
НОВЫЕ МЕТОДЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ

К. Ю. Тутаев¹, Я. С. Короткова², А. М. Доценко^{1, 3}, А. В. Сtryгин^{1, 3}

¹ ВМНЦ, лаборатория геномных и протеомных исследований;

² НИИ фармакологии ВолгГМУ, лаборатория психофармакологии;

³ ВолгГМУ, кафедра фундаментальной медицины и биологии

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ГЕПАТОЦИТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

УДК 615.076.9:615.015.4

Ввиду низкой эффективности методов выявления потенциальной токсичности препаратов на доклинической стадии исследования лишь небольшой процент разрабатываемых лекарственных веществ в итоге поступает на потребительский рынок. Нами предложена методика исследования метаболизма лекарственных веществ на культуральных гепатоцитах человека и крысы с последующим определением разницы в соотношении «доза – эффект». Полученные результаты поддаются экстраполяции на организм человека путём создания многоуровневых компьютерных моделей метаболизма лекарственных веществ на уровне организма человека. Данная методика позволит улучшить эффективность доклинических исследований фармакокинетики, возможных взаимодействий и токсичности потенциальных лекарственных средств.

Ключевые слова: доклинические исследования, гепатоциты, цитохром P450, метаболизм лекарственных веществ, токсичность.

K. J. Tutaev, I. S. Korotkova, A. M. Dotsenko, A. V. Strygin

USING CULTURED HEPATOCYTES FOR STUDYING DRUG METABOLISM IN HUMAN LIVER

Due to low efficacy of methods of testing toxicity of potential drugs on preclinical stages only few drugs which were under development in laboratories go on the market. We suggested a new method of investigating drug metabolism on cultured rat and human hepatocytes with further calculating the «dose–effect» difference. These findings can be extrapolated to humans with the help of multiple-level computer models of drug metabolism in human's body. This method will help to improve efficacy of preclinical studies of pharmacokinetics, interactions and toxicity of new potential medicines.

Key words: preclinical studies, hepatocytes, cytochrome P450, drug metabolism, toxicity.

В результате развития технологий создания новых лекарственных соединений существующая методология доклинических испытаний лекарственных средств перестала удовлетворять возросшим требованиям фарминдустрии, так как крайне низкий процент разрабатываемых лекарственных веществ проходил клиническую стадию исследований и доходил до регистрации в качестве лекарственного средства. Одной из основных причин такой ситуации явилась низкая эффективность методов выявления по-

бочных эффектов в доклиническую фазу испытаний [5]. Усилия, направленные на увеличение эффективности доклинической стадии, привели к изменению общего методологического подхода к определению побочного действия лекарственных веществ: для отбора наиболее оптимальных животных моделей для проведения фармакологических исследований были внедрены сравнительные исследования на культурах клеток человека и лабораторных животных, экстраполяцию действия исследуемого лекар-

ственного вещества на человека стали проводить не только с данных, полученных при исследованиях на животных моделях, но и от исследований на культурах клеток человека [2, 7].

Печень является органом, где осуществляется центральный метаболизм большинства из существующих на сегодня лекарственных препаратов. В основном лекарственный метаболизм происходит в паренхиматозных клетках печени – гепатоцитах. На поверхности гепатоциты имеют рецепторы и белки транспортеры лекарственных веществ. В микросомах гепатоцитов содержатся главные ферменты лекарственного метаболизма, такие как цитохромы P450, уридин глутатион трансферазы (UGT), некоторые глутатион-S-трансферазы (GST), флавин содержащие монооксигеназы (FMO). В цитозоле гепатоцитов растворены такие ферменты как сульфотрансферазы (SULT), N-ацетил трансферазы (NAT), некоторые GST, альдегид оксидазы (AO), ксантин оксидазы (XO). Митохондриальная мембрана гепатоцитов содержит моноаминоксидазы (MAO) [11]. Непаренхиматозные клетки печени, к которым относят синусоидальные клетки печени, биллиарные эпителиальные клетки, клетки Купффера, стеллатовые клетки, а также макрофаги, нейтрофилы и натуральные киллеры крови приобретают большое значение при гепатотоксическом повреждении ткани печени, но при лекарственном метаболизме выполняют второстепенную, специфичную для каждого типа клеток задачу. Оптимальный режим жизнедеятельности клеток печени обеспечивает сложноорганизованная структура паренхимы печени. Структурный каркас паренхимы печени сплетён главным образом из волокон фибронектина, коллагена, фибриллин/эластина. Важно отметить, что вне структуры печени гепатоциты быстро теряют свои свойства, происходит процесс, так называемой дедифференциации, который запускается при разрушения межклеточных контактов гепатоцитов в ходе выделения из ткани печени. **Исследования метаболизма лекарственных веществ** (ЛВ) на клеточном уровне проводят на срезах печёночной ткани, культуре первично выделенных гепатоцитов, перевиваемых культурах клеток опухолевого и неопухолевого происхождения и гепатоцитах из плюрипотентных и стволовых клеток.

