

УДК 577.32.579

Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур

Е.О. Данченко

Витебский государственный университет им. П.М.Машерова

Evaluation of cytotoxicity of pharmaceutical substances with cell cultures

E.O. Danchenko

Vitebsk State University named after P.M. Masherov

Аннотация

Статья посвящена описанию методов оценки цитотоксичности различных фармацевтических субстанций. Рассмотрены определения, относящиеся к понятию цитотоксичность. Для оценки цитотоксического эффекта гепатотропных препаратов предложена трехэтапная методика, которая включает: 1) изучение прямого цитотоксического эффекта препаратов с использованием клеток с редуцированным эндоплазматическим ретикулом; 2) изучение непрямого (опосредованного) цитотоксического действия препаратов на секрецию цитокинов; 3) изучение цитотоксического влияния препаратов в процессе их биотрансформации на гепатоциты первичной культуры (биосинтез ДНК, белка, апоптоз, некроз). В рамках исследования цитотоксичности приведены методы изучения фагоцитоза НСТ-тестом, а также методы исследования цитотоксического действия фармацевтических субстанций на культуры трансформированных клеток и методы изучения содержания свободных аминокислот в тканевых лимфоцитах.

Ключевые слова

Цитотоксичность, фагоцитоз, нейтрофилы, лимфоциты, цитокины, апоптоз, некроз

Под цитотоксичностью понимают появление патологических изменений в клетках при действии физических, химических и биологических агентов. В зависимости от силы и мишени воздействия возможна широкая гамма изменений, ограниченная с одной стороны цитостатическим эффектом, нарушающим прохожде-

Summary

The article describes methods to evaluate the cytotoxicity of various pharmaceutical substances. Authors review the definitions relevant to the concept of cytotoxicity. To assess the cytotoxic effect of hepatotropic preparations, a three-stage procedure was proposed, including 1) the study of direct cytotoxic effect of drugs using cells with a reduced endoplasmic reticulum, and 2) study of indirect (mediated) cytotoxic effect of drugs on the secretion of cytokines, and 3) study of the cytotoxic effect of drugs during their biotransformation hepatocytes in primary culture (the biosynthesis of DNA, protein, apoptosis, necrosis). The data obtained shows the cytotoxicity of methods for the study of phagocytosis in connection with the NBT-test. Research methods for cytotoxic effects of pharmaceutical substances in the culture of transformed cells together with techniques for studying the content of free amino acids in tissue lymphocytes are discussed.

Keywords

Cytotoxicity, phagocytosis, neutrophils, lymphocytes, cytokines, apoptosis, necrosis

ние клетки по клеточному циклу, а с другой стороны – цитотоксическим эффектом, ведущим клетку к гибели [1,2]. Если рассматривать клеточную гибель как конечный результат цитотоксического действия перечисленных выше агентов, то под цитотоксичностью можно понимать разнообразные нарушения, имеющие

на одном фланге запуск механизмов апоптоза, а на противоположном фланге – включение процессов некроза [3, 4]. Примером такого понимания цитотоксичности является перечень лекарственных препаратов, предназначенных для повреждения трансформированных клеток: алкилирующие агенты, препятствующие дифференцировке клеток (циклофосамид, мелфалан и хлорамбуцил); цитотоксические антибиотики, нарушающие транскрипцию ДНК (дактиномицин, даунорубицин и доксорубицин); антиметаболические агенты, нарушающие процессы фолат-зависимого метилирования (флуорурацил, цитарабин и меркаптопурин); вещества, блокирующие митотическое деление клеток (колхицин, цитохалазин, винбластин, винкристин) и др. Токсическое действие таких препаратов часто приводит к развитию множественной лекарственной устойчивости (MDR-multidrug resistance), включающей повышение экспрессии трансмембранных транспортных белков, выводящих препараты из клетки, например, Pgp (P-гликопротеин); активацию ферментов системы глутатиона, обезвреживающих цитотоксические препараты; изменения генов и белков, контролирующих процессы апоптоза опухолевой клетки (p53, семейство Bcl-2, IAP) [5].

На уровне организма понимание цитотоксичности усложняется, поскольку конечный эффект цитотоксического действия агента на клетки может зависеть от процессов его транспорта в крови или лимфе, трансмембранного переноса, особенностей организации тканей и органов, характера рецепторного и неспецифического связывания с молекулами-мишенями, степени адекватности систем защиты клетки (антиоксидантной, репаративного синтеза ДНК, эффективности лизосомального аппарата, активности белков теплового шока – шаперонов и пр.) [6,7]. Так, например, в иммунных механизмах гепатотоксичности учитывают иммуноаллергическую гепатотоксичность, действие цитотоксических лимфоцитов, активность цитокинов, функционирование системы комплемента, роль клеточных коопераций печени, активацию механизмов апоптоза [8-10].

