частинок розраховували на основі вивільнення поліфенолів у навколишнє середовище шляхом віднімання значення, виміряного відразу після інкапсуляції, від значення, виміряного через тиждень, 2 тижні та 2 місяці після приготування частинок.

Визначення концентрації ліпосом за допомогою тесту Стюарта

Для визначення концентрації порожніх частинок ліпосом використовують метод Стюарта. Цей метод базується на здатності фосфоліпідів утворювати комплекс з феротіоціанатом амонію. Для приготування феротіоціанату амонію, наважку 27.03 г гексагідрату хлориду заліза змішують з наважкою 30.4 г тіоціанату амонію і доводять дистильованою водою до 1 л. Далі готують 10 мл розчину фосфоліпідів хлороформом з концентрацією 0,1 мг/мл. Калібрувальні серії готують згідно з наведеною нижче таблицею.

Кожну пробірку перемішують і центрифугують протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Дно видаляють пастерівською піпеткою і вимірюють поглинання при 485 нм спектрофотометрично. У випадку ліпосом для вимірювання концентрації фосфоліпідів піпеткою додають 0,5 мл підготовленого розчину ліпосом, 0.5 мл хлороформу та 1 мл феротіоціанату.

Оптимізація методу фільтрації ліпосом

Метод фільтрації ліпосом також оптимізовано для розділення ліпосом за розміром. Фільтрацію проводять шляхом розділення частинок у колонці з гелем. Гель-колонку готують з використанням смоли на основі декстрину. 4 см шару гелю діаметром 1 см. Після приготування колонки завжди видаляють воду за допомогою центрифуги. Після видалення води з колонки додають 1 мл

частинок ліпосом і зразки центрифугують при 600, 800 або 900 об/хв протягом 2 хвилин відповідно.

Таблиця 3.1.

Склад калібрувальних серій

Пробірка (номер)	Еппендорф	Дистильована вода (мл)	Хлороформ (мл)	Ферртіоціонат амонію (мл)
0		0	1	1
1		0,05	0,95	1
2		0,1	0,9	1
3		0,2	0,8	1
4		0,3	0,7	1
5		0,4	0,6	1
6		0,5	0,5	1

Визначення розміру та стабільності частинок за допомогою ДЛС та дзета-потенціалу

Підготовлені частинки аналізують на колоїдному аналізаторі методом динамічного розсіювання світла. Підготовлені частинки ліпосом з усіма травами досліджуються як необроблені, так і оброблені через фільтр 220 нм для стерильності, а також оброблені через Sephadex (Сефадекс) для досягнення відповідного розміру частинок. Зразки вимірюють в кюветах і поміщають в прилад, де вимірюють розподіл частинок за розміром. Під час другого вимірювання до кювети додають електродну насадку для вимірювання дзета-потенціалу. Стабільність частинок виводиться з дзета-потенціалу.

3.3. Методи аналізу культури клітин шкіри

Для аналізу МТТ відбирають клітини шкіри - кератиноцити. Ці клітини зберігають замороженими у спеціальних пробірках. Клітини з середовищем піпеткою переносять у флакони для культивування, які поміщають в термостат при температурі 37°C з 5% концентрацією CO₂. Вся робота з клітинами

проводиться в стерильних умовах, в рукавичках у стерильному боксі. Поживне середовище у флаконах змінюють за необхідності 2-3 рази на тиждень. Кератиноцити культивували в комерційному середовищі (KGM-Gold™ Keratinocytes Growth Medium). Готове середовище просто виймають з холодильника і дають йому врівноважитися до лабораторної температури перед використанням. Клітини у флаконі з культуральним середовищем виймають з боксу з CO₂ в рукавичках. Стан клітин по всьому об'єму пляшки перевіряють під мікроскопом, щоб переконатися у відсутності забруднення і в тому, що пляшка повністю проросла. Якщо у флаконі не спостерігається достатньої кількості клітин, середовище просто замінюють; якщо все дно флакону вкрите клітинами, клітини пасували. При заміні середовища середовище виливають з флакона в стерильну коробку і замінювали 5 мл нового середовища. Під час пасажування середовище знову стерильно виливають з пробірки, а клітини два-три рази ретельно промивають підготовленим стерильним фосфатним буфером (приблизно по п'ять мілілітрів кожного разу). Після промивання додають 0,5 ферменту аккутази і поміщали пробірку в термостат (37°C) приблизно на п'ять-десять хвилин. Потім за допомогою мікроскопа перевіряли, чи відшарувалися клітини від дна пробірки. Після того, як всі клітини відшарувалися, у флакон стерильно додають 5 мл фосфатного буфера, гомогенізують в ньому клітини і переносять в стерильну центрифужну пробірку. Потім клітини центрифугують протягом 5 хвилин, після чого зливають буфер (клітини осідали в осад на дні). Середовище додають в центрифужну пробірку, суспендували в ньому клітини і переносять в новий флакон або ділили на кілька флаконів (в цьому випадку об'єм поповнювали чистим середовищем до 5 мл на флакон). Нарешті, під мікроскопом перевіряють, що клітини дійсно знаходяться у флаконі, і флакони повертають в термостат для культивування.

