

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

Разрешено Минздравом Республики  
Беларусь для практического использования

Первый заместитель министра здраво-  
охранения, председатель комиссии по способам  
профилактики, диагностики, лечения и  
организационным формам работы МЗ РБ

 В.М. Ореховский  
28 февраля 2001 г.  
Регистрационный № 160-0011

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ  
ГЕПАТОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**  
(инструкция по применению)

**Учреждение-разработчик:** Витебский государственный медицинский университет

**Авторы:** А.А. Чиркин, Е.О. Данченко

# Оглавление

<b>ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ .....</b>	<b>4</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ .....</b>	<b>4</b>
<b>ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА .....</b>	<b>12</b>
<b>ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ .....</b>	<b>22</b>
<b>ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ .....</b>	<b>22</b>

Гепатопротекторы — препараты, нормализующие строение, метаболизм и функцию паренхимы печени, являются средствами патогенетической терапии острых и хронических заболеваний гепатобилиарной системы. Однако, как и любые чужеродные вещества, гепатотропные препараты могут проявлять цитотоксические свойства, в зависимости от дозы или особенностей применения (Альберт А., 1989). Например, установлено, что некоторые желчные кислоты способны включать программу апоптоза (Kwo P.Y. et al., 1995), ведущую к гибели гепатоцитов. По мнению R.Epstein (1990) цитотоксические агенты оказывают первичное повреждающее действие на структурную организацию и функции ДНК. В то же время цитотоксичность гепатотропных препаратов может лежать в основе молекулярных механизмов восстановительных процессов в печени после повреждения (Чиркин А.А., Данченко Е.О., 2000).

Исследования цитотоксичности препаратов с использованием систем *in vivo* осложняются наличием структурной и функциональной гетерогенности клеток и не могут быть использованы для раскрытия точных молекулярных механизмов действия препаратов (Davila J.C., 1998). Поэтому крайне важна разработка моделей *in vitro* для оценки токсичности ксенобиотиков и лекарственных препаратов, что позволит также уменьшить количество животных, используемых 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 (Silber P.M., Ruegg C.E., 1994). Наиболее простыми и доступными системами являются монослойные клеточные культуры (Guillouzo A.; 1986, Blaauboer B.J., Boobis A.R., 1994).

Предложена трехэтапная методика оценки цитотоксического эффекта гепатотропных препаратов:

1. Изучение прямого цитотоксического эффекта препаратов с использованием клеток с редуцированным эндоплазматическим ретикулумом L929 и L41 (снижена биотрансформация препаратов) по следующим параметрам: рост клеток в монослое, пролиферация по включению  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК, биосинтез белка по включению меченых аминокислот.

2. Изучение непрямого (опосредованного) цитотоксического действия препаратов на секрецию цитокинов (секреция 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).

#### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Рекомендуется для всех гепатотропных препаратов как первый этап экспериментальной апробации и доклинических испытаний.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ**

##### I этап. Оценка прямого цитотоксического эффекта

##### *1. Определение числа клеток в монослое:*

- клетки L929 или L41;
- среда 199;
- сыворотка крупного рогатого скота;
- антибиотики;
- культуральные плашки;

- CO<sub>2</sub>-инкубатор;
- ламинар;
- инвертированный микроскоп;
- 10% раствор кристаллвиолета;
- 2% этиловый спирт;
- раствор Эрла;
- 10% уксусная кислота;
- пипетки;
- вакуумный аспиратор;
- спектрофотометр.

*2. Определение биосинтеза ДНК:*

- клетки L929 или L41;
- среда 199;
- сыворотка крупного рогатого скота;
- антибиотики;
- культуральные плашки;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;
- раствор Эрла;
- <sup>3</sup>H-тимидин;
- 10% уксусная кислота;
- этиловый спирт;
- 0,3 N KOH;
- 1 N хлорная кислота;
- диоксановый сцинтиллятор;

- пипетки;
- термостат;
- β-счетчик.

