

Винахід має відношення до фармації, а саме до способів визначення токсичних або фармакотерапевтичних доз лікарських речовин і може бути використаний під час проведення доклінічних і скринуючих досліджень лікарських речовин.

Відомий спосіб визначення активності граміцидіну шляхом контактування бактеріальної суспензії (*Photobacterium leiognathi*) з антибіотиком з наступним оцінюванням його дії на тест-систему за ступенем падіння люмінесценції (а.с. СРСР №1255920, G01N33/15, C12Q1/02, 1/06, опубл. 07.09.86).

Недоліком відомого способу є неможливість його застосування для визначення фармакотерапевтичних доз інших лікарських речовин.

За прототип пропонованого винаходу обрано спосіб визначення токсичних або фармакотерапевтичних доз лікарських речовин шляхом проведення випробувань доз лікарських речовин на групі тест-систем з наступним оцінюванням дії речовин на тест-системі за показником виживання і порівнянням останнього з контролем (Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. За редакцією член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова, Київ, 2001р., с.85-95, 334-349).

У відомому способі в якості тест-системи використовують експериментальних тварин (мишей, щурів, морських свинок, кроликів, собак тощо), при цьому для одержання достовірного результату використовують велику кількість тварин. Виживання останніх фіксують візуально. Результати випробувань опрацьовують математичним методом з використанням критерію Ст'юдента, будують криву залежності „доза-ефект” і по кривій визначають величини токсичних або фармакотерапевтичних доз лікарських речовин у мг/кг маси тварини.

Однак дози лікарських речовин у зазначених вище одиницях, одержані під час здійснення відомого способу, не можуть бути використані для терапевтичного лікування людей. Для цього необхідно дози, одержані на тваринах, перерахувати з застосуванням відомих коефіцієнтів. Проте яким би способом або навіть декількома способами цей перерахунок не було б здійснено, він не буде абсолютно точним.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу визначення токсичних або фармакотерапевтичних доз лікарських речовин шляхом використання нової тест-системи і нового методу визначення її виживання при діянні лікарської речовини таким чином, щоб забезпечити одержання величин доз, які не потребують подальшого перерахунку за допомогою відомих коефіцієнтів.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення токсичних або фармакотерапевтичних доз лікарських речовин шляхом проведення випробувань доз лікарських речовин на групі тест-систем з наступним оцінюванням дії речовин на тест-системі за показником виживання і порівнянням останнього з контролем, згідно з винаходом, в якості тест-системи використовують клітинні лінії на основі клітин людини, а виживання визначають шляхом введення в клітинну культуру спочатку 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолу броміду, а потім диметилсульфоксиду з наступним аналізом одержаних розчинів відомим спектрофотометричним методом за довжини хвилі, що дорівнює 550нм.

При цьому для визначення токсичних доз лікарських речовин або доз гепатопротекторів в якості клітинної лінії на основі клітин людини використовують лінію HepG2 на основі клітин гепатоми людини.

Сукупність суттєвих ознак пропонованого винаходу забезпечує одержання величин токсичних або фармакотерапевтичних доз лікарських речовин, які не потребують подальшого перерахунку за допомогою відомих коефіцієнтів, в результаті того, що на відміну від прототипу лікарська речовина впливає безпосередньо на клітини людини, які мають властивість сприймати акцептор водню, яким є 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолу бромід, і перетворювати його у мітохондріях у формазанову сіль, яка розчиняється у диметилсульфоксиді. Це сприяє тому, що виживання клітин визначається більш точним фізико-хімічним методом.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Випробування доз лікарських речовин проводять на групі клітинних ліній на основі клітин людини. Для цього клітини вирощують на живильному середовищі до досягнення субконфлуентного моношару, потім видаляється середовище культивування і додається нове середовище культивування з лікарською речовиною. Виживання клітин визначають шляхом введення у клітинну культуру спочатку 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолу броміду, а потім диметилсульфоксиду з наступним аналізом одержаних розчинів відомим спектрофотометричним методом за довжини хвилі, що дорівнює 550нм.

В якості живильного середовища використовують середовища DMEM (каталог „Sigma”, №D6655, 2003г., с.424), середовище Ігла (”Flow”, Велика Британія) та ін.

Спосіб ілюструється наступними конкретними прикладами, у котрих в якості клітинної лінії використовують лінію HepG2 на основі клітин гепато-ми людини як одну з найбільш чутливих і доступних клітинних ліній.

Приклад 1.

