

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

¹Ширяева А.И., ²Косякова К.Г., ¹Сидоров С.П., ¹Фатеев И.В., ¹Кузьмин А.А.

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины» Министерства обороны Российской Федерации
195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени
И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

Резюме.

Актуальным направлением развития современной токсикологии является внедрение клеточных технологий в практику экспериментальных исследований. В связи с этим нами был проведен анализ современных данных и рассмотрена история развития методов культивирования клеток и тканей человека и животных для создания универсальных моделей для изучения различных видов воздействия на клетки. В статье представлены основные достоинства и недостатки первичных и перевиваемых клеточных культур, описаны достижения в создании трехмерных моделей тканей, включая *organ-on-a-chip* (орган-на-чипе), а также математических моделей для изучения реакции на уровне тканей. Описаны основные направления валидации токсикологических исследований с применением культур клеток, подчеркнуты ограничения их применения вследствие особых требований к испытуемым веществам.

Ключевые слова: токсикология *in vitro*, клеточные культуры, орган-на-чипе, биологическая модель, цитотоксичность.

MEDLINE.RU, ТОМ 20, КЛИНИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 15 МАРТА 2019

CELL CULTURES AS A PROMISING BIOLOGICAL MODEL IN TOXICOLOGICAL RESEARCH

¹Shiryaeva A.I., ²Kosyakova K.G., ¹Sidorov S.P., ¹Fateev I.V., ¹Kuzmin A.A.

¹State Scientific-Research Institute of Military Medicine under the Ministry of Defence of the Russian Federation

195043, Saint-Petersburg, Lesoparkovaya str., 4

²State Budget Institution of Higher Education North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov under the Ministry of Public Health of the Russian Federation

191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41

Abstract.

The actual direction of development of modern toxicology is the introduction of cellular technologies in the practice of experimental research. In this regard, the analysis of current data has been carried out and the history of the development of the cell culture method of tissues and organs of animals and humans as universal models for studying various types of cell effects has been considered. This article describes the main advantages and disadvantages of primary and continuous cell cultures, the achievements in creating three-dimensional tissue models, including organ-on-a-chip (organ-on-chip), as well as mathematical models for studying the reaction at the tissue level. The main directions of validation of toxicological studies using cell cultures are described, the limitations of their use due to the special requirements for the tested substances are emphasized.

Key words: toxicology *in vitro*, cell cultures, organ-on-a-chip, biological model, cytotoxicity.

Введение

В настоящее время общепринятой тенденцией является сокращение количества или полный отказ от использования лабораторных животных при проведении токсикологических исследований с переходом на альтернативные биологические модели [1]. Исследования *in vitro* позволяют значительно сократить количество испытаний на животных, что решает многие вопросы как экономического, так и этического характера. Кроме того, появляется практическая возможность оценить эффекты токсического вещества на клеточном и молекулярном уровнях, тогда как при тестировании на животных наблюдаются не только специфические реакции, но и общий патофизиологический ответ целого организма. Оптимальными моделями для таких исследований являются культуры клеток. Использование клеточных линий в качестве биологических моделей позволяет значительно снизить стоимость и сократить время предварительного исследования токсических веществ [2].

Историческая справка. Техника культуры ткани была впервые задумана и разработана в начале двадцатого века для изучения свойств животных клеток, свободных от системных влияний, возникающих *in vivo* как при нормальном гомеостазе, так и в условиях стресса, вызванного экспериментом [3, 4]. Эту технологию первоначально разрабатывали для незагрегированных фрагментов тканей, рост культуры при этом был ограничен возможностью миграции клеток из кусочка ткани и нерегулярностью митозов в первичном разрастании. Впервые возможность дезагрегации клеток с последующим выращиванием в чашках была показана Роусом в 1916 году, хотя в то время чаще всего пересев культуры для создания клеточного штамма осуществляли путем оперативного деления ее фрагмента [5]. С тех пор технология производства клеточных культур значительно усовершенствовалась и позволила создавать клеточные культуры разных видов и в любом количестве, что сделало возможным скрининговое тестирование токсичности веществ на уровне тканей, органов и целого организма [6, 7].