*3. Определение биосинтеза белка:*

- клетки L929 или L41;
- среда 199;
- сыворотка крупного рогатого скота;
- антибиотики;
- культуральные плашки;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;
- раствор Эрла;
- <sup>14</sup>C-аминокислоты;
- 10% уксусная кислота;
- этиловый спирт;
- 0,3 N KOH;
- 1 N хлорная кислота;
- пипетки;
- диоксидный сцинтиллятор;
- термостат;
- β-счетчик.

II этап. Оценка непрямого цитотоксического эффекта

- 3% раствор пептона;
- среда Хенкса;
- гепарин;

- актиномицин Д;
- центрифуга;
- клетки L929 или L41;
- среда 199;
- сыворотка крупного рогатого скота;
- антибиотики;
- культуральные плашки;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;
- 10% раствор кристаллвиолета в 2% спирте;
- раствор Эрла;
- 10% уксусная кислота;
- пипетки;
- вакуумный аспиратор;
- спектрофотометр.

### III этап. Оценка цитотоксического эффекта на гепатоциты

#### *1. Получение гепатоцитов:*

- кетамин (концентрация 100 мкг/мл);
- ромпун (концентрация 50 мкг/мкл);
- стерильный марлевый фильтр;
- стерильные ножницы, пинцет, чашка Петри;
- стерильная посуда для получения и разведения гепатоцитов (цилиндры, стаканы);
- фильтры для стерилизации растворов;
- ламинар;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;

- рН-метр;
- игла для перфузии;
- пластиковый катетер;
- лигатуры;
- световой микроскоп;
- инвертированный микроскоп;
- центрифуга
- трипан голубой 0,4%
- камера Бюркера;
- среда William E;
- гентамицин;
- глюкоза 5,5 ммоль;
- HEPES 10 ммоль и 50 ммоль;
- NaHCO<sub>3</sub> 4,17 ммоль и 125 ммоль;
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,27 ммоль и 16,85 ммоль;
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 ммоль и 22,04 ммоль;
- KCl 5,36 ммоль и 268,2 ммоль;
- NaCl 136,9 ммоль;
- коллагеназа (тип I, SeromedR, Biochrom KG, Berlin, Germany)
- CaCl<sub>2</sub> 476 ммоль;
- MgSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O 4,06 ммоль;
- альбумин;
- ДНК-аза (1 мкг).

*2. Изучение влияния препаратов на биосинтез ДНК:*

- 12-луночные культуральные плашки;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;
- вакуумный аспиратор;
- пробирки «Эппендорф»;
- центрифуга с охлаждением;
- термоблок;
- β-счетчик;
- 6-<sup>3</sup>H-тимидин;
- смесь трихлоруксусная кислота (5%)/метанол (95%);
- 0,3 моль КОН;
- 5%, 10% и 40% трихлоруксусная кислота;
- сцинтилляционная жидкость;
- фосфатный буфер (рН 7,4);
- краситель Hoechst 33342 (1 мг/мл);
- коллагеназа (0,5 мг/мл);
- Трис-НСl 100 ммоль;
- ЭДТА 1 ммоль;
- додецилсульфат натрия 0,1%;
- стандарт: ДНК тимуса теленка
- флуоресцентный спектрофотометр.

*3. Изучение влияния препаратов на биосинтез белка:*

- 12-луночные культуральные плашки;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;

- вакуумный аспиратор;
- пробирки «Эппендорф»;
- центрифуга с охлаждением;
- ультразвуковой дезинтегратор;
- спектрофотометр;
- бумажные фильтры;
- $\beta$ -счетчик;
- $^{35}\text{S}$ -метионин;
- Трис- $\text{HCl}$  25 ммоль;
- ЭДТА 5 ммоль;
- $\text{NaCl}$  250 ммоль;
- 1% Тритон X-100;
- 10% трихлоруксусная кислота;
- коллагеназа (0,1 мг/мл);
- фосфатный буфер (pH 7,4);
- реактивы для определения количества белка: «Анализ-Х», «Кормей ДиАна», BSA protein assay (Rockford, IL, USA);
- стандарт: бычий сывороточный альбумин.