Гистологические срезы. Толщина срезов печеночной ткани 250–100 мкм лимитирована доступностью кислорода и питательных веществ, для клеток внутри среза. Такая толщина среза сохраняет 3-мерный матрикс печеночной паренхимы, но не сохраняет минимальную структурную единицу печени – лобулу, размер которой, как известно, 2 мм.

Размещённые в 3-мерном матриксе паренхимы гепатоциты печёночного среза длительно (более 72 часов) сохраняют активность ферментов и транспортных белков лекарственного метаболизма, но теряют различия в спектре метаболических и анаболических функций вдоль порто-центральной оси лобулы [9]. Печёночный срез не сохраняет своих первоначальных свойств после криоконсервации из-за разрушения межклеточных контактов гепатоцитов.

Первичную культуру гепатоцитов, также как и гистологические срезы, получают из материала операционных вмешательств на печени. Исследования динамики дедифференциации гепатоцитов, выделенных коллагеназным методом и культивируемых в монослое на коллагене в срок до 168 часов, показали, что до 24 часов паттерн экспрессии белков цитохрома P450 сопоставим с аналогичным паттерном свежeweделенных гепатоцитов, паттерн белковой экспрессии ферментов II фазы метаболизма и лекарственных транспортеров сохраняется неизменным в течении 168 часов, а энергетическая и дыхательная функция гепатоцитов линейно снижается до нулевых отметок к 168 часам культивирования. Динамика дедифференциации гепатоцитов имеет значительное межиндивидуальное различие, которое определяется генетическими особенностями донора гепатоцитов и внешними факторами, воздействующими на физиологическую функцию печени (питание, болезни, приём лекарств, вредные привычки, профессиональные вредности, пол и т. д.) [8].

Дедифференциация и межиндивидуальные различия выделенных гепатоцитов человека ограничивают экстраполяцию данных исследований метаболизма ЛВ на клеточных моделях на аналогичные процессы, происходящие в печени человеческого организма, при воздействии исследуемого ЛВ. Межиндивидуальное различие является непреодолимым недостатком при использовании среза печёночной ткани в качестве клеточной модели метаболизма ЛВ, но преодолимо при работе на культуре свежeweделенных гепатоцитов человека путём сливания культур от разных доноров в один мультидонорный пул, условно представляющий целевую человеческую популяцию.

Дедифференциация существенно замедляется при размещении культуры клеток печени в каркасе, имитирующем структуру и состав печёночной паренхимы, а также добавлением в питательную среду ингибиторов дедифференциации. Считается, что мультидонорная культура свежeweделенных или криоконсервированных гепатоцитов человека является наиболее точным аналогом печеночной ткани

при исследованиях метаболизма ЛВ на клеточном уровне [3, 12–13].

Перевиваемые культуры гепатоцитов.

