

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор НИЦ ФППББ

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Костина Ольга Михайловна

младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Волкова Екатерина Сергеевна

младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Бармина Светлана Алексеевна

младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Хамбикова Анастасия Владимировна

младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Федорова Светлана Владимировна

аспирант, младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Сихарулидзе Сергей Владимирович

пластический хирург

ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница»

г. Ульяновск, Ульяновская область

КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ КАК МОДЕЛЬНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ГЕПАТОТОКСИКАНТОВ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ

Аннотация: в данной статье авторы ведут речь о гепатоцитах. В настоящее время актуальным является культивирование клеток, в частности гепатоцитов, как модельной тест-системы для оценки гепатотоксикантов и гепатопротекторов. Предложенный протокол культивирования гепатоцитов является оптимизированным и адаптированным для оценки токсичности этанола в условия подострой одно- и многократной интоксикации. Авторами описан ряд биохимических методов по оценке активности ферментов, состояния клеточного гомеостаза с целью использования их в качестве критериев цитотоксичности этанола.

Ключевые слова: гепатоциты, культивирование, гепатотоксиканты, *in vitro*, этаноловая интоксикация.

Изучение влияния гепатопротекторов и гепатотоксикантов на клеточные системы, независимо от последующей цели их использования, на первом этапе

в первую очередь предполагает оценку их токсичности и анализ как морфогенетических, так и морфофункциональных показателей. Методы оценки токсичности, альтернативные классическим тестам на экспериментальных животных, а именно, модели с использованием культур клеток находят все более широкое применение в сфере биомедицинских исследований [1; 2]. Такие методы позволяют решать этические проблемы, связанные с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, способствуют сократить сроки, провести менее затратные в финансовом отношении исследования, прежде всего на стадии их доклинических испытаний, а также установить характер влияния изучаемых токсических соединений/веществ непосредственно на клеточном уровне [7; 10]. Учитывая, что в основе комплекса ответных реакций клеток в различных экспериментальных моделях, лежат единые фундаментальные механизмы на различных уровнях организации живых систем, то речь идет об универсальном характере стрессовых реакций на клеточном уровне [11; 12]. Все это делает использование модели *in vitro* перспективным для оценки жизнеспособности и морфофункциональных изменений клеток в ответ на действие повреждающих факторов различной этиологии, в том числе этанола [3; 4; 8].

В нашем исследовании оптимизация протокола культивирования состоит в разработке оригинального комплексного протокола культивирования гепатоцитов – от этапа забора биоматериала до получения готового продукта – клеточной линии гепатоцитов оптимизированной для определения степени цитотоксичности гепатоцитов после воздействия подострой одно- многократной этаноловой интоксикации среднесмертельной дозой (LD_{50}). Составление паспорта клеточной линии гепатоцитов.

Среди известных способов оптимизации протокола культивирования гепатоцитов можно выделить ряд работ как отечественных, так и зарубежных авторов, в которых используются культуры гепатоцитов для достижения поставленных целей проводимых исследований. Патентный анализ показал, что применение клеточных линий гепатоцитов используется для лечения конкретных

заболеваний, в других работах использовались дорогостоящие среды культивирования, в ряде работ представлены результаты по культивированию гепатоцитов на микроносителях и т.д [5; 6; 9].

Целью исследования является оптимизация протокола культивирования гепатоцитов и разработка модели тестирования токсичности этанола на клеточных линиях с выявлением комплекса биохимических методов оценки на клеточном уровне состояния мембран, устойчивости клеток к окислительному стрессу, систем детоксикации и показателей клеточного гомеостаза. Предлагаемая нами модель может быть использована для решения самых разнообразных задач в области токсикологии и клеточной биологии, а именно, для изучения ряда представляющих практический интерес потенциальных или уже используемых в практике фармакологических препаратов на клеточных культурах.

Задачи исследования.

1. Адаптировать протокол культивирования гепатоцитов для оценки цитотоксичности гепатотоксиканта – этанола в режиме подострой одно- и многократной интоксикации.

2. Адаптировать к условиям культур гепатоцитов ряд биохимических методов с целью использования их в качестве критериев жизнеспособности гепатоцитов в системе *in vitro*.

3. Исследовать состояние клеточного гомеостаза гепатоцитов в культуре на воздействие подострой этаноловой интоксикации.

4. Составить паспорт культивируемой линии гепатоцитов.

Собственные данные.

Материал и методы исследования основные цели культивирования в системе *in vitro* клеток различных органов и тканей – выделение большего жизнеспособных клеток, сохранивших морфологическую и функциональную интактность, а также обеспечение максимально большого выхода гепатоцитов относительно исходного количества ткани. В связи с этим предлагаемая оптимизация

протокола касается всех этапов выделения, культивирования и анализа клеточных культур гепатоцитов.

