

Влияние пегелированной гиалуронидазы на ультраструктурную организацию гепатоцитов человека с позиции доклинической оценки безопасности *in vitro*

Швецова А.^{1,3*}, Ершов К.^{1,2}, Королев М.¹, Чурин А.³, Бондаренко Н.¹,
Бгатова Н.¹, Солдатова М.¹, Мадонов П.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ РАН, Томск, Россия

* aleksa-2904@mail.ru

Ключевые слова: пегелированная гиалуронидаза; ультраструктура; клеточная культура; токсичность

Мотивация и цель: Лекарственные препараты на основе тестикулярной гиалуронидазы активно используются в различных областях медицины. Создан прототип лекарственного средства на основе гиалуронидазы, который предполагает применение *per os* [1]. Разрабатываемое новое лекарственное средство должно быть протестировано в доклинических исследованиях, поскольку изучение токсичности и безопасности является одним из необходимых и ключевых этапов. Основополагающий механизм токсического действия ксенобиотиков заключается в повреждении клеток, которое проявляется формированием нарушений в их структуре или функциональном компоненте, что приводит к гибели [2]. Концепция использования тест-системы культуры клеток *in vitro* для оценки токсичности и фармакологической безопасности лекарственных средств в настоящее время весьма актуальна [3]. Клеточный уровень организации является первым, на котором можно провести анализ нарушений в системе «взаимодействие-структура» субклеточных компонентов, определить механизм повреждающего воздействия [4]. Процесс изучения токсического влияния нового разрабатываемого лекарственного средства на культуре гепатоцитов человека обусловлен, в первую очередь, их лекарственной гепатотоксичностью, являющейся причиной отзыва некоторых лекарственных средств из оборота на фармацевтическом рынке [5]. Безусловно, основной моделью являются эксперименты *in vivo* на животных. Однако применение альтернативных моделей клеточных культур человека популярны и позволяют получить данные, которые в последующем способствуют уменьшению числа экспериментов *in vivo* на лабораторных животных, и которые при экстраполяции на организм *Homo sapiens* более релевантны. Метод электронной микроскопии позволяет наглядно представить внутриклеточные структурные компоненты. Проанализировав результаты, можно получить общую картину влияния изучаемого средства на цитоархитектонику и, следовательно, его токсическое воздействие.

Целью было провести анализ ультраструктуры культуры клеток гепатоцитов человека при воздействии пегелированной гиалуронидазы с позиции доклинической оценки безопасности и установить ассоциацию взаимосвязь доза-эффект.

Методы и алгоритмы: Объектом исследования является пегелированная тестикулярная гиалуронидаза Н20(ПЭГ-ГИАЛ), подвергнутая электронно-лучевой иммобилизации на полиэтиленоксиде Макрогол 1500 потоком ускоренных электроном (доза 1,5 Мрад) на импульсном линейном ускорителе-10 (г. Новосибирск, Россия). ПЭГ-ГИАЛ представляет собой лиофилизированный светло-серого цвета порошок (ферментативная активность 2800 ЕД в 1 г сухого вещества). Исследование ПЭГ-ГИАЛ проводили в дозах 37, 75 и 150 ЕД/мл.

Клеточные линии. Перевиваемая культура клеток печени человека Chanq liver, получены из коллекции клеток ФБУН ГНЦ ВиБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия. Клетки культивировали на питательной среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, NuClone, US Origin), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Российская Федерация) и 2 мМоль L-глутамин (ICN, США) при температуре 37 °С в CO₂ инкубаторе.

Оценку ультраструктуры культуры клеток гепатоцитов человека при воздействии ПЭГ-ГИАЛ проводили методом электронной микроскопии.

Клетки Chanq liver культивировали в течение 24 ч. Удаляли среду, добавляя при этом полную среду с 1 % содержанием ЭТС, а также добавляли ПЭГ-ГИАЛ в дозах 37, 75 и 150 ЕД/мл. Продолжали культивирование клеток в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе (температура 37 °С). Культуральную среду удаляли. Фиксирование клеток осуществляли в 1 % растворе OsO₄ на фосфатном буфере (при pH 7,4). После фиксации проводили процесс дегидратации с помощью серии растворов этилового спирта возрастающей концентрации, далее заключали в эпон (Serva, Германия). На ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария) получены полутонкие срезы толщиной 1. Срезы окрашены толудиновым синим. На световом микроскопе (LEICA DME) отобраны клетки для дальнейшего исследования. Получены ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм. Срезы собраны на медные сетки для электронной микроскопии, с помощью насыщенного водного раствора уранилацетата и цитрата свинца отконтрастированы. Полученные образцы исследованы на электронном микроскопе JEM 1400 (Япония) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (г. Новосибирск, Россия).