Альтернативой культуре первичных гепатоцитов человека являются перевиваемые линии гепатоцитов человека, которые обладают рядом преимуществ, таких как доступность и стандартность. По мнению большинства исследователей, наиболее подходящей моделью для исследования метаболизма ЛВ является линия гепатомы человека. Проводились сравнительные исследования метаболизма ЛВ в культуре свежeweделенных гепатоцитов человека, культуре гепатоцитов человека после криоконсервации и линии НераRG после криоконсервации. Показано, что различия в уровне экспрессии мРНК изоформ цитохрома P450 и UGT определяли различие временного профиля метаболитов тестовых лекарственных соединений между культурами свежeweделенных и размороженных гепатоцитов человека, с одной стороны, и культурой НераRG с другой. Уровень экспрессии изоферментов цитохрома P450 и UGT в суспензии свежих гепатоцитов резко снижается в течение суток, но сохраняется на приемлемом уровне в течение недели в 3-мерной культуре. В культуре НераRG активность ферментов лекарственного метаболизма сохраняется в течение недели вне зависимости от способа культивирования [4].

Видоспецифичность биотрансформации ЛВ. Существующие качественные и количественные различия в ферментах лекарственного метаболизма у лабораторных животных и человека обуславливают несовпадение метаболических путей биотрансформации лекарственного вещества в печени, что является причиной видоспецифичной реакции организмов на то или иное ЛВ [7]. Полномасштабные исследования причин видоспецифичности биотрансформации ЛВ стали возможными после полного секвенирования генома человека и описания большинства белков протеома человеческой клетки. Исходя из накопленной информации о продуктах нескольких тысяч генов были проведены геном-масштабные реконструкции метаболической сети человеческой клетки, которые, в свою очередь, послужили отправной точкой для создания геном-масштабных реконструкций метаболической сети крысы и мыши. Таким образом, была реконструирована геном-масштабная модель метаболической сети крысы (*Rattus norvegicus*), включающая 2324 гена и 8268 реакции, и был проведён её сравнительный анализ с геном-масштабной моделью метаболической сети человека, включающей 2315 генов и 8263 реакции. В результате обширного сравнительного

анализа большинство метаболических подсистем показали нулевое видоспецифическое различие. Однако и было показано, что видоспецифичность некоторых ферментов лекарственного метаболизма является причиной, которая не всегда позволяет использовать в качестве животной модели крысу [10].

Тем не менее при исследованиях метаболизма ЛВ используются первично выделенные гепатоциты крысы, в частности, чтобы сравнить соотношение «доза–эффект» (в отношении метаболических потоков лекарственного метаболизма) на уровне клетки, с соотношением «доза–эффект» на уровне организма. Изменение метаболических потоков лекарственного метаболизма определяют по изменению уровня экспрессии мРНК и белков или по концентрации лекарственных метаболитов в гепатоцитах, из клеточной культуры после экспозиции определённой дозы ЛВ, и гепатоцитах, выделенных из печени после введения крысе определённой дозы ЛВ. Разница в соотношении «доза–эффект» между гепатоцитом из культуры и гепатоцитом из печени показывает, в какой степени в биотрансформации ЛВ в организме крысы, помимо метаболизма ЛВ в гепатоцитах, задействованы другие факторы, такие как среда желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), способность всасывания из ЖКТ в кровь, взаимодействие с белками и клетками крови, характер распределения по органам и тканям, выделение почками и лёгкими и др.

Определение разницы в соотношениях «доза–эффект» для культуральных гепатоцитов человека и крысы, и гепатоцитов из ткани печени крысы делает возможным правильный подбор дозировок ЛВ для дальнейших более развёрнутых исследований на животных моделях. Данные, полученные при исследовании метаболизма ЛВ на клеточных культурах гепатоцитов, имеют определяющее значение при экстраполяции на организм человека, путём создания многоуровневых компьютерных моделей метаболизма лекарственных веществ на уровне организма человека [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. *A Liver-Centric Multiscale Modeling Framework for Xenobiotics* / James P. Sluka [et al.] / Plos One. – 2016. – P. 1–40.
2. *Dambach, C. New Technologies and Screening Strategies for Hepatotoxicity: Use of In Vitro Models* / Donna M. Dambach, Barbara A. Andrews, Frederic Moulin // *Toxicologic Pathology*. – 2005. – Vol. 33, № 1. – P. 17–26.
3. *Evaluation of Time-Dependent Cytochrome P450 Inhibition Using Cultured Human Hepatocytes* / Dermot F. McGinnity [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2006. – Vol. 34, № 8. – P. 1291–1300.