Оценка цитотоксичности потенциальных фармацевтических субстанций является необходимым этапом исследования их на доклиническом этапе в рамках системы GLP [11]. В последние годы все чаще обосновываются предложения о разумном сочетании экспериментов *in*

vivo, *in vitro* и *in silico* (компьютерное моделирование) для оптимизации оценки цитотоксичности лекарственных препаратов и биологических активных веществ. Исследования цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием систем *in vivo* осложняются наличием структурной и функциональной гетерогенности клеток и не могут быть использованы для раскрытия точных молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов. Интерес к исследованиям *in vitro* постоянно повышается с этической точки зрения, так как это позволяет уменьшить количество используемых животных для биологического тестирования.

В настоящее время существует тысячи различных тест-систем для исследований *in vitro*: 1) изолированные перфузируемые органы; 2) тканевые срезы; 3) клеточные культуры/суспензии; 4) изолированные органеллы/мембраны/ферменты; 5) системы безпозвоночных; 6) non-living системы; 7) компьютерные модели. Наиболее простыми и доступными системами являются монослойные клеточные культуры [12-14].

Трехэтапная методика оценки цитотоксичности

Для оценки цитотоксического эффекта гепатотропных препаратов была предложена трехэтапная методика [15-18]:

1. Изучение прямого цитотоксического эффекта препаратов с использованием клеток с редуцированным эндоплазматическим ретикуломом, например, L929 и L41 (снижена биотрансформация препаратов) по следующим параметрам: рост клеток в монослое, пролиферация по включению [³H]тимидина в ДНК, биосинтез белка по включению меченых аминокислот.
2. Изучение непрямого (опосредованного) цитотоксического действия препаратов на секрецию цитокинов (исследование секреции фактора некроза опухоли с использованием перитонеальных макрофагов).
3. Изучение цитотоксического влияния препаратов в процессе их биотрансформации на гепатоциты первичной культуры (биосинтез ДНК, белка, апоптоз, некроз).

Такая трехэтапная методика может быть дополнена исследованиями на циркулирующих и резидентных клетках, выполняющих защитные функции через механизмы фагоцитоза [19-21], а также исследованием более широкого спектра нетрансформированных, например, фибробластов кожи здорового человека и

трансформированных клеток - MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), Skov 3 (аденокарцинома яичника), Hep G2 (гепатокарцинома), НГУК-1 (невринома Гассерова узла крыс) и др. [21-22]. В этом случае может быть расширен спектр фармацевтических субстанций, тестируемых на наличие цитотоксического действия. Так, например, при оценке гепатотоксичности лекарственных препаратов в последние годы используется многоуровневый комплексный подход, включающий 1) анализ биохимических и иммунных маркеров повреждения и аутосенсibilизации; 2) цитологические и молекулярно-биологические исследования биопсийного материала; 3) инструментальная структурно-функциональная визуализация органа [23-27].

Приведем описание технологии использования трехэтапной методики.

I этап. Оценка прямого цитотоксического эффекта.

1. Определение числа клеток в монослое.

Рекомендуется изучать трансформированные опухолевые клетки L929 или L41. Для культивирования клеток используют среду 199, содержащую 10% сыворотки крупного рогатого скота, антибиотики. Пассирование клеток производят в 24- и 48-луночных культуральных планках с применением среды 199, содержащей 5% бычьей сыворотки. Клетки высевают в планки (1×10^5 клеток на лунку), через 2 часа меняют среду, и добавляют изучаемые препараты в концентрации 50-1000 мкг/мл. В качестве контроля используют культуральную среду. Инкубацию клеток с препаратами производят в течение 1-4 суток при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации среду удаляют, клетки промывают трижды холодным раствором Эрла и окрашивают 0,2% раствором кристалл виолета в 2% спирте в течение 10 минут. Краситель экстрагируют 10% раствором уксусной кислоты в течение 1 часа. Оптическую плотность измеряют спектрофотометрически при 1 590 нм. Результаты выражают в процентах по отношению к контролю.

2. Определение биосинтеза ДНК.

Клетки культивируют аналогично описанному выше. Через 2 часа инкубации препарата с клетками добавляют [³H]тимидин в дозе 2,5 мкг/мл. Через 18 часов инкубации (37°C, 5% CO₂) культуральную среду аспирируют, клетки промывают трижды холодным раствором Эрла, [³H]тимидин экстрагируют смесью 10%

уксусной кислоты с этиловым спиртом (1:9) в течение 10 минут. Клетки гидролизуют 0,3 н КОН в течение ночи в термостате при 37°C. Пробы нейтрализуют 1 н хлорной кислотой до pH 7,0. Для определения радиоактивности используют 0,1 мл гидролизата в диоксановом сцинтилляторе. Производят подсчет клеток по окраске кристалл виолетом и рассчитывают число импульсов в минуту на 1000 клеток. Результаты выражают в процентах по отношению к контролю.

3. Определение биосинтеза белка.