*4. Изучение влияния препаратов на некроз гепатоцитов:*

- 12-луночные культуральные плашки;
- $\text{CO}_2$ -инкубатор;
- вакуумный аспиратор;
- 0,1% Тритон X-100;
- стандартные наборы для определения активности лактатдегидрогеназы.

*5. Изучение влияния препаратов на апоптоз гепатоцитов:*

- 35 мм культуральные чашки;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;
- вакуумный аспиратор;
- пробирки «Эппендорф»;
- центрифуга с охлаждением;
- фосфатный буфер (рН 7,4);
- Трис-НСl 10 ммоль и 100 ммоль;
- NaCl 200 ммоль;
- ЭДТА 5 ммоль;
- додецилсульфат натрия 2%;
- протеинкиназа К (20 мг/мл)
- фенол;
- хлороформ;
- изоамиловый спирт;
- 70% этанол;
- рибонуклеаза А (10 мг/мл);
- агароза;
- этидиум бромид;
- спектрофотометр;
- прибор для электрофореза;
- устройство с источником УФ для оценки фрагментации ДНК;
- камера для выполнения фотоснимков.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### I этап. Оценка прямого цитотоксического эффекта

#### *1. Определение числа клеток в монослое*

Используются трансформированные опухолевые клетки L929 или L41. Для культивирования клеток используется среда 199, содержащая 10% сыворотки крупного рогатого скота, антибиотики. Пассирование клеток производится в 24 и 48-луночные культуральные плашки с использованием среды 199, содержащей 5% бычьей сыворотки. Клетки высеваются в плашки ( $1 \times 10^5$  клеток на лунку), через 2 ч меняется среда, и добавляются исследуемые препараты в концентрации 50–1000 мкг/мл. В качестве контроля используется культуральная среда. Инкубация клеток с препаратами производится в течение 1–4 сут. при 37° С в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации среда удаляется, клетки промываются трижды холодным раствором Эрла и окрашиваются 0,2% раствором кристаллвиолета в 2% спирте в течение 10 мин. Краситель экстрагируется 10% раствором уксусной кислоты в течение 1 ч. Оптическая плотность измеряется спектрофотометрически при  $\lambda$  590 нм. Результаты выражаются в процентах по отношению к контролю.

## *2. Определение биосинтеза ДНК*

Клетки культивируются аналогично описанному выше. Через 2 ч инкубации препарата с клетками добавляется  $^3\text{H}$ -тимидин в дозе 2,5 мкКи/мл. Через 18 ч инкубации ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) культуральная среда аспирируется, клетки промываются трижды холодным раствором Эрла,  $^3\text{H}$ -тимидин экстрагируется смесью 10% уксусной кислоты с этиловым спиртом (1:9) в течение 10 мин. Клетки гидролизуются 0,3 N КОН в течение ночи в термостате при  $37^\circ\text{C}$ . Пробы нейтрализуются 1 N хлорной кислотой до pH 7,0. Для определения радиоактивности используется 0,1 мл гидролизата в диоксановом сцинтилляторе. Производится подсчет клеток по окраске кристаллвиолетом и рассчитывается число импульсов в минуту на 1000 клеток. Результаты выражаются в процентах по отношению к контролю.

## *3. Определение биосинтеза белка*

Клетки культивируются аналогично описанной выше методике. Через 2 ч инкубации препарата с клетками добавляется  $^{14}\text{C}$ -аминокислоты в дозе 40 мкКи/мл. Через 6 ч инкубации ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) культуральная среда аспирируется, клетки промываются трижды холодным раствором Эрла,  $^{14}\text{C}$ -аминокислоты экстрагируются смесью 10% уксусной кислоты с этиловым спиртом (1:9) в течение 10 мин. Клетки гидролизуются 0,3 N КОН в течение ночи в термостате при  $37^\circ\text{C}$ . Пробы нейтрализуются 1 N хлорной кислотой до pH 7,0. Для определения радиоактивности используется 0,1 мл гидролизата в диоксановом сцинтилляторе. Производится подсчет клеток по окраске кристаллвиолетом и рассчитывается число импульсов в минуту на 1000 клеток. Результаты выражаются в процентах по отношению к контролю.