4. *In Vitro Evaluation of Major In Vivo Drug Metabolic Pathways Using Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells in Suspension and a Dynamic Three-Dimensional Bioreactor System* / Malin Darnell [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2012. – Vol. 343, № 1. – P. 134–143.

5. *Kola, I. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?* / Ismail Kola and John Landis // *Nature Reviews, Drug Discovery*. – 2004. – Vol. 4. – P. 711–715.

6. *Li, A. Evaluation of Adverse Drug Properties with Cryopreserved Human Hepatocytes and the Integrated Discrete Multiple Organ Co-culture (IdMOC™) System* / Albert P. Li // *Toxicol. Res.* – 2015. – Vol. 31, № 2. – P. 137–149.

7. *Lu, C. Metabolic stability screen in drug discovery* / Chuang Lu // *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics, First Editio.* – 2013. – Vol. 2. – P. 499–522.

8. *Mechanistic evaluation of primary human hepatocyte culture using global proteomic analysis reveals a selective dedifferentiation profile* / James A. Heslop [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2017. – № 91. – P. 439–452.

9. *Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte*

sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME / Patricio Godoy [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2013. – № 87. – P. 1315–1530.

10. *Reconciled rat and human metabolic networks for comparative toxicogenomics and biomarker predictions* / Edik M. Blais [et al.] // *Nature Communicatio.* – 2017. – P. 1–15.

11. *Roth, A. Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury (IDILI): Potential Mechanisms and Predictive Assays* / Alexander D. Roth, Moo-Yeal Lee // *BioMed Research International.* – 2017. – P. 1–23.

12. *System-Dependent Outcomes during the Evaluation of Drug Candidates as Inhibitors of Cytochrome P450 (CYP) and Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) Enzymes: Human Hepatocytes versus Liver Microsomes versus Recombinant Enzymes* / Andrew Parkinson [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2010. – № 25 (1). – P. 16–27.

13. *Zhao, P. Evaluation of Time-Dependent Cytochrome P450 Inactivation of CYP3A in Cryopreserved Human Hepatocytes* / Ping Zhao, Kent L. Kunze, Caroline A. Lee // *Drug Metabolism and Dispositio.* – 2005. – Vol. 33, № 6. – P. 853–861.

А. А. Воробьев³, О. В. Курушина¹, Ф. А. Андриященко², О. И. Агаркова¹

Волгоградский государственный медицинский университет,

¹ кафедра неврологии, нейрохирургии с курсом медицинской генетики, с курсом неврологии, мануальной терапии, рефлексотерапии ФУВ;

² Волгоградский научный медицинский центр;

³ кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКСОСКЕЛЕТА «ЭКЗАР» ПРИ АКУШЕРСКОМ ПАРАЛИЧЕ ДЮШЕНА-ЭРБА У ДЕТЕЙ

УДК 617.3:616-009.2

Оценить эффективность применения экзоскелета «ЭКЗАР» в составе комплексной терапии пациентов с диагнозом акушерский паралич Дюшена-Эрба.

Ключевые слова: абилитация, реабилитация, современные подходы к лечению, немедикаментозная терапия, парез.

A. A. Vorobiov, O. V. Kurushina, F. A. Andryushchenko, O. I. Agarkova

THE FIRST EXPERIENCE OF USE OF THE EXOSKELETON "AKSAR" IN OBSTETRIC PARALYSIS OF THE DUCHENNE-ERB'S CHILDREN

To evaluate the efficacy of exoskeleton "EXAR" in the rate of complex therapy of patients diagnosed with obstetric paralysis of Duchenne-Erba.

Key words: abilitation, rehabilitation, modern approaches to treatment, non medicamental therapy, paresis.

Паралич Дюшена-Эрба обусловлен поражением нервов, входящих в плечевое сплетение или формирующих его корешков CV-CVI, вследствие родовой травмы. Состояние характеризуется нарушением отведения, супинации

и поднимания плеча, а также сгибанием в локте при относительной сохранности движений в пальцах кисти. Примерная частота встречаемости данного состояния составляет 2 из 1 тыс. новорожденных детей [2, 8]. Факторами риска