Клетки культивируют аналогично описанной выше методике. Через 2 часа инкубации препарата с клетками добавляют [¹⁴C]аминокислоты в дозе 40 мкг/мл. Через 6 часов инкубации (37°C, 5% CO₂) культуральную среду аспирируют, клетки промывают трижды холодным раствором Эрла, [¹⁴C]аминокислоты экстрагируют смесью 10% уксусной кислоты с этиловым спиртом (1:9) в течение 10 минут. Клетки гидролизуют 0,3 н КОН в течение ночи в термостате при 37°C. Пробы нейтрализуют 1 н хлорной кислотой до pH 7,0. Для определения радиоактивности используют 0,1 мл гидролизата в диоксановом сцинтилляторе. Производят подсчет клеток по окраске кристалл виолетом и рассчитывают число импульсов в минуту на 1000 клеток. Результаты выражают в процентах по отношению к контролю.

II этап. Оценка непрямого цитотоксического эффекта.

1. Получение активированных перитонеальных макрофагов.

Мышам внутрибрюшинно вводят 5 мл 3% раствора пептона в среде Хенкса. Через 3 суток внутрибрюшинно вводят 7 мл холодной среды 199, содержащей 10% бычьей сыворотки, антибиотики и 10 ЕД гепарина (раствор А). Через 1 мин жидкость из брюшной полости, содержащую активированные макрофаги, аспирируют, центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин. Затем макрофаги промывают 10 мл раствора А без гепарина и суспензируют в том же растворе. Полученные макрофаги пассируют на 24-луночные планшеты с плотностью 5×10^6 клеток/мл.

2. Определение цитотоксического эффекта.

Через сутки к образовавшемуся монослою добавляют исследуемые препараты и макрофаги инкубируют в термостате при 37°C в течение 24 часов. Через 24 часа кондиционированную среду макрофагов собирают, центрифугируют и тестируют на клетках L929. Для этого к моно-

слою клеток L929 добавляют супернатант макрофагов и актиномицин Д (0,05 мг/мл среды). Через 18 часов инкубации при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ среду удаляют, количество клеток подсчитывают после окраски кристалл виолетом. Рассчитывают цитотоксический индекс:

$$\frac{(a-b) \times 100\%}{a}$$

а

где а – оптическая плотность контроля (супернатант без добавления препарата), b – оптическая плотность опыта (супернатант с добавлением препарата).

III этап. Исследование цитотоксичности с использованием культуры гепатоцитов.

1. Получение гепатоцитов.

Анестезию подопытных крыс производят путем внутримышечного введения смеси кетамин/ромпун (кетамин (мкл) = масса (г)х1, ромпун (мкл) = масса (г)х0,4). Ножницами и пинцетом удаляют шерсть от живота до грудной клетки. По средней линии вскрывают брюшную полость. Накладывают лигатуры на воротную вену и нижнюю полую вену ниже печени. Воротную вену вскрывают, канюлируют иглой для перфузии, которую фиксируют лигатурой. Нижнюю полую вену перерезают. Вскрывают грудную клетку, на нижнюю полую вену выше сердца накладывают лигатуру, вставляют пластиковый катетер и лигатуру затягивают. Нижнюю полую вену ниже печени пережимают лигатурой.

Печень перфузируют сбалансированным раствором Хенкса, содержащим глюкозу (5,5 мМ), НЕPЕС (10 мМ), NaHCO₃ (4,17 мМ), Na₂HPO₄ (0,27 мМ), KH₂PO₄ (0,44 мМ), KCl (5,36 мМ), NaCl (136,9 мМ) со скоростью 20 мл/мин при температуре раствора 37°C. Для разрушения соединительной ткани печени перфузию продолжают раствором коллагеназы (тип I, Seromed[®], Biochrom KG, Berlin, Germany, 40 мг/100 мл среды Хенкса), содержащим 1 мМ/л Ca²⁺, в рециркулирующем режиме в течение 10 мин. Все растворы до применения насыщают 95% O₂ и 5% CO₂ и доводят pH до 7,2. Перед использованием растворы стерилизуют пропусканием через фильтры.

Для получения суспензии гепатоцитов после разрушения соединительной ткани печень выделяют и измельчают в растворе, содержащем НЕPЕС (50 мМ), CaCl₂ (476 мМ), NaHCO₃ (125 мМ), KCl (268,2 мМ), MgSO₄·7 H₂O (4,06 мМ), K₂HPO₄ (22,04 мМ), Na₂HPO₄ (16,85 мМ), альбумин (1,0 г), ДНКазу (1 мкг). Суспензию гепатоцитов фильтруют через 6-слойный стерильный

марлевый фильтр и центрифугируют при 500 г в течение 2 минут для удаления непаренхиматозных и погибших клеток. Гепатоциты ресуспензируют в среде William E, содержащей 10% фетальной сыворотки, 26 мМ NaHCO₃ и 50 мкг/мл гентамицина. Оценку жизнеспособности гепатоцитов производят после окраски их трипановым голубым. Для этого 20 мкл клеточной суспензии смешивают с 20 мкл 0,4% раствора трипанового голубого, производят подсчет всех больших светлых клеток и больших голубых клеток в 20 полях зрения камеры Вьккер (возможно использование камеры Горяева). Расчет виталитета производят по формуле: [(общее количество клеток - количество голубых клеток)/общее количество клеток]х100. В эксперименте используют суспензии с количеством жизнеспособных клеток не менее 85%.

2. Изучение влияния препаратов на биосинтез ДНК.