## II этап. Оценка непрямого цитотоксического эффекта

### *1. Получение активированных перитонеальных макрофагов*

Мышам внутрибрюшинно вводится 5 мл 3% раствора пептона в среде Хенкса. Через 3 сут внутрибрюшинно вводится 7 мл холодной среды 199, содержащей 10% бычьей сыворотки, антибиототики и 10 ЕД гепарина (раствор А). Через 1 мин жидкость из брюшной полости, содержащая активированные макрофаги, аспирируется, центрифугируется в течение 10 мин при 1000 об./мин. Затем макрофаги промываются 10 мл раствора А без гепарина и суспензируются в том же растворе. Полученные макрофаги пассируются на 24-луночные планшеты с плотностью  $5 \times 10^6$  клеток/мл.

### *2. Определение цитотоксического эффекта*

Через сутки к образовавшемуся монослою добавляются исследуемые препараты и макрофаги инкубируются в термостате при  $37^\circ \text{C}$  в течение 24 ч. Через 24 ч кондиционированная среда макрофагов собирается, центрифугируется и тестируется на клетках L929. Для этого к монослою клеток L929 добавляется супернатант макрофагов и актиномицин Д (0,05 мг/мл среды). Через 18 ч инкубации при  $37^\circ \text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  среда удаляется, количество клеток подсчитывают после окраски кристаллвиолетом (см. выше). Рассчитывается цитотоксический индекс:

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

где  $a$  — 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*

Перед началом операции операционный бокс и стол протираются дезинфицирующим раствором. Анестезия производится путем внутримышечного введения смеси кетамин/ромпун (кетамин (мкл) = масса (г)×1; ромпун (мкл) = масса (г) ×0,4). Ножницами и пинцетом удаляется шерсть от живота до грудной клетки. По средней линии вскрывается брюшная полость. Накладываются лигатуры на воротную вену и нижнюю полую вену ниже печени. Воротная вена вскрывается, канюлируется иглой для перфузии, которая фиксируется лигатурой. Нижняя полая вена перерезается. Вскрывается грудная клетка, на нижнюю полую вену выше сердца накладываеться лигатура, вставляется пластиковый катетер и лигатура затягивается. Нижняя полая вена ниже печени пережимается лигатурой.

Печень перфузируется сбалансированным раствором Хенкса, содержащим глюкозу (5,5 ммоль), HEPES (10 ммоль), NaHCO<sub>3</sub> (4,17 ммоль), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,27 ммоль), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,44 ммоль), KCl (5,36 ммоль), NaCl (136,9 ммоль) со скоростью 20 мл/мин при температуре раствора 37° С. Для разрушения соединительной ткани печени перфузия продолжается раствором коллагеназы (тип I, SeromedR, Biochrom KG, Berlin, Germany, 40 мг/100 мл среды Хенкса), содержащим 1 ммоль/л Ca<sup>2+</sup>, в рециркулирующем режиме в течение 10 мин (II этап). Все растворы до применения насыщаются 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> и доводится рН до 7,2. Перед использованием растворы стерилизуются пропусканием через фильтры.

