

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ГЕПАТОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ**

*Е.О. Данченко  
Витебск, ВГУ имени П.М. Машерова*

Под цитотоксичностью понимают появление патологических изменений в клетках при действии физических, химических (в том числе лекарственных препаратов) и биологических агентов. В зависимости от силы и мишени воздействия возможна широкая гамма изменений, ограниченная с одной стороны цитостатическим эффектом, нарушающим прохождение клетки по клеточному циклу, а с другой стороны – цитоцидным эффектом, ведущим клетку к гибели.

Цель работы – разработка методики оценки цитотоксичности с использованием культуры гепатоцитов.

**Материал и методы.** Для получения суспензии гепатоцитов печень крыс выделяют и измельчают в растворе, содержащем HEPES (50 мМ), CaCl<sub>2</sub> (476 мМ), NaHCO<sub>3</sub> (125 мМ), KCl (268,2 мМ), MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O (4,06 мМ), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (22,04 мМ), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (16,85 мМ), альбумин (1,0 г), ДНКазу (1 мкг). Суспензию гепатоцитов фильтруют через 6-слойный стерильный марлевый фильтр и центрифугируют при 500 g в течение 2 минут для удаления непаренхиматозных и погибших клеток. Гепатоциты ресуспензируют в среде William E, содержащей 10% фетальной сыворотки, 26 мМ NaHCO<sub>3</sub> и 50 мкг/мл гентамицина. Оценка 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 Вүгкер (возможно использование камеры Горяева). Расчет виталитета производят по формуле: [(общее количество клеток – количество голубых клеток)/общее количество клеток]×100. Полученные клетки используют для модификации методов оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов (диапазон доз 25–1000 мкг/мл) [1].

**Результаты и их обсуждение.** Изучение влияния препаратов на биосинтез ДНК: изолированные гепатоциты (по 0,6 мл суспензии, плотность 0,5×10<sup>6</sup> клеток/мл) пассируют в обработанные коллагеном 12-луночные планшеты и культивируют при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Через 2 часа после пассажа среду заменяют, добавляют препараты и 1мкКи/лунка [6-<sup>3</sup>H]тимидина. Клетки с препаратами инкубируют при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> 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 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. 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.

Изучение влияния препаратов на биосинтез белка: гепатоциты пассируют и инкубируют аналогично описанному выше методу. [<sup>35</sup>S]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.

Изучение влияния препаратов на некроз гепатоцитов: изолированные гепатоциты (по 0,6 мл суспензии, плотность  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл) пассируют в обработанные коллагеном 12-луночные планшеты и культивируют при температуре  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$ . Через 2 часа после пассажа среду заменяют и добавляют препараты в диапазоне доз 25-1000 мкг/мл. Клетки с препаратами инкубируют при температуре  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  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.

Изучение влияния препаратов на апоптоз гепатоцитов: изолированные гепатоциты (по 1,5 мл суспензии, плотность  $0,5 \times 10^6$  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  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  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  $56^\circ\text{C}$ . ДНК экстрагируют смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) (центрифугирование 30 мин, 15000 g, при  $4^\circ\text{C}$ ), промывают 70% этанолом, осадок высушивают (перевернув пробирку на фильтровальную бумагу), ресуспендируют в 10 мМ Трис-НСl и обрабатывают рибонуклеазой А (10 мг/мл) в течение 30 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Спектрофотометрически определяют количество полученной ДНК ( $\lambda$  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.

**Заключение.** Модифицированы методики оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов с использованием гепатоцитов крыс.

#### Список литературы

1. Данченко, Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур / Е.О. Данченко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 2. – С. 22–32.