Изолированные гепатоциты (по 0,6 мл суспензии, плотность 0,5х10⁶ клеток/мл) пассируют в обработанные коллагеном 12-луночные планшеты и культивируют при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Через 2 часа после пассажа среду заменяют, добавляют препараты в диапазоне доз 25-1000 мкг/мл и 1мкКи/лунка [6-³H]тимидина. Клетки с препаратами инкубируют при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 12 часов. После инкубации среду удаляют, клетки промывают смесью ТХУ/метанол и солибилизируют 1 мл 0,3 М КОН в течение 30 минут при температуре 37°C. Супернатант собирают в эппендорфовские пробирки, добавляют 1 мл 40% ТХУ, пробирки встряхивают и центрифугируют 10 минут при 14 000 g. К осадкам добавляют по 1 мл 5% ТХУ и пробы помещают в термоблок на 15 минут при температуре 90°C. После охлаждения пробы центрифугируют 10 минут при 14000 g и по 250 мкл супернатанта добавляют к 4 мл сцинтилляционной жидкости «Rotiscint eco plus». Количество импульсов подсчитывают с помощью β-счетчика. Результаты выражаются как импульсы/минуту/мкг ДНК.

Для определения количества ДНК после инкубации клетки промывают фосфатным буфером (37°C), снимают с плашек инкубацией с раствором коллагеназы (0,5 мг/мл фосфатного буфера, 30 минут, 37°C), переносят в эппендорфовские пробирки и центрифугируют 5 минут при 5000 g. Осадки замораживают при -20°C до исследования. Перед определением ДНК пробы размораживают и клетки лизируют буфером,

содержащим 0,1% додецилсульфат натрия, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl (рН 7,4) в течение 1 ч при постоянном встряхивании. Количество ДНК определяют флуоресцентной спектрометрией после окрашивания красителем Hoechst 33342 (1 мг/мл), используя в качестве стандарта ДНК тимуса теленка. Длина возбуждения 350 нм, длина выделения 450 нм.

3. Изучение влияния препаратов на биосинтез белка.

Гепатоциты пассируют и инкубируют аналогично описанному выше методу (см. исследование биосинтеза ДНК). [³⁵S]метионин (40 мкКи/мл) и препараты добавляют к гепатоцитам через 2 часа культивирования после замены среды. Через 3 часа инкубации 50 мкл среды переносят на фильтр (для определения секретируемых из клетки белков). Остальную среду культивирования удаляют, клетки промывают дважды холодным фосфатным буфером, в лунки добавляют по 0,5 мл лизирующего буфера (25 мМ Трис-НСl [рН 7,5], 5 мМ ЭДТА, 250 мМ NaCl, 1% Тритон X-100) и пробы инкубируют 30 минут при 4°C. Клетки механически снимают с плашек и переносят в эппендорфовские пробирки. Лунки промывают дважды (по 250 мкл) лизирующим буфером и пробирки инкубируют 30 минут при 4°C. После инкубации пробирки центрифугируют 5 минут при 14000g и по 50 мкл супернатанта переносят на фильтры. Фильтры промывают 3 раза холодным 10% ТХУ (по 5 мл), 1 раз водой и переносят в сцинтилляционную жидкость. Количество импульсов подсчитывается на β-счетчике. Результаты выражаются как импульсы/минуту/мг белка.

Для определения количества белка после культивирования среду удаляют, клетки промывают фосфатным буфером, снимают с плашек инкубацией с раствором коллагеназы (0,1 мг/мл фосфатного буфера) в течение 15 минут при 37°C, переносят в эппендорфовские пробирки и центрифугируют 5 минут при 5000 g. Клетки ресуспензируют в 0,5 мл фосфатного буфера и разрушают с помощью ультразвука. Количество белка определяют спектрофотометрически (λ 562 нм) с помощью Pierce BCA-микрометода, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

4. Изучение влияния препаратов на некроз гепатоцитов.

Изолированные гепатоциты (по 0,6 мл суспензии, плотность 0,5x10⁶ клеток/мл) пассируют в обработанные коллагеном 12-луночные план-

шеты и культивируют при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Через 2 часа после пассажа среду заменяют и добавляют препараты в диапазоне доз 25-1000 мкг/мл. Клетки с препаратами инкубируют при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 4 часов. После инкубации культуральную среду собирают и исследуют активность лактатдегидрогеназы с использованием стандартных наборов. Общую активность лактатдегидрогеназы определяют после обработки клеток 0,1% раствором Тритона X-100. Высвобождение лактатдегидрогеназы рассчитывают как процент от общей активности фермента.

5. Изучение влияния препаратов на апоптоз гепатоцитов.