Результаты: В экспериментах по изучению воздействия ПЭГ-ГИАЛ на ультраструктурную организацию гепатоцитов показано, что во всех изучаемых дозировках наблюдаются некоторые изменения в структуре клеток. При электронно-микроскопическом исследовании гепатоцитов, при культивировании с ПЭГ-ГИАЛ во всех изучаемых дозах, наблюдали значительное возрастание содержания и размеров микроворсинок на мембране клеток, что можно трактовать как увеличение метаболической активности. Цитоплазматическая мембрана не имела нарушений целостности и фрагментации. В условиях культивирования с ПЭГ-ГИАЛ не наблюдалось уменьшения насыщенности клеток органеллами. ПЭГ-ГИАЛ во всех дозах приводит к увеличению содержания структур белкового синтеза клеток – свободных полисомальных комплексов рибосом или мембран гранулярного эндоплазматического ретикулаума. Отмечали изменение в содержании аутофагических структур – аутолизосом и аутофагосом,

везикулярных структур. Структура ядра без изменений. Митохондрии имели различную форму и размеры. Так, в структуре митохондрий гепатоцитов, которые культивировали с ПЭГ-ГИАЛ в дозе 37 ЕД/мл наблюдали возрастание содержания крист и увеличение электронной плотности матрикса. В то время как при добавлении ПЭГ-ГИАЛ в дозе 75 ЕД/мл митохондрии располагались группами в клетке и в структуре имели четко очерченные границы мембран со слабо визуализированными кристами. При добавлении максимальной изучаемой дозы ПЭГ-ГИАЛ 150 ЕД/мл в гепатоцитах отмечали гетерогенность в структуре митохондрий: имели различные размеры, форму, электронную плотность и содержание крист. Признаков альтерации и деструкционных процессов митохондрий [6], которые проявляются в стойком набухании и вакуолизации, приводящие к разрывам и дестабилизации мембран, просветлением матрикса и гомогенизацией крист не наблюдали. Изменения в структуре гепатоцитов при дистрофических изменениях отражают как повреждение и нарушение их функций, так и повышенную метаболическую активность и интенсивную функцию. В исследовании [7] показано, что ведущим ультраструктурным изменением клетки является редукция белоксинтезирующих органелл, деструкция митохондриального компартмента и усиление процессов аутофагии.

Выводы: Проведенное экспериментальное исследование продемонстрировало отсутствие токсического влияния пегелированной гиалуронидазы на ультраструктурном уровне гепатоцитов во всех изучаемых дозах. Представленные в работе результаты оценки цитотоксичности ПЭГ-ГИАЛ демонстрируют, что не было выявлено повреждений клеток и нарушения в структуре компонентов. Результаты показали, что происходит активация обменных процессов в клетках, развитие процессов аутофагии, который по мнению авторов [8] является одним из основных процессов поддержания гомеостаза. Активация данного процесса, возможно, происходит в ответ на изменения метаболизма, защите клетки от образования цитотоксических компонентов, выступающий как один из механизмов адаптивного клеточного ответа.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН по теме № FWNR-2024-0005.

Effect of pegylated hyaluronidase on the ultrastructural organisation of human hepatocytes from the perspective of preclinical in vitro safety assessment

Shvetsova A.^{1, 3*}, Ershov K.^{1, 2}, Korolev M.¹, Churin A.³, Bondarenko N.¹, Bgatova N.¹, Soldatova M.¹, Madonov P.^{1, 2}