– Механическое диспергирование печени: печень перфузировали холодным физиологическим раствором с добавлением коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия) без содержания ионов $[Ca^{+}]$. Далее печень помещали в стерильную чашку Петри, содержащую раствор коллагеназы и стерильными скальпелями измельчали до получения однородной массы.

– Химическое диспергирование печени: ферментативное диспергирование печени: полученные фрагменты оставляли в растворе коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия) на 2 часа в темном месте при комнатной температуре. Затем фрагменты помещали в раствор трипсина на 2 часа при температуре 37°C.

– Физико-химический метод диспергирования: далее печень центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. Проводили отмывку полученной суспензии в культуральной среде RPMI-1640 5 минут при 1000 об/мин (ПанЭко, Россия) дважды. Очищенную суспензию проводили в диаколовом градиенте (ПанЭко, Россия) плотностью 1,077 г/см³ и центрифугировали 30 минут при 1000 об/мин. на центрифуге Allegra X-30R (Beckman Coulter, Германия). Полученную взвесь клеток собирали пипетками и выливали в чистую пробирку, затем отмывали в культуральной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) три раза.

– Определение числа живых гепатоцитов в культуре: жизнеспособность определяли с использованием автоматического счетчика клеток TC10 (Bio-Rad, США). Оптимизированный протокол культивирования гепатоцитов позволяет получить большой выход жизнеспособных гепатоцитов – 95–97%.

– Культивирование до образования монослоя: супернатант отбрасывали, к осадку приливалась полная культуральная среда, состоящая из 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия), обогащенной культуральной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) и антибиотика гентамицина 10 мкг/мл. Клетки высаживали в чашки Петри, предварительно обработанные 0,2% раствором желатина.

– Морфологический и токсикологический анализ: для токсикологического анализа влияния этанол в культуру гепатоцитов вводили с расчетом DL_{50} , через 24 часа культивирования в расчете 75,7 мкг/мл и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе СВ-53 (Binder, Германия).

Культуру гепатоцитов для анализа фаз клеточного цикла и анализа путей программируемой клеточной гибели методом проточной цитофлуориметрии CyFlowSpace (Partec, Германия), предварительно снимали со стекла 0,25% раствором трипсина-ЭДТА, действие останавливали отмывочной средой. Далее клетки центрифугировали в течении 5 минут при 700 об/мин. Супернатант отбрасывали, к полученному осадку добавляли 5 мл. раствора параформальдегида разведенного в PBS. Смесь фильтровали через нейлоновый фильтр, окрашивали ядра путем внесения 100 мкл. пропидиум йодида (PI) для анализа клеточного цикла в течении 30 минут в темноте при комнатной температуре. В 1 мл. культур гепатоцитов определяли стадии реализации программы апоптоза, а также клеточного некроза гепатоцитов с использованием флуоресцентных Annexin V, используя коммерческие наборы согласно инструкции производителя – набор Annexin V PI Detection Kit I, BD (Biosciences, США).

ПЦР анализ на исключение контаминации культуры гепатоцитов: использовались праймеры к 25 возбудителям: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma sp.*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae* T.1 и T.2, *Trichomonas vaginalis*, *Cytomegalovirus*, *Gardnerella vaginalis*, HSV-1, 2 (герпесвирус), HCV-6 (герпесвирус), HPV-16,18 (папилломавирус), Rubella (краснуха), *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, вирусам гепатита А (HAV), В (HBV), С (HCV), D (HDV), G (HDV), вирусу Эпштейн-Барра и др. Определение контаминантов, как тест на микробиологическую стерильность использовали тиогликолевую среду (ТГС), мясопептонный бульон (МПБ); мясопептонный агар (МПА) и жидкую среду Сабуро. ПЦР анализ про-

водили по конечной точке в режиме «реального времени» на амплификаторе qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Германия).

Разработанный нами паспорт клеточной линии гепатоцитов включает:

1. Наименование клеточной культуры: культура гепатоцитов нелинейных беспородных белых мышей *Mus Musculus*

2. Коллекционный шифр: НРMs-1.

3. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение: P1, дата: 12.02.2019г.

4. Условия криоконсервации, режим хранения и жизнеспособность клеток после размораживания: ЭТС и ДМСО для заморозки, при температуре -70°C .

5. Ростовые свойства: посев клеток совершался на культуральные флаконы, в полную среду, содержащую 20% сыворотку, антибиотики и RPMI-1640. Посев клеток совершался в концентрации 1 млн. кл./1 мл, без пересева при температуре 37°C .