Изолированные гепатоциты (по 1,5 мл суспензии, плотность 0,5x10⁶ клеток/мл) пассируют на обработанные коллагеном 35 мм культуральные чашки. Через 2 часа среду заменяют и добавляют исследуемые препараты. Контроль – среда культивирования. Через 4 часа инкубации при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ клетки промывают холодным фосфатным буфером и лизируют буфером, содержащим 100 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 200 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА и 2% раствор додецилсульфата натрия и через 15 минут механически снимают с плашек и переносят в эппендорфовские пробирки. Затем к гепатоцитам добавляют протеинкиназу К (20 мг/мл) и смесь инкубируют в течение ночи при 56°C. ДНК экстрагируют смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) (центрифугирование 30 мин, 15000 g, при 4°C), промывают 70% этанолом, осадок высушивают (перевернув пробирку на фильтровальную бумагу), ресуспензируют в 10 мМ Трис-НСl и обрабатывают рибонуклеазой А (10 мг/мл) в течение 30 мин при температуре 37°C. Спектрофотометрически определяют количество полученной ДНК (λ 260 и 280 нм). Электрофорез ДНК (5 мкг/проба) осуществляют в 1,5% агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом, при 35 V в течение 4 часов. Наличие апоптоза оценивают по образованию при электрофорезе «ДНК-лестницы», которая выявляется при пропускании ультрафиолетовых лучей через гель [21].

В последние годы появились данные об определении нуклеосом (продукт деградации хроматина при апоптозе) и нуклеиновых кислот в сыворотке крови, что может явиться новым подходом для оценки цитотоксичности препаратов [22].

Фагоцитоз и НСТ-тест

Определение активности и интенсивности фагоцитоза и НСТ-теста позволяет оценить чувствительность фагоцитирующих клеток к действию субстанций, обладающих в той или иной степени выраженным цитотоксическим эффектом. Активность фагоцитоза (ПФ - процент фагоцитоза) - отображает процент фагоцитов, способных к активному захвату частиц. Интенсивность фагоцитоза (ФЧ - фагоцитарное число) - показывает количество частиц, поглощенное одним фагоцитом. Эти простые показатели позволяют оценить цитотоксическое действие субстанций на уровне эндоцитоза и везикулярного транспорта частиц в цитозоле фагоцитов, например, нейтрофилов и моноцитов.

НСТ-тест - это тест восстановления нитросинего тетразолия фагоцитами в процессе поглощения и киллинга бактерий. Этот процесс может быть кислороднезависимым (например, с участием ферментов, катионных белков) и кислородозависимым (через образование агрессивных активных метаболитов кислорода). В многочисленных вариантах НСТ-теста к фагоцитам добавляют нитросиний тетразолий, который после поглощения фагоцитами в присутствии активных метаболитов кислорода превращается в темно-синий диформаза. Постановка НСТ-теста возможна в двух вариантах: при спонтанном НСТ-тесте фагоциты культивируют в присутствии НСТ без предварительной активации клеток, а при проведении индуцированного НСТ-теста в среду культивирования добавляют модуляторы фагоцитарной реакции. Спонтанный НСТ-тест позволяет оценить степень активации кислородзависимых механизмов киллинга неактивированных фагоцитов. Значения индуцированного НСТ-теста характеризуют активность фагоцитирующих клеток в присутствии антигенного раздражителя и рассматриваются как критерий их готовности к завершению фагоцитозу. Обычно рассчитывают функциональный резерв клеток, который представляет собой разницу между числом (интенсивностью) индуцированных диформаза-позитивных клеток и количеством (интенсивностью) спонтанных диформаза-позитивных клеток (в норме 1,5 и более раза). НСТ-тест является простейшим способом оценки цитотоксического действия субстанций посредством механизмов окислительного стресса в фагоцитирующих клетках.

При постановке НСТ-теста используют в качестве тест-систем лабораторный штамм *Staphylococcus aureus P-209*, неокрашенные частицы латекса размером 1,5 мкм, окрашенные частицы латекса диаметром 3 мкм, взвесь опсонированных частиц зимозана и др. Согласно патенту Российской Федерации RU2249215 от 19.02.2003 «Способ исследования поглотительной и метаболической активности нейтрофилов периферической крови методами фагоцитоза и НСТ-теста» реализуется следующим образом. Гепаринизированную венозную кровь разливают в пять конических пробирок по 0,1 мл, первые три из которых содержат по 0,1 мл суспензии неокрашенного латекса с размером частиц 1,5 мкм, 4-я - 0,1 мл среды 199 и 0,1 мл 0,1% водного раствора нитросинего тетразолия (НСТ), 5-я - 0,1 мл суспензии латекса и 0,1 мл 0,1% водного раствора НСТ. Инкубируют в термостате при температуре 37°C: 1-ю пробирку - 5 мин, 2-ю - 30 мин, 3-ю - 1 час, 4-ю и 5-ю - 40 мин. Готовят из 0,2 мл инкубационной смеси мазки на стеклах, высушивают при температуре 37°C, фиксируют в пламени горелки, окрашивают 1% водным раствором метиленового синего, повторно высушивают и микроскопируют под иммерсией при увеличении 90x10. Результаты исследования оценивают по поглотительной активности в реакциях фагоцитоза, определяя процент фагоцитирующих клеток, фагоцитарное число, фагоцитарный интегральный индекс и показатели скорости фагоцитоза. Реакцию НСТ-теста определяют путем подсчета процента формаза-позитивных клеток, вычисления цитохимического показателя активности и индекса стимуляции НСТ-теста. В других модификациях мазки окрашивают водным раствором нейтрального красного (0,1%, 20 мин).

