

- ская медицина: матер. Всерос. науч.-практич. конференции с междунаро. участием. – Чебоксары, 2015. – С. 166–170.
15. Воробьев А. А., Петрухин А. В., Засыпкина О. А., Кривоножжина П. С. Первый опыт клинической апробации пассивного экзоскелета верхней конечности // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2015. – № 434, 2 (50 прил.). – С. 51–52.
  16. Воробьев А. А., Петрухин А. В., Засыпкина О. А., Кривоножжина П. С., Поздняков А. М. Экзоскелет – как новое средство в абилитации и реабилитации инвалидов. (Аналитический обзор) // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 185–197.
  17. Воробьев А. А., Петрухин А. В., Засыпкина О. А., Кривоножжина П. С. Клинико-анатомическое обоснование требований к разработке экзоскелетов верхней конечности // Оренбургский медицинский вестник. – 2014. – Т. 2, № 3. – С. 14–19.
  18. Воробьев А. А., Петрухин А. В., Засыпкина О. А., Кривоножжина П. С. Клинико-анатомические требования к активным и пассивным экзоскелетам верхней конечности // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2014. – № 1. – С. 56–61.
  19. Воробьев А. А., Петрухин А. В., Засыпкина О. А., Кривоножжина П. С. Основные клинико-анатомические критерии для разработки экзоскелета верхней конечности // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2014. – Т. 3, № 1. – С. 20–27.
  20. Воробьев А. А., Соловьева И. О., Андриященко Ф. А., Засыпкина О. А., Кривоножжина П. С., Поздняков А. М. Терминология и классификация экзоскелетов // Вестник ВолгГМУ. – 2015. – № 3 (55). – С. 71–78.
  21. Воробьев А. А., Соловьева И. О., Андриященко Ф. А., Пономарева О. А., Кривоножжина П. С. Спорные вопросы терминологии и классификации экзоскелетов (аналитический обзор, собственные данные, уточнения, предложения) // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2015. – № 3. – С. 14–21.
  22. Гехт Б. М., Ильина Н. А. Нервно-мышечные болезни. – М.: Медицина, 2009. – 352 с.
  23. Завалишин И. А. Боковой амиотрофический склероз // ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 272 с.
  24. Коновалова А. Н., Козлова А. В., Гусев Е. И., Коновалов А. Н., Скворцова В. И. Неврология и нейрохирургия. – 2009. – Т. 1. – 624 с.
  25. Левицкий Г. Н. Боковой амиотрофический склероз // Практическая медицина. – 2010. – 576 с.
  26. Ненарокомов А. Ю., Оруджев Н. Я., Антонова Т. Ю., Курушина О. В., Фурсик О. В., Барковская А. Ю., Замятина И. И., Барулин А. Е. Этические проблемы онкологии, психиатрии, неврологии и анестезиологии // Биоэтика. – 2012. – № 9. – С. 36–44.
  27. Яхно Н. Н., Штульмен Д. Р., Мельничук П. В. Болезни нервной системы: В 2 т. – М.: Медицина, 2001. – Т. 1. – 743 с.

**Е. И. Морковин<sup>1,2,3</sup>, А. М. Доценко<sup>1,2</sup>, А. В. Стрыгин<sup>1,2</sup>, А. С. Тарасов<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра фундаментальной медицины и биологии;

<sup>2</sup> Волгоградский медицинский научный центр, лаборатория геномных и протеомных исследований;

<sup>3</sup> НИИ фармакологии ВолгГМУ, лаборатория психофармакологии

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

УДК: 57.085.4:57.088.6

В ходе исследования оптимизирован экспериментальный протокол получения микросомальной фракции гепатоцитов крысы. Для подтверждения пригодности методики в рамках изучения метаболизма лекарственных средств *in vitro* была проведена оценка дыхательной активности микросом флуориметрическим методом.

**Ключевые слова:** микросомы, гепатоциты, микросомальное окисление, метаболизм лекарств *in vitro*, перфузия.

**E. I. Morkovin, A. M. Dotsenko, A. V. Strygin, A. S. Tarasov**

## ISOLATION OF MICROSOMES FROM RAT LIVER: AN OPTIMIZATION PROTOCOL

The current study was undertaken to optimize the experimental protocol of the rat liver microsome isolation. To verify the feasibility of the method, we evaluated respiratory chain activity of microsomes using a fluorometric method. We conclude that the optimized protocol can be used at the initial stage of *in vitro* drug metabolism studies.