Клітини лінії HepG2 у 0,2мл живильного середовища DMEM розсіювали по чарунках 96-чарункового плоскодонного планшета, приблизно  $20 \times 10^3$  клітин на чарунку. Планшет поміщали у CO<sub>2</sub>-інкубатор і проводили інкубування протягом 24 годин при стандартних умовах: температура 37°C, 95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>. Після закінчення інкубації здійснювали заміну живильного середовища. У чарунки А-1 - Н-1 (1 група) вносили по 0,2мл чистого живильного середовища (інтактна група). У решту чарунок вносили по 0,2мл живильного середовища, яке містило тетрациклін у таких концентраціях:

- чарунки А-2 - Н-2 (2 група) - 0,0078мкмоль на 1мл живильного середовища;
- чарунки А-3 - Н-3 (3 група) - 0,016мкмоль на 1мл живильного середовища;
- чарунки А-4 - Н-4 (4 група) - 0,031мкмоль на 1мл живильного середовища;
- чарунки А-5 - Н-5 (5 група) - 0,062мкмоль на 1мл живильного середовища;
- чарунки А-6 - Н-6 (6 група) - 0,104мкмоль на 1мл живильного середовища;
- чарунки А-7 - Н-7 (7 група) - 0,130мкмоль на 1 мл живильного середовища.

Після заміни живильного середовища планшет поміщали в CO<sub>2</sub>-інкубатор і проводили інкубування протягом 24 годин при стандартних умовах. Після закінчення інкубації проводили оцінювання виживання клітин у культурі. Для цього додавали 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолу бромід у кількості 0,04мл на чарунку і проводили інкубування протягом 40 хвилин при стандартних умовах. Після закінчення інкубування з усіх чарунок видаляли середовище з 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолу бромідом, вносили диметилсульфоксид

у кількості 0,2мл на чарунку, ретельно піпетували і потім здійснювали інкубування протягом 10 хвилин при стандартних умовах.

Після закінчення інкубації планшет поміщали в спектрофотометр „Тесап” і проводили аналіз одержаних розчинів за довжини хвилі, що дорівнює 550нм. Одержані результати наведені в таблиці 1.

Аналіз даних показав, що тетрациклін здійснював токсичну дію на клітини печінки навіть за найменшої його концентрації (0,0078мкмоль/мл). При вказаній концентрації виживання клітин достовірно зменшилось на 7,87% у порівнянні з контролем і становило 92,13%.

Таблиця  
1

Експериментальні групи	Концентрація тетрацикліну, мкмоль/мл	Поглинання при 550нм ( $M \pm m$ )	Вживання клітин, %
1	2	3	4
1 група (контроль)	-	0,991 $\pm$ 0,930	100,0 $\pm$ 3,39
2 група	0,0078	0,913 $\pm$ 0,015p<0,001	92,13 $\pm$ 1,55
3 група	0,016	0,875 $\pm$ 0,019p<0,001	88,29 $\pm$ 1,95
4 група	0,031	0,756 $\pm$ 0,018p<0,001	76,29 $\pm$ 1,81
5 група	0,062	0,471 $\pm$ 0,016p<0,001	47,53 $\pm$ 1,56
6 група	0,104	0,183 $\pm$ 0,0100p<0,01	18,47 $\pm$ 1,01
7 група	0,130	0,074 $\pm$ 0,0087p<0,001	7,47 $\pm$ 0,08

Примітка: достовірність розраховано у порівнянні з контролем (метод Ст'юдента); p - показник достовірності при порівнянні з контролем.

При внесенні тетрацикліну в концентрації 0,062мкмоль/мл виживання клітин у культурі зменшилося майже в 2 рази і становила 47,53%.

При внесенні тетрацикліну в найбільшій концентрації (0,130мкмоль/мл) виживання клітин у культурі зменшилося на 92,53% і становило 7,47%.

Таким чином, тетрациклін здійснював токсичну дію на клітини печінки в діапазоні доз 0,0078-0,130мкмоль/мл. Ці дози можуть бути використані для моделювання гострого або хронічного ураження клітин у культурі.

Приклад 2.

Клітини лінії HepG2 у 0,2мг живильного середовища ДЕМ розсіювали по чарунках 96-чарункового плоскодонного планшета, приблизно  $20 \times 10^3$  клітин на чарунку. Планшет поміщали в CO<sub>2</sub>-інкубатор і проводили інкубування протягом 24 годин при стандартних умовах: температура 37°C, 95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>. Після закінчення інкубації здійснювали заміну живильного середовища. У чарунки А-1 - Н-1 (1 група) вносили по 0,2мл чистого живильного середовища (інтактна група). У решту чарунок вносили по 0,2мл живильного середовища, яке містить тетрациклін в концентраціях 0,062мкмоль/мл. Планшет поміщали в CO<sub>2</sub>-інкубатор і проводили інкубування протягом 24 годин при стандартних умовах.