Е.П. Киселева и А.В. Полевщиков [31] предложили метод автоматизированного учета НСТ-теста, основанный на использовании для постановки реакции 96-луночных плоскодонных планшетов и последующего учета результатов на многоканальном спектрофотометре. Для выделения нейтрофилов крови оптимальным оказалось использование ступенчатого центрифугирования на двойном градиенте плотности смеси фикола - урографина (1,114 г/мл и 1,076 г/мл) в течение 15 мин при 250 g с последующим гипотоническим лизисом примеси эритроцитов, что позволяет добиться чистоты выделения жизнеспособных (97 - 98 %) ней-

трофилов на уровне 95-97 %. Тест проводят с выделенными нейтрофилами крови в концентрации 1×10^6 клеток/мл, в присутствии раствора НСТ (4 мг/мл), буферного раствора (спонтанный вариант) или определенного разведения индуктора (продигиозан или опсонизированный комплементом морской свинки зимозан) - индуцированный вариант. Образовавшийся внутриклеточно диформаза экстрагируют смесью 2М КОН и диметилсульфоксида/димексида, а оптическую плотность полученного раствора регистрируют при длине волны 620 нм. К настоящему времени установлено, что в диапазоне от 200 до 750 тысяч клеток в лунке изменения оптической плотности раствора диформаза носят линейный характер как в спонтанном, так и в индуцированном тестах. Однако наиболее простым является метод с обычной лейкосуспензией [19]. Сравнительный анализ использованных корпускулярных индукторов выявил, что максимальную степень клеточной активации вызывает опсонизированный зимозан, менее эффективным оказался хемотаксический трипептид fMLP. Для оценки цитотоксичности препаратов оптимальными оказались спектрофотометрические варианты регистрации НСТ-теста. Существенно повысить специфичность определения количества образованного диформаза позволяет вычисление разницы между величинами поглощения растворов диформаза при двух длинах волн - 630 нм и 490 нм [29-32].

*Исследование цитотоксического действия
фармацевтических субстанций на культуры
трансформированных клеток*

Растворы биофармацевтических субстанций можно использовать для определения цитотоксической активности в опытах *in vitro* в культурах нормальных и трансформированных клеток. В наших наблюдениях опыты ставили на культурах клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), Skov 3 (аденокарцинома яичника), Hep G2 (гепатокарцинома), которые были получены из American Type Culture Collection (США), НГУК-1 (невринома Гассерова узла крыс) - из коллекции НИИ морфологии человека РАМН. Фибробласты кожи здоровых людей (ФБЧ), которые использовали в эксперименте только на 2-8 пассажах, были получены из лаборатории биотехнологии ММУ им. Н.М.Сеченова. Остальные линии клеток брались из коллекции НИИ БМХ им. В.Н.Орехови-

ча РАМН. Культивирование клеток производят во влажной атмосфере (5% CO_2 , 37°C). Используют среды DMEM, RPMI 1640, а также термоинактивированные эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и лошадиную сыворотку (ЛС) фирмы «Gibco» США. Среда инкубации содержала 10% ЭТС, а при культивировании ФБЧ в среду дополнительно добавляли 5% ЛС. Среда содержала также 2 мМ глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин 10 ед/мл и 10 мкг/мл, соответственно (фирма «Панэко»).

Для определения цитотоксической активности исследуемых субстанций клетки пассируют (100 мкл/лунку) в 96-ти луночные планшеты с плотностью $2,5 \times 10^3$ клеток/лунку, за исключением НГУК1 (5×10^3 клеток/лунку). Клетки преинкубируют в планшетах (Costar) в течение 24 часов для их адаптации перед добавлением препаратов. Все эксперименты по культивированию клеток проводят в 4-х повторностях. В лунки помещают по 15 мкл растворов субстанций. Инкубацию проводят 48 или 72 часа.

В конце инкубации оценивают цитотоксичность с помощью МТТ-теста. Реактив МТТ (ДиаЭм, Германия) представляет собой тиазолый синий тетразолий бромид (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид). Метод основан на том, что дегидрогеназы митохондрий только метаболически активных клеток конвертируют МТТ в окрашенные кристаллы формаза. Для проведения МТТ-теста к культивируемым клеткам добавляют 10 мкл 0,5%-ного раствора МТТ. Затем клетки культивируют еще 3 часа при 37°C. После удаления культуральной среды кристаллы формаза растворяют в 0,1 мл DMSO при встряхивании на Titramax 101 в течение 10 мин. Суспензию клеток переносят в 96-ти луночные планшеты с коническим дном и осаждают в центрифуге Eppendorf 5810 R при 1000 g 5 мин. Супернатанты удаляют, а осадки растворяют в 0,1 мл DMSO при встряхивании планшетов в течение 10 мин. Затем окрашенные растворы переносят согласно номерам проб в те 96-ти луночные планшеты с плоским дном, в которых проводили реакцию МТТ-теста. После их встряхивания в течение 10 мин измеряют оптическую плотность растворов на мультискане EX (Lab. System, Финляндия) при длине волны 540 нм. Количество выживших клеток рассчитывают в процентах от контроля, которым являлись клетки, культивированные без добавления препаратов [33].