Характеристика культур клеток по происхождению. В настоящее время основу современной лабораторной и производственной практики составляют два вида тканевых и клеточных культур: монослойные и суспензионные. В свою очередь монослойные культуры подразделяются на *первичные* и *перевиваемые*. *Первичные* клетки, по сравнению с перевиваемыми, имеют более короткую жизнь в культуре и могут в течение нескольких часов возвращаться к недифференцированному состоянию, однако они лучше представляют клеточные и тканеспецифические изменения *in vivo* [8]. В рамках программы ToxCast Агентство США по охране окружающей среды EPA провело тестирование более тысячи химических веществ на первичных культурах клеток:

фибробласты, кератиноциты, мононуклециты, бронхиальный эпителий, клетки гладкой мускулатуры коронарных артерий и др. После группировки химических веществ по биоактивному профилю были сделаны выводы о некоторых механизмах токсичности химических веществ [9-11]. Следует отметить, что для этого, как и других подобных тестов, на данный момент всё ещё отсутствует стандарт, с помощью которого можно достоверно экстраполировать результаты эксперимента на живой организм [12, 13].

Несомненным достижением в развитии первичных клеточных культур является создание трехмерных клеточных линий. Такие системы подходят для оценки токсичности химических веществ больше обычных монослойных культур, так как лучше моделируют микроокружение тканей и поддерживают функцию в течение относительно длительного периода (1–3 дня). В настоящее время разрабатываются трехмерные культуры с добавочными ко-факторами для преодоления недостатков традиционных монослойных систем. Они могут быть использованы для изучения индукции или ингибирования ферментов, восстановления клеточной полярности, которая теряется в однослойных культурах [14].

Перевиваемые линии клеток получают из здоровых и опухолевых тканей. Преимущества перед первичными клетками состоят в том, что их не нужно выделять для каждого использования, относительно легко поддерживать и размножать в любом количестве, они стабильны, могут быть легко заморожены и разделены между лабораториями. Крупномасштабное исследование показывает, что наличие генетически разнообразных перевиваемых клеточных линий человека открывает возможности исследовать вариабельность механизмов токсичности веществ на уровне человеческих популяций [15]. Однако следует отметить, что перевиваемые клеточные линии имеют ряд недостатков. Они склонны к утрате естественных свойств и функций, могут изменять клеточную полярность, склонны к контаминации как внутриклеточными паразитами, так и другими клеточными линиями, такими как, например, HeLa и HepG2 [16]. Все это может приводить к некорректной оценке воздействия тестируемых химических веществ. Было проведено исследование с использованием интегрированного респираторного анализа для скрининга библиотеки ToxCast Phase II на наличие митохондриальных токсикантов в первичных культурах проксимальных канальцев почки (RPTC). Затем эти результаты сравнивали с перевиваемыми эпителиальными клетками почек человека (HK2). В результате было обнаружено, что первичные клетки RPTC способны идентифицировать 73% потенциально токсичных веществ, тогда как перевиваемые клеточные линии HK-2 идентифицировали только 10% исследуемых веществ [17]. Поскольку перевиваемые

клеточные линии не могут полноценно представлять клетки здоровых тканей, были разработаны альтернативные подходы к перевиванию этих клеток [18, 19].

В настоящее время ведутся исследования по разработке тест-систем на основе *стволовых* клеток для токсикологических исследований [20]. Например, в качестве альтернативы тесту на токсичность на ранних этапах развития на базе стволовых клеток была создана культура из сердечных и нервных клеток мыши (ESTc и ESTn, соответственно) [21]. Применение плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) имеет ряд преимуществ перед первичными клеточными культурами, а именно: они являются нормальными первичными линиями клеток, способны к неограниченному делению и обновлению популяции, а под влиянием различных индукторов могут дифференцироваться в любой тип клеток, что позволяет создавать банки клеток, которые по мере необходимости могут использоваться в различных исследованиях [22]. Однако могут возникать сложности при их культивировании и трансфекции, так как работа со стволовыми клетками требует определенных навыков и доступна далеко не в каждой научно-исследовательской лаборатории, а отсутствие систематических подходов и стандартизации практики культивирования является препятствием для использования стволовых клеток в целях токсикологического тестирования. К тому же, исследования с эмбриональными клетками человека затрагивают этические проблемы в части касающейся их получения и применения. Несмотря на присущие им ограничения, применение iPSC все же является перспективным методом исследований биологических процессов на клеточном и молекулярном уровнях и играет существенную роль в оценке токсичности веществ [23].

Моделирование реакций культуры клеток на уровне тканей. В настоящее время неоспоримым достижением являются разработки *трехмерных моделей тканей* и *математических моделей* для моделирования реакций на тканевом и органном уровне. Такие модели представляют собой специфический тип трехмерной культуры клеток, в котором они организованы таким образом, что имитируют, по крайней мере, частично, ткани *in vivo* и, следовательно, воспроизводят некоторые физиологические реакции *in vivo*. В качестве моделей для тестирования раздражителей кожи были разработаны и подтверждены органотипические модели кожи, такие как SkinEthic, EpiDerm, EPISKIN, содержащие кератиноциты и фибробласты человека [24]. Среди других органотипических моделей стоит упомянуть модель сетчатки глаза, легочного эпителия, ткани печени и нервной системы [25].