Для получения суспензии гепатоцитов после разрушения соединительной ткани печень выделяется и измельчается в растворе, содержащем HEPES (50 ммоль), CaCl<sub>2</sub> (476 ммоль), NaHCO<sub>3</sub> (125 ммоль), KCl (268,2 ммоль), MgSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O (4,06 ммоль), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (22,04 ммоль), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (16,85 ммоль), альбумин (1,0 г), ДНК-азу (1 мкг). Суспензия гепатоцитов фильтруется через 6-слойный стерильный марлевый фильтр и центрифугируется при 500 g в течение 2 мин для удаления непаренхиматозных и погибших клеток. Гепатоциты ресуспензируются в среде William E, содержащей 10% фетальной сыворотки, 26 ммоль NaHCO<sub>3</sub> и 50 мкг/мл гентамицина. Оценка жизнеспособности производится после окраски гепатоцитов трипановым голубым. Для этого 20 мкл клеточной суспензии смешивается с 20 мкл 0,4% раствора трипанового голубого, производится подсчет всех больших светлых клеток и больших голубых клеток в 20 полях зрения камеры Бюркера (возможно использование камеры Горяева). Расчет виталитета производится по формуле: (общее количество клеток – количество голубых клеток/общее количество клеток)×100. В эксперименте используются суспензии с количеством жизнеспособных клеток не менее 85%.

## *2. Изучение влияния препаратов на биосинтез ДНК*

Изолированные гепатоциты (по 0,6 мл суспензии, плотность  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл) пассируются в обработанные коллагеном 12-луночные планшеты и культивируются при температуре  $37^\circ \text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$ . Через 2 ч после пассажа среда заменяется, добавляются препараты в диапазоне доз 25–1000 мкг/мл и 1 мкКи/лунка ( $6\text{-}^3\text{H}$ -тимидина). Клетки с препаратами инкубируются при температуре  $37^\circ \text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  в течение 12 ч. После инкубации среда удаляется, клетки промываются смесью трихлоруксусная кислота/метанол и солюбилизируются 1 мл 0,3 N КОН в течение 30 мин при температуре  $37^\circ \text{C}$ . Супернатант собирается в пробирки «Эппендорф», добавляется 1 мл 40% трихлоруксусной кислоты, пробирки встряхиваются и центрифугируются 10 мин при 14 000 г. К седиментам добавляется по 1 мл 5% трихлоруксусной кислоты и пробы помещаются в термоблок на 15 мин при температуре  $90^\circ \text{C}$ . После охлаждения пробы центрифугируются 10 мин при 14 000 г и по 250 мкл супернатанта добавляются к 4 мл сцинтилляционной жидкости «Rotiscint eco plus». Количество импульсов подсчитывается с помощью  $\beta$ -счетчика. Результаты выражаются как импульсы/мин/мкг ДНК.

Для определения количества ДНК после инкубации клетки промываются фосфатным буфером (37° С), снимаются с плашек инкубацией с раствором коллагеназы (0,5 мг/мл фосфатного буфера, 30 мин, 37° С), переносятся в пробирки «Эппендорф» и центрифугируются 5 мин при 5 000 г. Седименты замораживаются при –20° С до исследования. Перед определением ДНК пробы размораживаются и клетки лизируются буфером, содержащим 0,1% додецилсульфат натрия, 1 ммоль ЭДТА, 100 ммоль Трис-НСl (рН 7,4) в течение 1 ч при постоянном встряхивании. Количество ДНК определяется 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 пассируются и инкубируются аналогично описанному выше методу (см. исследование биосинтеза ДНК).  $^{35}\text{S}$ -метионин (40 мкКи/мл) и препараты добавляются к гепатоцитам через 2 ч культивирования после замены среды. Через 3 ч инкубации 50 мкл среды переносится на фильтр (для определения секретируемых из клетки белков). Остальная среда культивирования удаляется, клетки промываются дважды холодным фосфатным буфером, в лунки добавляется по 0,5 мл лизирующего буфера (25 ммоль Трис-НСl (рН 7,5), 5 ммоль ЭДТА, 250 ммоль NaCl, 1% Тритон X-100) и пробы инкубируются 30 мин при 4° С. Клетки механически снимаются с плашек и переносятся в пробирки «Эппендорф». Лунки промываются дважды (по 250 мкл) лизирующим буфером и пробирки инкубируются 30 мин при 4° С. После инкубации пробирки центрифугируются 5 мин при 14 000 g и по 50 мкл супернатанта переносится на фильтры. Фильтры промываются 3 раза холодной 10% трихлоруксусной кислотой (по 5 мл), 1 раз водой и переносятся в сцинтилляционную жидкость. Количество импульсов подсчитывается на β-счетчике. Результаты выражаются как импульсы/мин/мг белка.