Содержание аминокислот в резидентных лимфоцитах тканей

Молодым крысам линии Вистар массой 60-70 г внутрижелудочно вводят растворы исследуемых субстанций. Контрольные животные получают аналогичный объем физиологического раствора. Животных декапитируют под легким эфирным наркозом. Выделяют селезенку, тимус и печень. Ткани печени, селезенки и тимуса измельчают ножницами, аккуратно растирают в гомогенизаторе с тефлоновом поршнем. Лимфоциты выделяют в градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,076 г/мл).

Определение свободных аминокислот проводят в хлорнокислых экстрактах диализатов лимфоцитов методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Скорость потока 0,5 мл/мин, температура колонки 27°C. Все определения проводят с помощью хроматографической системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии, например, Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. В таблице представлены сравнительные данные о содержании серосодержащих аминокислот в резидентных лимфоцитах тканей [34].

Заключение

Приведенные в статье методы позволили обосновать классификацию гепатотропных препаратов по степени их цитотоксичности. Молекулярные механизмы действия гепатотропных веществ, включая лекарственные препараты, определяются отсутствием, наличием и степенью выраженности их цитотоксичности. Гепатотропные препараты можно разделить на

2 группы: не проявляющие цитотоксичности в терапевтическом диапазоне доз и обладающие разной степенью цитотоксичности, которая компенсируется гомеостатическими механизмами. К не проявляющим цитотоксичности гепатотропным веществам следует отнести эндогенные биорегуляторы пролиферации и дифференцировки гепатоцитов (ростовые вещества) и экзогенные низкомолекулярные вещества, способные включаться в специфичные для гепатоцита метаболические процессы. Экзогенные препараты оказывают прямое антинекротическое и/или антиапоптозное действие, которые могут сопровождаться опосредованными метаболическими эффектами на уровне других тканей (например, инсулиноподобные эффекты). Обладающие разной степенью цитотоксичности гепатотропные вещества оказывают микроповреждающее действие, вызывающее активацию механизмов регенерации, что обеспечивает более эффективное протекание восстановительных процессов в органе. Оценка цитотоксичности препаратов базируется на определении прямого цитотоксического эффекта с использованием культур клеток с редуцированным эндоплазматическим ретикулом, опосредованных цитотоксических эффектов через продукцию цитокинов и выявлении действия на процессы апоптоза и/или некроза в изолированных гепатоцитах [17]. Так, при исследовании трех гепатотропных препаратов (урсодезоксихолевой кислоты – УДХК, тауроурсодезоксихолевой кислоты – ТУДХК и экстракта солянки холмовой – ЭСХ) удалось, используя тесты на их цитотоксичность, показать, что все три исследуемых препарата обладают гепатопротекторными свойствами, но реализующихся через различные механизмы. Препарат УДХК вызывает микроальтерерирующее

Таблица - Уровни свободных серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крыс, выделенных из тканей (мкмоль/млн клеток), $M \pm m$

Аминокислоты	Печень	Селезенка	Тимус
Метионин	4,44±0,53	0,16±0,04	0,45±0,12
Цистатионин	0,07±0,01	0,18±0,04	0,09±0,03
Цистеин	0,49±0,04	0,76±0,19	0,93±0,41
Таурин	1,64±0,11	2,66±0,42	5,94±2,20
Метионин/цистеин	9,1±0,98	0,21±0,02	0,48±0,05
Цистатионин/цистеин	0,14±0,02	0,24±0,03	0,10±0,01
Цистеин/таурин	0,30±0,04	0,29±0,04	0,16±0,01

действие на клеточном уровне, препарат ТУДХК – на внутриклеточном уровне, что приводит к активации физиологической и репаративной регенерации печени. Препарат ЭСХ не обладает цитотоксичностью в рекомендуемом диапазоне доз и его гепатопротекторный эффект обусловлен дополнительной доставкой

аминокислот и низкомолекулярных веществ, оптимизирующих метаболический пул клетки. Препарат ТУДХК занимает промежуточное положение по проявлениям цитотоксичности и гепатотропным эффектам. Его применение при экспериментальной и клинической патологии, по всей видимости, предпочтительно.