Після закінчення інкубації здійснювали заміну живильного середовища. У чарунки А-1 - Н-1 (1 група - інтактна) і А-2 - Н-2 (2 група - контрольна) вносили по 0,2мл чистого живильного середовища. У чарунки А-3 - Н-6 вносили по 0,2мл живильного середовища, яке містило ліолів у таких концентраціях:

- чарунки А-3 - Н-3 (3 група) - 0,040мг/мл:
- чарунки А-4 - Н-4 (4 група) - 0,080мг/мл:
- чарунки А-5 - Н-5 (5 група) - 0,160мг/мл:
- чарунки А-6 - Н-6 (6 група) - 0,200мг/мл.

У чарунки А-7 - Н-9 вносили по 0,2мл живильного середовища, яке містило аргініну глутамат у таких концентраціях:

- чарунки А-7 - Н-7 (7 група) - 0,150мг/мл:
- чарунки А-8 - Н-8 (8 група) - 0,300мг/мл:
- чарунки А-9 - Н-9 (9 група) - 0,600мг/мл.

У чарунки А-10 - Н-12 вносили по 0,2 мл живильного середовища, яке містило силібор у таких концентраціях:

- чарунки А-10 - Н-10 (10 група) - 0,020мг/мл:
- чарунки А-11 - Н-11 (11 група) - 0,040мг/мл:
- чарунки А-12 - Н-12 (12 група) - 0,080мг/мл.

Після заміни живильного середовища планшет поміщали в CO<sub>2</sub>-інкубатор і проводили інкубування протягом 24 годин при стандартних умовах. Після закінчення інкубації проводили оцінювання виживання клітин у культурі. Для цього додавали 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолу бромід у кількості 0,04мл на чарунку і проводили інкубування протягом 40 хвилин при стандартних умовах. Після закінчення інкубування з усіх чарунок видаляли середовище з 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолу бромідом, вносили диметилсульфоксид у кількості 0,2мл на чарунку, ретельно піпетували і потім здійснювали інкубування протягом 10 хвилин при стандартних умовах.

Після закінчення інкубації планшет поміщали в спектрофотометр „Тесап” і проводили аналіз одержаних розчинів за довжини хвилі, що дорівнює 550нм. Одержані результати наведені в таблиці 2.

Дані таблиці показали, що досліджувані гепатопротектори - ліолів, аргініну глутамат і силібор виявляють високу протекторну активність по відношенню до клітин, уражених тетрацикліном. Після їх внесення в культуру уражених гепатоцитів виживання останніх достовірно зросло в порівнянні з контрольною групою.

Таким чином, дози гепатопротекторів, що рекомендуються для терапевтичного лікування людей, становили: ліолів - 0,160мг/мл, аргініну глутамат - 0,300мг/мл, силібор - 0,040мг/мл.

Таблиця 2

Експериментальні групи	Концентрація токсину (тетрацикліну), мкмоль/ мл	Концентрація лікарської речовини, мг/мл			Поглинання при 550нм (M±m)	Виживання клітин, %
		ліолів	аргініну глутамат	силібор		
1	2	3	4	5	6	7
1 група (інтактна)	-	-	-	-	0,973±0,087	100,0±8,94
2 група (контроль)	0,062	-	-	-	0,443±0,056 (*)	45,53±5,76
3 група	0,062	0,040	-	-	0,598±0,031 (*, **)	41,46±2,15
4 група	0,062	0,080	-	-	0,664±0,078 (*, **)	68,24±8,02
5 група	0,062	0,160	-	-	0,796±0,061 (**)	81,81±6,27
6 група	0,062	0,200	-	-	0,812±0,031 (**)	83,45±3,19
7 група	0,062	-	0,150	-	0,587±0,045 (*)	60,33±4,63
8 група	0,062	-	0,300	-	0,872±0,029 (**)	89,62±2,98
9 група	0,062	-	0,600	-	0,889±0,048(**)	91,37±4,93
10 група	0,062	-	-	0,020	0,624±0,059 (*)	64,13±6,06
11 група	0,062	-	-	0,040	0,864±0,080 (**)	88,80±8,22
12 група	0,062	-	-	0,080	0,872±0,057 (**)	89,62±5,86

Примітки: М - середнє значення поглинання за довжини хвилі 550 нм;

m - погрішність;

\* - достовірна різниця при порівнянні з інтактною групою;

\*\* - достовірна різниця при порівнянні з контрольною групою.

Пропонований спосіб визначення токсичних і фармакотерапевтичних доз лікарських речовин у порівнянні з відомим є простішим у реалізації, дозволяє проводити випробовування одразу декількох лікарських речовин, а також виключити використання тварин в експериментальній практиці.