¹ *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

³ *Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia*

* *aleksa-2904@mail.ru*

Key words: Pegelated hyaluronidase; ultrastructure; cell culture; toxicity

Motivation and Aim: Medicinal preparations based on testicular hyaluronidase are actively used in various fields of medicine. A prototype of a hyaluronidase-based drug has been created, which involves per os use [1]. The new drug under development should be tested in preclinical studies, as the study of toxicity and safety is one of the necessary and key stages. The underlying mechanism of toxic action of xenobiotics is cell damage, which is manifested by the formation of disturbances in their structure or functional component, leading to death [2]. The concept of using an *in vitro* cell culture test system to assess the toxicity and pharmacological safety of drugs is currently very relevant [3]. The cellular level of organisation is the first level at which it is possible to analyse disorders in the system «interaction-structure» of subcellular components, to determine the mechanism of damaging effects [4]. The process of studying the toxic effect of a new drug under development on the culture of human hepatocytes is primarily due to their drug-induced hepatotoxicity, which is the reason for the recall of some drugs from circulation in the pharmaceutical market [5]. Undoubtedly, the primary model is *in vivo* animal experiments. However, the use of alternative models of human cell cultures is popular and allows obtaining data that subsequently contribute to reducing the number of *in vivo* experiments on laboratory animals and that are more relevant when extrapolated to the organism of *Homo sapiens*. The electron microscopy method allows visualisation of intracellular structural components. By analysing the results, it is possible to obtain an overall picture of the effect of the studied agent on cytoarchitectonics and, consequently, its toxic effects.

The aim was to analyse the ultrastructure of human hepatocyte cell culture upon exposure to pegylated hyaluronidase from the perspective of preclinical safety assessment and to establish the association of dose-effect relationship.

Methods and Algorithms: The object of the study is pegylated testicular hyaluronidase H20(PEG-GIAL) subjected to electron-beam immobilisation on polyethylene oxide Macrogol 1500 by a stream of accelerated electrons (dose 1,5 Mrad) on a pulsed linear accelerator-10 (Novosibirsk, Russia). PEG-GIAL is a lyophilised light grey powder (enzymatic activity 2800ED in 1 g of dry substance). PEG-GIAL was studied at doses of 37, 75 and 150 ED/ml.

Cell lines. Transviable culture of human liver Chanq liver cells, obtained from the cell collection of the Federal Biological Research Centre Vector, Russia. Cells were cultured on RPMI-1640 medium (Biolot, Russia) supplemented with 10 % fetal calf serum (ETC, NuClone, US Origin), 40 µg/ml gentamicin sulfate (Dalchimpharm, Russian Federation) and 2 mMol L-glutamine (ICN, USA) at 37 °C in CO₂ incubator.

The ultrastructure of human hepatocyte cell culture under PEG-GIAL exposure was evaluated by electron microscopy.

Chanq liver cells were cultured for 24 hours. The medium was removed while adding complete medium containing 1 % EFV, and PEG-GIAL was added at doses of 37 , 75 and 150 ED/ml. Cell culture was continued for 72 hours in a CO₂ incubator (temperature 37 °C). The culture medium was removed. Cells were fixed in 1 % OsO₄ solution on phosphate buffer (at pH 7,4). After fixation, dehydration process was carried out using a series of ethyl alcohol solutions of increasing concentration, then encapsulated in epon (Serva, Germany). Semi-thin sections of thickness 1 were obtained on a Leica UC7/FC7 ultratome (Germany/Switzerland). The sections were stained with toluidine blue. Cells were selected for further study on a light microscope (LEICA DME). Ultra-thin slices with a thickness of 70-100 nm were obtained. The slices were collected on copper grids for electron microscopy and contrasted with saturated aqueous solution of uranyl acetate

and lead citrate. The obtained samples were examined on the electron microscope JEM 1400 (Japan) in the Centre for Microscopic Analysis of Biological Objects of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia).