**Key words:** microsome, hepatocytes, microsomal oxidation, drug metabolism *in vitro*, perfusion.

Микросомальное окисление осуществляется ферментными системами, локализован-

ными преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени и других тканей. При

гомогенизации и ультрацентрифугировании тканей эндоплазматический ретикулум распадается на отдельные мелкие замкнутые везикулы – микросомы [2, 7]. Механизм микросомального окисления отличается от митохондриального тем, что в нем кислород используется не в биоэнергетических, а в пластических целях. Ферменты микросом способны использовать кислород для частичного окисления специфических органических соединений: стероидных гормонов, холестерина и других гидрофобных молекул [1, 3, 6].

В результате молекулы потенциально токсичного (как правило, гидрофобного) вещества в процессе гидроксирования в микросомах становятся более полярными, легче гидратируются водой и выводятся из организма.

Методы выделения микросом основаны на разной скорости осаждения субклеточных структур печени при центрифугировании в зависимости от их размера и плотности [5]. Обязательным условием является обработка ткани печени раствором хлорида кальция, для уменьшения фактора осаждения микросом, вызывающим их преципитацию.

Выделение микросомальной фракции печени используется для изучения дыхательной функции в норме и при патологии, а также для изучения путей биотрансформации ксенобиотиков, в частности, метаболизма лекарственных средств.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оптимизировать протокол получения микросомальной фракции печени крысы с последующей флуориметрической детекцией дыхательной активности полученных субклеточных структур.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 4 крысах-самках линии «Вистар» массой 250–350 г, содержащихся в виварии НИИ фармакологии ВолгГМУ на стандартном водно-зерновом рационе.

Стандартный протокол выделения микросомальных фракций печени крыс требовал предварительной эвтаназии животных методом декапитации, после которой печень животного извлекали, отмывали от крови 1,5 % раствором калия хлорида из шприца, обсушивали её фильтровальной бумагой и помещали в чашку Петри, стоящую на льду. Затем 0,5 г ткани измельчали и переносили в пробирки для гомогенизатора, куда предварительно наливалось 1,5 мл охлажденного 1,5 % раствора калия хлорида. Пробирки помещали в гомогенизатор на средней скорости (1000 об./мин). Затем гомогени-

нат центрифугировали при 10 000 г в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливали в микроцентрифужные пробирки. К супернатанту добавляли 0,04 М раствора кальция хлорида в соотношении 1:5 по объему и пипетировали. Центрифугировали полученный раствор при 3 000 г в течение 15 мин. Полученный супернатант сливали, а к осадку, содержащему обогащенную фракцию микросом, добавляли 3 мл 0,1 М раствора с pH 7,4 трис-буфера и пипетировали. Таким образом была получена взвесь микросом [4, 7].

Оптимизация методики включала проведение перфузии печени перед её диспергированием. Для этого брюшную полость наркотизированного животного (хлоралгидрат, 400 мг/кг, в/б) вскрывали срединным разрезом и осторожно перемещали внутренности вправо за пределы брюшной полости. В воротную вену вводился катетер диаметром 0,8 мм, соединенный силиконовой трубкой с перфузионным перистальтическим насосом [8]. Перфузию печени производили раствором Рингера со скоростью 6 мл/мин. О корректности катетеризации свидетельствовало набухание и осветление печени; после этого для обеспечения оттока жидкости производился разрез нижней полой вены и вставлялся дренаж, а скорость перфузии увеличивали до 11 мл/мин. После того, как печень становилась максимально бледной, она извлекалась. Объем затраченного перфузата составлял 200–300 мл. Извлеченную печень измельчали и сразу помещали в пробирки для гомогенизации. Проведение следующих этапов не отличалось от стандартного протокола, описанного выше.

Для подтверждения получения фракций микросом проводили оценку дыхательной активности флуориметрическим методом, основанным на добавлении к фракции 0,1 мМ раствора НАДФН или 0,1 мМ раствора НАДН и регистрации падения их флуоресценции в процессе окисления препаратами микросом. Уровень флуоресценции измеряли в мультимодальном ридере Zenyth 1100/3100.

Статистическая обработка результатов производилась в программах GraphPad Prism 5.0 и Statistica 8.0. Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Шапиро-Уилка. Распределение показателя считали нормальным при уровне значимости  $p > 0,05$ . Для количественной характеристики показателей использовали среднее арифметическое значение и среднеквадратическое отклонение. Для анализа различий динамики флуоресценции проводился двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кейлса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований была подтверждена адекватность получения микросомальных фракций обоими методами. Однако уровень флуоресценции при добавлении раствора НАДФН к микросомальной фракции, полученной модифицированным методом с предварительной перфузией печени раствором Рингера, был достоверно выше, чем методом, не подразумевающим перфузию (см. рис.). При этом достоверные различия сохранялись на протяжении всего периода инкубации.

