

# 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 № 161-0011

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕПАТОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЛИПОГЕНЕЗ IN VITRO

(инструкция по применению)

*Учреждение-разработчик:* Витебский государственный медицинский университет

*Авторы:* Е.О. Данченко

Для восстановления структуры и функции гепатоцитов при экспериментальной патологии или в клинике при заболеваниях гепатобилиарной системы используются гепатотропные препараты. Их гепатозащитный эффект обусловлен повышением резистентности клеток печени к деструктивному воздействию повреждающих агентов вследствие мембраностабилизирующего влияния и нормализации основных реакций метаболизма (Венгеровский А.И., Саратиков А.С., 1988; Саратиков А.С., Венгеровский А.И., 1995).

Любой патологический процесс, приводящий к нарушению функции печени, в той или иной мере отражается на обмене липидов (Губский Ю.И., 1989; Скакун И.П., 1995). При токсическом повреждении печени наиболее часто отмечается следующая последовательность событий: нарушение биоэнергетики клеток и функционирование клеточных рецепторов — белковая дистрофия гепатоцитов — ожирение печени (стеатоз) — цирротические изменения (Lieber C.S., 1997). Печеночные звездчатые клетки (stellate, Ito-клетки, fat-storing-клетки, липоциты) являются основным типом клеток, вовлекающихся в прогрессирование фиброза печени (Friedman S.L, 1993; Pinzani M., 1995 ). Кроме того, наличие гиполипидемического эффекта у некоторых гепатотропных препаратов может быть обусловлено изменением метаболизма липидов в жировой ткани.

Метод тестирования инсулина с использованием жировых эпидидимальных клеток был предложен М. Rodbell в 1964 г. Проведенные исследования показали, что метаболизм изолированных жировых клеток не отличается от метаболизма интактной ткани (Rodbell M., 1964). При использовании инсулина в качестве препарата, стимулирующего липогенез, жировые эпидидимальные клетки были использованы для выявления инсулиноподобного эффекта на метаболизм глюкозы гепатотропных препаратов.

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рекомендуется для предварительной оценки влияния гепатотропных препаратов на обмен липидов в жировых клетках до экспериментальных исследований *in vivo* и клинических испытаний.

## ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

### I этап. Выделение жировой эпидидимальной ткани:

- пластиковая пробирка;
- ножницы;
- пинцет;
- фосфатный буфер Кребса — Рингера (pH 7,4): 0,9% NaCl, 1,15% KCl, 0,61% CaCl<sub>2</sub>, 2,11% KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,82% MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 1,3% NaHCO<sub>3</sub>;
- устройство для насыщения растворов CO<sub>2</sub>.

### II этап. Получение адипоцитов:

- ножницы;
- пинцет;
- пластиковая пробирка;
- нейлоновый фильтр;
- пластмассовая палочка;
- коллагеназа (тип II, «Sigma»);
- фосфатный буфер Кребса — Рингера;
- глюкоза;

## *Изучение влияния гепатотропных препаратов на липогенез in vitro*

- альбумин (фракция IV);
- центрифуга;
- камера Горяева;
- пипетки;
- водоструйный насос;
- термостат.

### **III этап. Оценка липогенеза:**

- фосфатный буфер Кребса — Рингера с альбумином и глюкозой;
- $^{14}\text{C}$ -глюкоза;
- инсулин;
- стеклянные пробирки с пробкой;
- изопропанол;
- гептан;
- 1 N серная кислота;
- роллерная система;
- дистиллированная вода;
- гексан;
- жидкость Брея;
- $\beta$ -счетчик.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### I этап. Выделение жировой эпидидимальной ткани

У крыс-самцов выделяются яички с жировой эпидидимальной тканью. Жировая ткань

препарируется, взвешивается, помещается в пластиковую пробирку, содержащую фосфатный буфер Кребса — Рингера (рН 7,4). Буфер должен газироваться  $\text{CO}_2$  в течение 30–40 мин. Буфер готовится вечером накануне эксперимента, утром перед опытом слегка догазируется.

### **II этап. Получение адипоцитов**

Получение адипоцитов производится с использованием только пластиковой посуды. К 1–2 г измельченной жировой ткани добавляется 3 мл теплого ( $37^\circ \text{C}$ ) фосфатного буфера Кребса — Рингера, содержащего 10 мг коллагеназы с активностью менее 200 ед./мг белка. Смесь инкубируется в течение 1 ч при температуре  $37^\circ \text{C}$  и постоянном мягком перемешивании взбалтыванием через каждые 5 мин. Клеточная суспензия профильтровывается через нейлоновый фильтр, фильтр прочищается пластмассовой палочкой. Суспензия центрифугируется в течение 5 мин при 400 об./мин и три раза промывается теплым фосфатным буфером Кребса — Рингера, содержащим 54% глюкозы и 4% альбумина (без инсулина и жирных кислот) с центрифугированием. Адипоциты при этом всплывают, а примеси клеток и строма осаждаются. Верхний слой супернатанта с адипоцитами переливают в другую пластиковую пробирку. Количество полученных адипоцитов подсчитывается с использованием камеры Горяева.

### **III этап. Оценка липогенеза**

Клетки разводятся до концентрации, соответствующей 50–60 мг ткани в 1 мл, что соответствует 30–40 мкмоль триглицеридов (Rodbell M., 1964). Для эксперимента используется суспензия, содержащая  $1 \times 10^5$  клеток/мл. К 1 мл клеточной суспензии добавляется  $^{14}\text{C}$ -глюкоза с конечной специфической активностью 0,1 мкКи/мкмоль глюкозы и исследуемые препараты. В качестве контроля используется инсулин (10–100 мкед./мл). Инкубация клеток с препаратами производится в течение 2 ч в роллерной системе.

После инкубации суспензия клеток переносится в стеклянную пробирку с пробкой, содержащую 2,5 мл экстрагирующей смеси (изопропанол/гептан/1 N серная кислота 40:10:1). Пробы оставляют стоять на 15 мин при помешивании взбалтыванием. К пробам добавляется 3 мл воды и 3 мл гексана и получают разделение фаз. Нижнюю фазу удаляют, а верхнюю фазу промывают для удаления свободной  $^{14}\text{C}$ -глюкозы водой. Аликвоты верхней фазы переносятся в жидкость Брея и считают в  $\beta$ -счетчике. Известно, что около 50% меченой глюкозы удаляется в виде  $\text{CO}_2$  и включается в состав триглицеридов. Расчет включения глюкозы в липиды жировых клеток производится, соотнося количество импульсов на число клеток.

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ**

При использовании коллагеназы с высокой активностью возможно разрушение жировых клеток.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Противопоказания к использованию метода отсутствуют.