Підготовка клітин до цитотоксичного тесту

Пробірки виймають з термостата і готують в стерильному боксі. Середовище у стерильних умовах виливають з пробірки, а клітини два-три

рази ретельно промивають підготовленим стерильним фосфатним буфером (приблизно 5 мл. кожного разу). Після промивання додавали 0,5 мл. ферменту аккутази і поміщали пробірку в термостат (37°C) приблизно на п'ять-десять хвилин. Потім за допомогою мікроскопа перевіряють, чи відшарувалися клітини від дна пробірки. Після того, як всі клітини відшарувалися, у флакон стерильно додавали приблизно 5 мл фосфатного буфера, клітини в ньому гомогенізували і переносили в стерильну центрифужну пробірку. Потім клітини центрифугували протягом 5 хвилин, після чого зливали буфер (клітини осідали в осад на дні). У центрифужну пробірку додавали невелику кількість середовища, суспендували в ньому клітини і піддавали аналізу життєздатності з подальшим підрахунком клітин.

Підрахунок клітин і тест на життєздатність за допомогою трипанового синього

З підготовлених клітин піпеткою відбирають 10 мкл розчину і наносять на сітку камери Бюркера разом з 10 мкл трипанового синього. Потім під мікроскопом спостерігають, чи поглинають клітини цей барвник і чи залишаються вони живими. Далі клітини підраховують в кожному квадраті сітки і обчислюють середнє значення, з якого потім визначали концентрацію клітин в 1 мл. Для заповнення 60 лунок мікротитрованого планшета для аналізу потрібно $1.3 \cdot 10^6$ клітин. Потім необхідно розрахувати, чи буде отримана кількість клітин достатньою для проведення аналізу, чи необхідно розвести клітини новим середовищем до концентрації $2 \cdot 10^4$ клітин/100 мл.

Тест МТТ

Для визначення цитотоксичності природних екстрактів та ліпосомних частинок обрано тест МТТ. Для проведення МТТ-тесту потрібен 96-лунковий планшет. Цей планшет складається з восьми рядів і дванадцяти стовпчиків. Планшет розкладений для тестування всіх натуральних екстрактів з принаймні чотирма різними концентраціями, а також зразків ліпосомних частинок. Проаналізованими зразками мають бути всі 10 натуральних екстрактів у 4 концентраціях: 1 г/мл, 0,5 г/мл, 0,1 г/мл і 0,05 г/мл. Крім того протестовані

ліпосоми з гвоздиною, бузиною, корицею, шавлією, розмарином та ехінацеєю. Для порівняння також мають бути протестовані порожні ліпосоми, а клітини без зразків були залишені як холості. Спочатку клітини вносять піпеткою - по 100 мкл в кожен лунку, після чого в крайні лунки планшета вносили фосфатний буферний розчин, щоб запобігти можливому висиханню. Потім планшет МТТ інкубують в термостаті протягом 24 годин. Наприкінці 24 годин до клітин у лунках додають досліджувані речовини в різних концентраціях, по 20 мкл кожного разу. Планшет знову інкубують протягом 24 годин. Потім до клітин додавали 20 мкл підготовленого МТТ (2,5 мг МТТ на 1 мл фосфатного буферного розчину) і, через три години, 100 мкл підготовленого додецилсульфат натрію (1 г додецилсульфат натрію на 10 мл фосфатного буферного розчину). Підготовлений таким чином планшет залишали на 2 дні в темряві при лабораторній температурі. Поглинання при 562 нм. вимірювали за допомогою ІФА-ридера.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