Для определения количества белка после культивирования среда удаляется, клетки промываются фосфатным буфером, снимаются с плашек инкубацией с раствором коллагеназы (0,1 мг/мл фосфатного буфера) в течение 15 мин при 37° С, переносятся в пробирки «Эппендорф» и центрифугируются 5 мин при 5 000 g. Клетки ресуспензируются в 0,5 мл фосфатного буфера и разрушаются с помощью ультразвука. Количество белка определяется спектрофотометрически (1 562 нм) с помощью Pierce BCA-микрометода, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Возможно использование других наборов, основанных на биуретовом методе.

#### *4. Изучение влияния препаратов на некроз гепатоцитов*

Изолированные гепатоциты (по 0,6 мл суспензии, плотность  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл) пассируются в обработанные коллагеном 12-луночные планшеты и культивируются при температуре  $37^\circ \text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$ . Через 2 ч после пассажа среда заменяется и добавляются препараты в диапазоне доз 25–1000 мкг/мл. Клетки с препаратами инкубируются при температуре  $37^\circ \text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  в течение 4 ч. После инкубации культуральная среда собирается и исследуется активность лактатдегидрогеназы с использованием стандартных наборов фирмы «Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Возможно использование других наборов для определения активности лактатдегидрогеназы. Общая активность лактатдегидрогеназы определяется после обработки клеток 0,1% раствором Тритона X-100. Высвобождение лактатдегидрогеназы рассчитывается как процент от общей активности фермента.

*5. 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 ч среду заменяют и добавляют исследуемые препараты. Контроль — среда культивирования. Через 4 ч инкубации при температуре  $37^\circ \text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  клетки промываются холодным фосфатным буфером и лизируются буфером, содержащим 100 ммоль Трис- $\text{HCl}$  (pH 8,0), 200 ммоль  $\text{NaCl}$ , 5 ммоль ЭДТА и 2% раствор додецилсульфата натрия и через 15 мин механически снимаются с плашек и переносятся в пробирки «Эппендорф». Затем к гепатоцитам добавляется протеинкиназа К (20 мг/мл) и смесь инкубируется в течение ночи при  $56^\circ \text{C}$ . ДНК экстрагируется смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) (центрифугирование 30 мин, 15 000 g, при  $4^\circ \text{C}$ ), промывается 70% этанолом, осадок высушивается (перевернув пробирку на фильтровальную бумагу), ресуспендируется в 10 ммоль Трис- $\text{HCl}$  и обрабатывается рибонуклеазой А (10 мг/мл) в течение 30 мин при температуре  $37^\circ \text{C}$ . Спектрофотометрически определяют количество полученной ДНК (1 260 и 280 нм). Электрофорез ДНК (5 мкг/проба) осуществляют в 1,5% агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом, при 35 В в течение 4 ч. Наличие апоптоза оценивают по образованию при электрофорезе «ДНК-лестницы», которая выявляется при пропускании ультрафиолетовых лучей через гель.

## **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ**

Возможные ошибки при определении прямого цитотоксического эффекта могут возникнуть при увеличении или уменьшении количества пассируемых клеток.

При изучении цитотоксичности на гепатоцитах могут возникнуть затруднения при получении суспензии, обусловленные недостаточной перфузией печени раствором коллагеназы. При избыточном времени перфузии возможно разрушение гепатоцитов и снижение виталитета.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Противопоказания к использованию метода отсутствуют.