Обнаруженные различия свидетельствуют о том, что концентрация микросом, полученных перфузионным методом, выше, а функции их ферментативных систем сохранены полнее. Это связано с тем, что раствор Рингера, которым производилась перфузия печени, содержит кальция хлорид и приближен по составу к межклеточной жидкости, что обеспечивает максимальное сохранение метаболических свойств органелл, присущих им *in vivo*. Кроме того, раствор обладает достаточной буферной емкостью (309 мосм/л), благодаря чему предотвращает сдвиг pH в кислую сторону метаболитами во время перфузии.

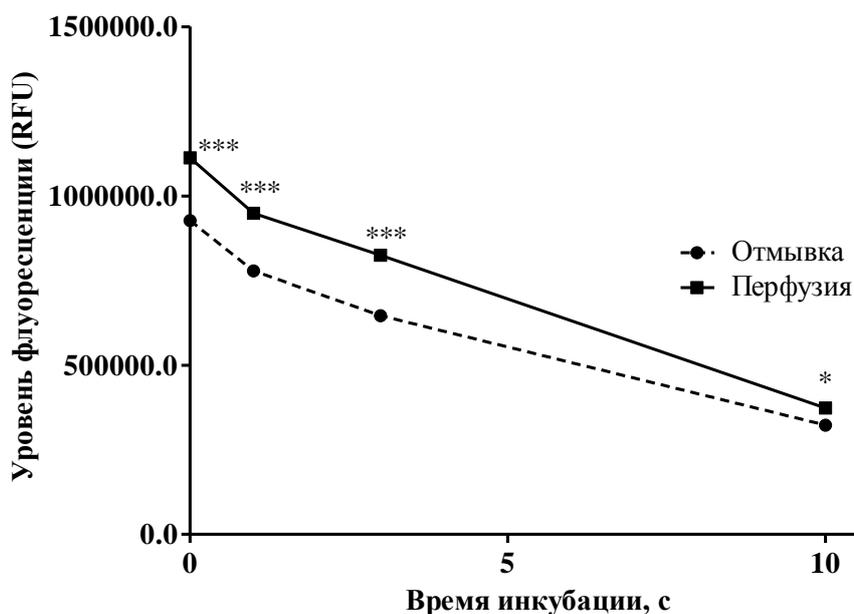


Рис. Сравнительная динамика флуоресценции при различных способах получения микросомальных фракций

Примечание: \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  (двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования была оптимизирована методика получения микросомальной фракции печени крыс. Апробированный протокол может в дальнейшем применяться в рамках исследования метаболизма лекарственных средств *in vitro* как одного из обязательных этапов изучения их фармакокинетических характеристик.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ларина С. Н., Игнатъев И. В., Чебышев Н. В. и др. Оптимизация моделирования биотрансформации лекарственных средств цитохромами CYP-системы // Биомедицина. – 2007. – № 1. – С. 48–56.
2. Михеева О. М. Печень и лекарственный метаболизм // ЭиКГ. – 2011. – № 2. – С. 121–124.
3. Петров В. И., Шишиморов И. Н., Магницкая О. В., Толкачев Б. Е. Персонализированная медицина: эволюция методологии и проблемы практического внедрения // Вестник ВолгГМУ. – 2016. – № 1 (57). – С. 3–11.
4. Строев Е. А., Макарова В. Г., Матвеева И. В. Практикум по биологической химии: Учебное пособие. – М.: ООО «Издательство "Медицинское информационное агентство"», 2012. – 384 с.
5. Hosokawa M., Maki T., Satoh T. Characterization of molecular species of liver microsomal carboxylesterase of several animal species and humans // Arch. Biochem. Biophys. – 1990. – Vol. 277 (3). – P. 219–277.
6. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases // Hepatol. Int. – 2009. – Vol. 3 (4). – P. 526–536.
7. Nikolic D., van Breemen R. B. New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes // Drug. Metab. Dispos. – 2004. – Vol. 32 (4). – P. 387–397.
8. Shen L., Hillebrand A., Wang D. Q. H. Liu M. Isolation and primary culture of rat hepatic cells // J. Vis. Exp. – 2012. – № 64. – P. e3917.