У розділі 3 описана методика підготовки та аналізу природних екстрактів рослин і ліпосомних частинок для дослідження їх токсичності та активності антиоксидантів, а також визначення цитотоксичності для можливого використання у парфумерно-косметичних та медичних цілях. Методика охоплює різні етапи, від приготування рослинних екстрактів до оцінки ефективності інкапсуляції активних речовин і стабільності ліпосом. Окрім цього, тест МТТ-тест служить для оцінки впливу цих матеріалів на життєздатність клітин шкіри.

Для визначення токсичності та активності рослинних екстрактів використовуються стандартні методи екстракції та спектрофотометрії, які дозволяють точно оцінити концентрацію поліфенолів, флавоноїдів та антиоксидантну активність. Оскільки природні екстракти часто містять різні активні сполуки, то їх дослідження вимагає точних методів для аналізу складу активних речовин – поліфенолів, флавоноїдів та антиоксидантів. Вимірювання поглинання при різних довжинах хвиль дає можливість детально оцінити ці речовини за їх спектральними характеристиками.

Ліпосоми є перспективною системою доставки активних сполук. Важливим етапом є визначення ефективності інкапсуляції, що дозволяє оцінити, яку частину активної речовини вдається включити в ліпосоми. Оцінка стабільності ліпосомних частинок у різних середовищах, що дозволяє передбачити їх довгострокову ефективність є важливим завданням.

Оцінка токсичності природних екстрактів і ліпосом за допомогою тесту МТТ дозволяє визначити їх вплив на клітини шкіри (кератиноцити), що є важливим етапом у процесі розробки косметичних або медичних продуктів. Тест на життєздатність клітин є необхідним для оцінки безпеки потенційних продуктів, що містять рослинні екстракти або ліпосоми. Програмоване дослідження різних концентрацій екстрактів і ліпосом дає можливість оцінити їх ефективність та токсичність в різних дозах, що є важливим для визначення оптимальних параметрів для застосування.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Оцінка токсичного впливу природних речовин на клітинні лінії є важливою складовою сучасної біотехнології та фармацевтичної науки. Використання клітинних ліній у токсикологічних дослідженнях дозволяє ефективно вивчати вплив різних біологічно активних сполук на клітини, що є важливим кроком на шляху до розробки нових лікарських засобів і природних терапевтичних методів. Природні сполуки, такі як фітохімічні речовини, екстракти рослин і біологічно активні молекули, мають великий потенціал як для лікування, так і для виклику небажаних токсичних ефектів. Тому їхній токсичний вплив на клітинні культури є критично важливим для визначення їхньої безпеки та ефективності.

Різні методи оцінки токсичності, зокрема використання клітинних ліній, дозволяють виявити механізми токсичного впливу природних речовин на клітинному рівні. Виявлення змін у життєздатності клітин, активації каскадів апоптозу, вивчення молекулярних маркерів пошкодження ДНК і генетичних змін є основою для розуміння того, як ті чи інші природні речовини можуть впливати на організм. Методи, як МТТ-тест, аналіз вираження генів та оцінка метаболічної активності клітин, дають можливість досліджувати рівень токсичності різних природних сполук у порівнянні з традиційними хімічними токсикантами.

Клітинні лінії стали незамінним інструментом для проведення таких досліджень, оскільки вони дозволяють моделювати вплив природних токсинів у лабораторних умовах, зокрема на клітини різних типів (епітеліальні, фібробластні, нейрональні). Крім того, ці методи допомагають визначити пороги токсичності та рекомендувати безпечні дозування речовин для подальшого використання в медичних та біотехнологічних застосуваннях.

Аналіз впливу природних речовин на клітинні лінії має також значення для фармацевтичної індустрії, де токсичність є однією з головних причин відмови від розробки лікарських засобів. За допомогою таких досліджень можна виявити токсичні властивості потенційних лікарських сполук ще на

етапі доклінічних досліджень, що значно знижує ризики на подальших етапах клінічних випробувань і забезпечує безпеку пацієнтів.