6. Стерильность: отсутствие микробных агентов и микоплазмы.

7. Однородность культуры: присутствие в культуре только гепатоцитов определялось методом проточной цитофлуориметрии фенотипическим маркером глюкозо-6-фосфатаза в присутствии альбумина.

8. Сфера применения: модельная тест-система в научно-исследовательских и фармакологических сферах.

Все этапы исследования проводили на базе научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии (лаборатория клеточных технологий, лаборатория морфологии (гистология, цитология), лаборатория Биохимии и токсикологии, лаборатория Молекулярной биологии) ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова».

Результаты исследования и их обсуждение

Отличительной особенностью этапов оптимизации протокола в ходе наших исследований является:

– на этапе механического диспергирования использование двойной перфузии холодным физиологическим раствором, без внесения $[Ca^{+}]$, изменили концентрацию используемой коллагеназы;

– использование в составе среды культивирования дополнительных компонентов (селен, инсулин, трансферрин и др.), для достижения цели более длительного сохранения морфофункциональных свойств гепатоцитов в системе *in vitro*.

Перечень функциональных показателей, отражающих токсичность:

1. Определение активности печеночных ферментов, которые позволяют выявлять повреждение и нарушение мембранных систем гепатоцитов (индикаторы цитолиза гепатоцитов), который используется для оценки анаэробного энергетического обмена.

2. Для оценки состояния и соотношения аэробного и анаэробного энергетического обмена анализировали активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), цитохром-с-оксидазы – Сс_о (окисление фермента сопровождается появлением мембранного протонного потенциала, который используется клеткой в первую очередь для синтеза АТФ).

Перечень морфологических критериев:

1. Увеличение активности ферментов аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспартатаминотрансферазы (АсТ) в плазме крови свидетельствует о повреждении мембран гепатоцитов в процессе ПОЛ, вплоть до их полного разрушения под воздействием различных повреждающих факторов.

2. Анализ клеточного гомеостаза и реализацию путей программированной клеточной гибели проводили методом проточной цитофотометрии.

3. Морфологическая характеристика гепатоцитов в культуре – гепатоциты неправильной полигональной формы с крупным ядром и большим количеством

эухроматина. Ядра содержат до 5 ядрышек. Большая часть гепатоцитов – дву-ядерные, а в цитоплазме клеток присутствуют базофильные включения. Гепатоциты формируют клеточные агрегаты – до 25–30 клеток, напоминающие печеночные балки (рис. 1, 2).

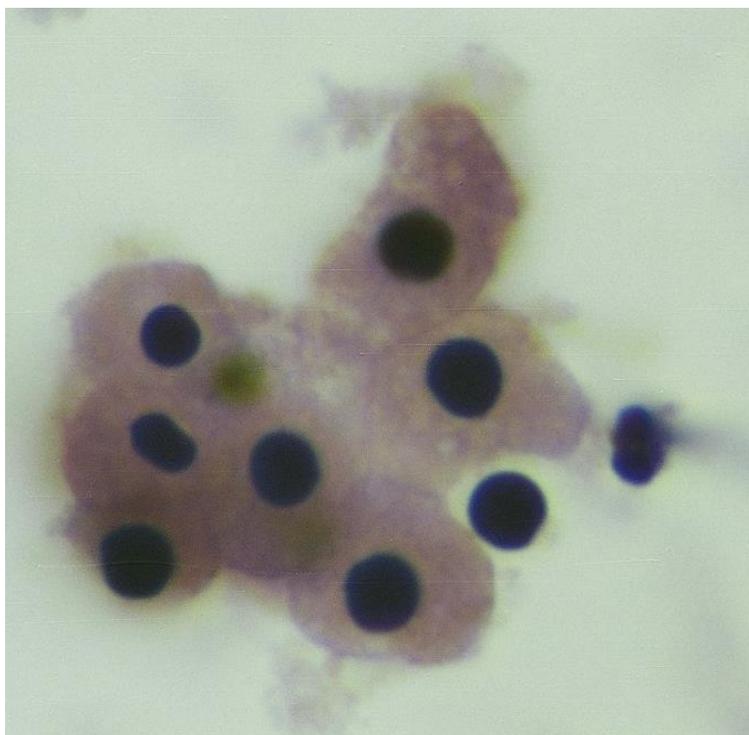


Рис.1. Гепатоциты. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ок10хоб100