Results: In experiments on studying the effect of PEG-GIAL on the ultrastructural organisation of hepatocytes it was shown that in all studied doses some changes in cell structure were observed. At electron-microscopic study of hepatocytes, when cultured with PEG-GIAL in all studied doses, a significant increase in the content and size of microvilli on the cell membrane was observed, which can be interpreted as an increase in metabolic activity. The cytoplasmic membrane had no disturbances of integrity and fragmentation. Under conditions of cultivation with PEG-GIAL, no decrease in the saturation of cells with organelles was observed. PEG-GIAL at all doses leads to an increase in the content of cell protein synthesis structures – free polysomal complexes of ribosomes or membranes of granular endoplasmic reticulum. Changes in the content of autophagic structures – autolysosomes and autophagosomes, vesicular structures were noted. The structure of the nucleus was unchanged. Mitochondria had different shape and sizes. Thus, in the structure of mitochondria of hepatocytes, which were cultured with PEG-GIAL at a dose of 37 ED/ml, an increase in the content of cristae and an increase in the electron density of the matrix were observed. Whereas, when PEG-GIAL was added at a dose of 75 ED/ml, mitochondria were arranged in groups in the cell and in the structure had well-defined membrane boundaries with poorly visualised cristae. When the maximum studied dose of PEG-GIAL 150ED/ml was added to hepatocytes, heterogeneity in the structure of mitochondria was observed: they had different sizes, shape, electron density and cristae content. No signs of alteration and destructive processes of mitochondria [6], which are manifested in persistent swelling and vacuolisation, leading to ruptures and destabilisation of membranes, matrix luminescence and homogenisation of cristae were observed. Changes in the structure of hepatocytes at dystrophic changes reflect both damage and disturbance of their functions, and increased metabolic activity and intensive function. The study [7] shows that the leading ultrastructural change of the cell is the reduction of protein synthesising organelles, destruction of the mitochondrial compartment and enhancement of autophagy processes.

Conclusion: The conducted experimental study demonstrated the absence of toxic effect of pegylated hyaluronidase on the ultrastructural level of hepatocytes at all studied doses. The results of PEG-GIAL cytotoxicity evaluation presented in the work demonstrate that no cell damage and disruption in the structure of components were detected. The results showed that there is an activation of metabolic processes in cells, development of autophagy processes, which according to the authors [8] is one of the main processes of homeostasis maintenance. Activation of this process probably occurs in response to changes in metabolism, protecting the cell from the formation of cytotoxic components, acting as one of the mechanisms of adaptive cellular response.

Funding: The study was carried out within the framework of the state assignment of NIIKEL – Branch of FGBNU FIC ICiG SB RAS under the project No. FWNR-2024-0005.

Список литературы/References

1. Швецова А.М., Ершов К.И., Королев М.А., Мадонов П.Г., Трубина Л.В. Способ иммобилизации гиалуронидазы для получения пероральной лекарственной формы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2024;44(2):73-79. doi 10.18699/SSMJ20240209

- [Shvetsova A.M., Ershov K.I., Korolev M.A., Madonov P.G., Trubina L.V. Method of hyaluronidase immobilization to produce an oral dosage form. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(2):73-79. doi 10.18699/SSMJ2024020 (in Russian)]
2. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Наука, 2002
[Kutsenko S.A. Fundamentals of toxicology. SPb.: Nauka, 2002 (in Russian)]
 3. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2012;2:22-31
[Danchenko E.O. Evaluation of cytotoxicity of pharmaceutical substances using cell cultures. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2012;2:22-31 (in Russian)]
 4. Мазеркина И.А. Оценка лекарственной гепатотоксичности *in vitro* на клеточных моделях (обзор). *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):131-144. doi 10.30895/2312-7821-2023-11-2-351
[Mazerkina I.A. In vitro assessment of drug-induced liver injury using cell-based models: a review. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):131-144. doi 10.30895/2312-7821-2023-11-2-351 (in Russian)]
 5. Onakpoya I.J., Heneghan C.J., Aronson J.K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med*. 2016;4(14):10. doi 10.1186/s12916-016-0553-2
 6. Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Ермола Ю.А. и др. Ультраструктурные особенности компонентов аэрогематического барьера легких при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1.2):180-185. doi 10.14300/mnnc.2019.14010
[Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Ermola Yu.A. et al. Ultrastructural features of the components of aerogematic lung barrier at fibro-cavernous tuberculosis. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1.2):180-185. doi 10.14300/mnnc.2019.14010 (in Russian)]
 7. Постникова О.А. Структурный анализ взаимодействия гепатоцитов, эндотелиоцитов и звездчатых клеток печени при вибрационном и вирусном взаимодействиях. Автореф. дис. докт. биол. наук. Новосибирск, 2012
[Postnikova O.A. Structural analysis of interaction of hepatocytes, endotheliocytes and stellate cells of the liver at vibration and viral interactions. Abstract of thesis ... doct. biol. sci. Novosibirsk, 2012 (in Russian)]
 8. Пупышев А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты. *Цитология*. 2014;56(3):179-196
[Pupyshev A.B. Reparative autophagy and autophagic cell death. Functional and regulatory aspects. *Cytology*. 2014;56(3):179-196 (in Russian)]