Особливе значення має використання клітинних моделей для дослідження токсичності природних сполук з огляду на їхнє широке застосування в традиційній медицині та фармацевтиці. Оцінка безпечності природних речовин є важливим етапом у процесі їх впровадження в медичну практику. Тому розвиток нових методів дослідження токсичності на клітинних лініях має значний потенціал для майбутніх досліджень у галузі біотехнології, фармацевтики та екології.

Таким чином, оцінка токсичного впливу природних речовин на клітинні лінії є важливим напрямком наукових досліджень, що сприяє розвитку безпечних і ефективних терапевтичних методів. Розширення застосування клітинних технологій у токсикології дозволяє здійснювати точні та швидкі дослідження токсичності, зменшуючи час і витрати на пошук потенційно небезпечних для організму сполук. Це сприяє розвитку більш безпечних і ефективних продуктів для медицини та біотехнології, що в свою чергу відкриває нові горизонти для їх використання в лікуванні різних захворювань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. ScienceCell Research Laboratories. CA, 2016. URL: <https://sciencellonline.com/en/?srsId=AfmBOooXUH1k8dKnxmWNoZImnErw13a4Tceb-CLpaK5y4FBgOaY7iAcn> (Date of access: 30.10.2024).
2. Základy toxikologie: Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc. Toxikology.cz. České Budějovice: Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, 2005. URL: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=10> (Date of access: 30.10.2024).
3. Buněčné a tkáňové kultury. Biologie a genetika pro bakaláře. 2014. URL: <https://cit.vfu.cz/opvk2014/> (Date of access: 30.10.2024).
4. Vejražka M. Buněčné kultury. *Molekulární medicína a biotechnologie : soubor přednášek*. 1. vyd. Praha : Galén, 2008. P. 81–100.
5. Thermo Fisher Scientific Inc. USA. 2016-03-10. URL: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introductionto-cell-culture.html> (Date of access: 30.10.2024).
6. Ryan J. A. Introduction to animal cell culture. USA : Corning Incorporated, 2008. URL: http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture (Date of access: 30.10.2024).
7. Palsson B., Bhatia S. Tissue engineering. N.J. : Pearson Prentice Hall, 2004. 407 p.
8. Kultivační podmínky. Biologie v kostce. 2016-04-18. URL: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/243-kultivacni-podminky.html> (Date of access: 30.10.2024).
9. Martin Y., Vermette P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*. 2005. Vol. 26(35). P. 7481–7503.
10. Činátl J., Novák M. Tkáňové a buněčné kultury: příprava a pěstování. Praha : Státní zdravotnické nakladatelství, 1968. 254 p.

11. Unchern S. Basic techniques in animal cell culture. Bangkok, 1999. 30 p.
12. Celis J. E. Cell biology: a laboratory handbook. Academic Press, 2005. 2328 p. DOI: 9780121647308.
13. An ELISA–based method for the quantification of incorporated BrdU as a measure of cell proliferation in vivo / B. Behl et al. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006. Vol. 158(1). P. 37–49. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.05.011.
14. What is flow cytometry? 2016-01-02. URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Flow-Cytometry-Methodology-Uses-and-Data-Analysis.aspx> (Date of access: 30.10.2024).
15. Miret S. Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*. 2005. Vol. 11(2). P. 184–193.
16. Mahto S. K., Chandra P., Rhee S. W. In vitro Models, Endpoints and Assessment Methods for the Measurement of Cytotoxicity. *Toxicology and environmental health sciences*. 2010. Vol. 2(2). P. 87–93.
17. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay / G. Ciapetti et al. *Biomaterials*. 1993. Vol. 14(5). P. 359–364. DOI: 10.1016/01429612(93)900557.
18. An ELISA–based method for the quantification of incorporated BrdU as a measure of cell proliferation in vivo / B. Behl et al. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006. Vol. 158(1). P. 37–49. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.05.011.
19. Herbář Wendys. 2016-01-02. URL: <http://botanika.wendys.cz/> (Date of access: 30.10.2024).
20. Atlas rostlin. 2016-01-02. URL: <http://bylinky.atlasrostlin.cz/> (Date of access: 30.10.2024).
21. Allemann B., Baumann L. Antioxidants used in skin care formulations. *Skin Therapy Lett*. 2008. Vol. 13(7). P. 5–9.