Литература

1. Zimmerman H.J. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. – 1999. – 789 p.
2. Sturgill M.G., Lambert G.H. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical Chemistry*. 1997;43, 8(B): 1512-26.
3. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267: 1457-62.
4. Ярилин А.А. Апоптоз и его роль в иммунных процессах. *Иммунология*. 1996; № 6: 10-23.
5. Северин С.Е., Родина А.В. Проблемы и перспективы современной противоопухолевой терапии. *Успехи биологической химии*. 2006; 46: 43-64.
6. Johnson P.J. Acute and chronic liver disease / *Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects*. W.J.Marshall, S.K.Bangert, eds. – 1995, Churchill livigstone. – P. 237-56.
7. Sherwin J.E., Sobenes J.R. Liver function / *Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlation*. L.A.Kaplan, A.J.Pesce, S.C. Kazmierczak, eds. – 1996, Mosby-Year Book. – P. 505-27.
8. Чиркин А.А. Молекулярные механизмы повреждения печени. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2000; №1: 26-33.
9. Dufour D.R., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R. et al. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*. 2000; 46: 2027-49.
10. Worman H.J. Molecular biological methods in diagnosis and treatment of liver diseases. *Clinical Chemistry*. 1997; 43, 8(B): P. 1476-86.
11. Tweedale A.C. Uses of «Good Laboratory Practices» by regulated industry and agencies, and the safety of bisphenol A. *J. Epidemiol. Community Health*. 2011; 65(6): 475-76.
12. Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. – СПб.: Морсар АВ, 2003. – 239 с.
13. Дроздов Ф.В., Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю. Цитотоксичные производные (22R, 23R)-дигидроксистигмастана. *Биоорганическая химия*. 2007; 33: 349-56.
14. Романова С.Г., Серебренникова Г.А., Штиль А.А. Синтез, изучение цитотоксических свойств и гемолитической активности катионных глицеролипидов алкильного типа. *Вестник МИТХТ*. 2008; 3, №5: 101-5.
15. Danchenko E., Petermann H., Chirkin A., Dargel R. Effect of bile acids on the proliferative activity and apoptosis of rat hepatocytes. *Exp. Toxic. Pathol*. 2001; 53: 227-33.
16. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Абакумова О.Ю. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций. Молекулярная и биохимическая фармакология. Матер. междунар. научн. конф., посвященной 80-летию НАНБ. Гродно, 25-26 сентября 2008. Гродно: ГрГУ им. Я.Купалы, 2008 – С. 80-82.
17. Данченко Е.О. Цитотоксичность гепатотропных препаратов и восстановительные процессы в печени: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. / Гродно.: Институт биохимии НАН Беларуси, 2001. – 39 с.
18. Данченко Е.О., Чиркин А.А. Метаболические эффекты солянки холмовой. М: Медицинская литература, 2001. – 128 с.
19. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. – М.: Витебский медицинский институт, 1996 – 214 с.
20. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1989.- 289 с.
21. Данченко Е.О. Влияние препаратов желчных кислот на апоптоз и некроз гепатоцитов. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2000; №1: 34-40.
22. The Second International Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS-2) held in conjunction with the 6th Annual Scientific Symposium of the Hong Kong Cancer Institute. *Clinical Chemistry*. 2001; 47: 361-70.
23. Guicciardi M.E., Gores G.J. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Seminars in Liver Diseases*. 2010; 30 (4): 402-10.
24. Stewart J.D., Horvath R., Baruffini E., Ferrero I. et al. Polymerase gamma gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology*. 2010; 52 (5): 1791-96.
25. Luedde T., Schwabe R.F. NF-kappaB in the liver - linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2011; 8 (2): 108-18.
26. Tujios S., Fontana R.J. Mechanisms of drug-induced liver injury: From bedside to bench. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2011; 8 (4): 202-11.
27. Garcia-Cortes M., Stephens C., Lucena M.I., Fernandez-Castaner A, Andrade R.J. Causality assessment methods in drug induced liver injury: strengths and weaknesses. *J. Hepatology*. 2011; 55 (3): 683-91.
28. Tandra S., Yeh M.M., Brunt E.M., Vuppalanchi R. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatology*. 2011; 55 (3): 654-59.
29. Park B.H., Fikrig S.M., Smithwick E.M. Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils; a diagnostic aid. *Lancet*. 1968; 11, №2: 532-34.
30. Виксман М.Е., Маянский А.Н. Характеристика опсонических факторов по реакции восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами человека. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 1980; 89, №2: 214-15.
31. Киселева Е.П., Полевщиков А.В. Метод автоматизированного учета НСТ-теста. *Клин. лаб. диагн.* 1994; №4: 27-29.

32. Chen L.W., Jan C.R. Mechanisms and modulation of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced Ca^{2+} mobilization in human neutrophils. *Int. Immunopharmacol.* 2001; Vol. 1 (7): 1341 -49.

33. Чиркин А.А., Абакумова О.Ю., Толкачева Т.А., Стугарева С.С. Исследование цитотоксического действия антиоксидантного комплекса из куколок дубового шелкопря-

да на культуры трансформированных клеток. *Вестник ВДУ.* 2011; №5 (65): 43-48.

34. Шейбак В.М., Горецкая М.В., Дорошенко Е.М., Толкачева Т.А., Чиркин А.А. Серосодержащие аминокислоты в лимфоцитах крыс, получавших экстракт куколок дубового шелкопряда. *Иммунология, аллергология, инфектология.* 2010; №2: 34-39.

Сведения об авторах:

Данченко Елена Олеговна

Витебский государственный университет им. П.М.Машерова, кафедра химии

Московский пр. 33, Витебск, 210038, Беларусь.

Тел. 8-029-3160307 (МТС)

Поступила 21.03.2012 г.