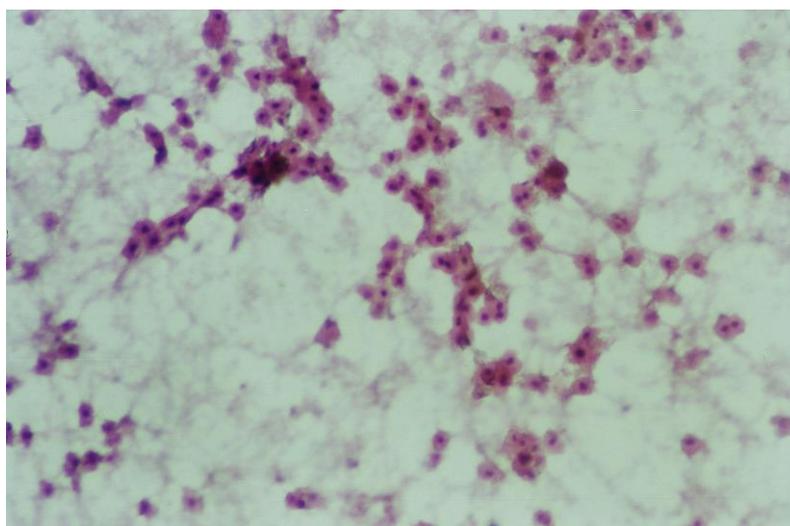


Рис. 2. Формирующийся монослой гепатоцитов. Окраска гематоксилин-эозин.
Увеличение ок10хоб40

Оптимизированная технология культивирования гепатоцитов может быть использована для получения клеточных линий в качестве тест-системы для испытания гепатопротекторов и гепатотоксинов, для использования в области клеточной трансплантологии для лечения заболеваний печени различной этиологии.

Технологическая карта может быть использована для культивирования гепатоцитов в качестве тест-системы научными лабораториями и институтами, фармацевтическими предприятиями.

Выводы

1. Разработан оптимизированный протокол, позволяющий использовать полученную культуру гепатоцитов в качестве системы для тестирования цитотоксичности этанола как гепатотоксиканта в режиме подострой одно- и многократной интоксикации.

2. Разработанный протокол был адаптирован к условиям культуры гепатоцитов для оценки критериев жизнеспособности гепатоцитов в системе *in vitro*, для этого использован ряд биохимических маркеров таких как – ЛДГ, АлАТ, АсАТ и СсО.

3. Проанализировано состояние клеточного гомеостаза, в частности реализация путей программированной клеточной гибели, соотношение живых и погибших гепатоцитов, а также распределение гепатоцитов по стадиям клеточного цикла.

4. Составлен паспорт клеточной культуры гепатоцитов, который включает полную информацию о полученной культуре.

Список литературы

1. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций. – Мн.: БГУ, 2004. – 78 с.
2. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур // Иммунопатология, аллергология, инфектология – №2. – С.22–31.
3. Гуцол, Л.О. Клиническая патофизиология печени / Л.О. Гуцол, С.Ф. Непомнящих // учебно-методическое пособие ИГМУ. – Иркутск. – 2014. – 41 с.
4. Каюпов, Б.А. Разработка лиофилизированного препарата из гепатоцитов человека, для лечения печеночной недостаточности / Б.А. Каюпов, С.С. Сапарбаев, С.К. Уалиева, Ж.А. Касымова, А.А. Оралбай, А. Х. Жакупова // С.С. JSC National Scientific Research Medical Center, Astana city, Kazakhstan. – 2013. – vol. 4. №30, – С.70–76.
5. Патент США №2346981 20.02.2009. Способ получения жизнеспособных клеток печени человека, в том числе печеночных стволовых клеток/клеток-предшественников // патент США №2346981 2009. Бюл. №5 / Ладлоу Д., Марк Ф [и др.].
6. Патент РФ №RU2271817C1 18.08.2004. Биотрансплантат, способ его получения и способ лечения хронического гепатита и цирроза печени // патент РФ №RU2271817C1 2004. Бюл. №22 / Сабурина И.Н., Макаров А.В [и др.].
7. Романова, М.А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / М.А. Романова, А.Ш. Додонова // Молодой ученый. – 2016. – №18. – С. 110–114
8. Червонская Г.П. Культура клеток – альтернативная биологическая модель в токсикологических исследованиях // Тез. докл. 1 съезда токсикологов России – Москва. – 328 с.

9. Чиркин А.А. Молекулярные механизмы повреждения печени // Иммунопатология, аллергология, инфектология – 2000. – №1. – С.26–33.
10. Allen J.W., Bhatia S.N. Engineering liver therapies for the future // Tissue Engineering. – 2002. – 8(5), – P.725–737.
11. Hutton J., O'Brien R. glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family // The Journal of Biological Chemistry. – 2009. – 284 (43): 29241–5.
12. 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.