22. Pandey K. B., Rizvi S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009. Vol. 2(5). P. 270–278.
23. Kumar S., Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. *The Scientific World Journal*. 2013. Vol. 2013(1). P. 1–16. DOI: 10.1155/2013/162750.
24. An overview of encapsulation technologies for food applications / V. Nedovic et al. *Procedia Food Science*. 2011. Vol. 1. P. 1806–1815. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665> (Date of access: 30.10.2024).
25. Casanova F., Santos L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*. 2015. Vol. 33(1). P. 1–17. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900.
26. Ultrasonic liposome preparation. Heilscher – Ultrasound Technology. 2016-01-08. URL: <http://www.hielscher.com/ultrasonic-liposome-preparation.htm> (Date of access: 30.10.2024).
27. Immordino M. L., Dosio F., Cattell L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*. 2006. Vol. 1(3). P. 297–315.
28. The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. URL: https://www.researchgate.net/publication/272133306_The_Folin-Ciocalteu_assay_revisited_Improvement_of_its_specificity_for_total_phenolic_content_determination (Date of access: 30.10.2024).
29. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584998003153> (Date of access: 30.10.2024).
30. Sommeregger W, Sissolak B, Kandra K, von Stosch M, Mayer M, Striedner G (2017) Quality by control: towards model predictive control of mammalian cell culture bioprocesses. *Biotechnol J* 12(7):1–7.

ДОДАТОК

СЕРТИФІКАТ



Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет

Цим засвідчується, що

Кушка Р. О.

**Науковий керівник:
Філіпцова О. В.**

брав(ла) участь у роботі IV Всеукраїнської
науково-практичної конференції
з міжнародною участю

**YOUTH
PHARMACY
SCIENCE**



Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.

Алла КОТВИЦЬКА

10-11 грудня 2024 р.
м. Харків,
Україна

ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ПРИРОДНИХ РЕЧОВИН

Кушка Р. О.

Науковий керівник: Філіпцова О. В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

philiptsova@yahoo.com

Вступ. Використання клітинних ліній з кожним роком знаходить все більше і більше сфер використання: від дослідження вірусів, так і до виробництва інтерферонів. Окремим способом використання клітинних ліній є дослідження токсичності природних сполук *in vitro* з метою, щоб з'ясувати летальну концентрацію речовин, не ставлячи досліди на тваринах.

Мета дослідження. Ознайомлення із методикою дослідження токсичності деяких представників природних сполук на лінії клітин методом *in vitro*.

Матеріали та методи. Пошук актуальних джерел наукової літератури та аналітичний огляд висновків.

Результати дослідження. Культури клітин – це рослинні, тваринні або людські клітини, що були вирощені штучним шляхом в лабораторії, де мають бути створені оптимальні умови для розмноження. Різні спеціалізовані клітини можуть бути вирощені за допомогою різних методів.

Тести на цитотоксичність базуються на різних методах. Одним з найпоширеніших є колориметричний метод. Це оптичний метод, заснований на спостереженні за кольором досліджуваної суспензії. Абсорбція (поглинання світла при різних довжинах хвиль) використовуваних барвників вимірюється за допомогою спектрофотометра. Зразки вносяться мікропіпеткою в певні багатолункові планшети, найчастіше 96-лункові, які потім оцінюються зчитувачем у спектрофотометрі. Іншим методом є проточна цитофлуориметрія – метод підрахунку, аналізування та сортування клітин завислих у потоці рідини, яка досягла значного прогресу. У проточній цитометрії лазерний промінь використовується для визначення

хімічних і фізичних властивостей досліджуваних речовин. Наприклад, кількість клітин у суспензії можна визначити на основі різних оптичних властивостей клітин.

Висновки. Використання клітинних ліній для дослідження токсичності природних сполук може допомогти більш детально досліджувати вплив цих речовин на ті, чи інші типи клітин або органів. Так як клітинні лінії в першу чергу є похідними окремих органів (наприклад, НЕК-293 – клітинна лінія, отримана з нирки ембріону людини), це дає змогу конкретно вивчати вплив токсичних речовин на ті, чи інші органи, не завдаючи шкоди людині або тварині. Такий метод може забезпечити гуманні способи наукових досліджень.