Активно ведутся разработки моделей *organ-on-a-chip* (орган-на-чипе), представляющих собой трехмерную культуру, выращенную в многоканальном устройстве

[26]. Предполагается, что модели должны иметь те же функции, что и органотипические культуры, но при этом обладать способностью к манипулированию физиологическими и фармакокинетическими процессами. К настоящему моменту разработаны модели «орган-на-чипе» для печени, сердца, легких, кишечника и почек [27]. Также была разработана высоко функциональная микрофлюидная многокомпонентная система «орган-на-чипе», состоящая из органоидов печени, сердца и легких. Такая система может моделировать аспекты взаимодействия тканей и фармакокинетики *in vivo* [28]. Микросистемы, состоящие из нескольких синтетических органов, находятся в настоящий момент на стадиях разработки, и некоторые организации проводят исследования для подтверждения корреляции этих моделей с наблюдениями *in vivo*. Например, Национальный центр продвижения прикладных наук прилагает ряд усилий в этой области (NCATS 2016), а финансируемые Европейским союзом инициативы (EU 2015) изучают использование печеночных чипов для прогнозирования побочных эффектов лекарств. Модели organ-on-a-chip перспективны, но пока не готовы для включения в рутинную практику [29].

Достоинства и недостатки применения метода клеточных культур. Несмотря на колоссальные успехи, достигнутые в разработках и применении клеточных культур в современной медицинской деятельности и научных исследованиях, этот метод имеет ряд важных ограничений (таблица 1).

Кроме того, перенесение клеток целостного организма в условия жизни *in vitro* прекращает существование их как структурного элемента ткани или органа, в состав которых они ранее входили. В результате недостатка клеточной гетерогенности и трехмерной архитектуры тканей, характерной для клеток *in vivo*, в культуре редуцированы межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия. Также клетки выходят из-под контроля нейрогуморальных факторов и приобретают ряд особенностей, зависящих как от самого факта отторжения клеток от этих тканей, так и от конкретных условий их существования *in vitro*. Живущие вне организма клетки или ткани характеризуются целым комплексом метаболических, морфологических и генетических черт, резко отличных от свойств клеток органов и тканей *in vivo*. Обеспечение соответствующего окружения, включая адгезию к субстрату, концентрацию питательных веществ, гормонов или факторов роста, а также межклеточного взаимодействия являются основополагающими условиями проявления специализированных функций клеток.

Ограничения применения метода клеточных культур [30].

Категория	Примеры
Необходимость наличия специальных навыков	Стерильность манипуляций Химические загрязнения Микробное загрязнение Перекрестное загрязнение
Контроль окружающей среды	Рабочее место Культивирование, контроль pH Предотвращение биозагрязнения окружающей среды и утилизация отходов
Объем расходов и стоимость	Основное оборудование для производства Среды, сыворотки Одноразовое пластиковое оборудование и расходные материалы
Фенотипическая нестабильность	Обратная дифференцировка Адаптация
Генетическая нестабильность	Разнородность, изменчивость
Идентификация типов клеток	Маркеры не всегда экспрессированы Сложности восстановления гистологической принадлежности, атипичности клеток Геометрия пространства и микроокружение изменяют цитологию

Теоретически обосновано и экспериментально показано, что существующие тест-системы *in vitro* оценивают только химические вещества, обладающие определенными свойствами: химические вещества, как правило, должны растворяться в диметилсульфоксиде, иметь низкую летучесть, отвечать ограничениям молекулярной массы и быть доступными в достаточно большом количестве и чистоте.

Многообразие линий клеток, высокая вероятность контаминации микроорганизмами и клетками других линий, наличие туморогенных и онкогенных свойств клеток делают культуры клеток небезопасными, что требует обязательного контроля клеток для получения адекватных результатов исследования или производства безопасного продукта. Основой успешного развития токсикологических исследований с использованием культивируемых клеток является требование подтверждения их

истинности (валидации) [31]. В промышленных условиях в юридические обязанности производителя входит то, что окончательный продукт должен быть принят органами по контролю качества медицинских и иммунобиологических препаратов, такими как Федеральное управление по контролю продуктов и лекарственных средств (FDA), Национальный институт клинических исследований (NICE), и подтвержден паспортом клеточной линии. Однако в научно-исследовательских лабораториях требования могут быть менее жесткими и обязательства по использованию клеточных линий ложатся на совесть исследователей. Несмотря на это, использование клеточных линий, не прошедших валидацию, снижает ценность результатов и возможность повторения их другими исследователями.

Заключение

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о высоком потенциале и научно-практической ценности применения метода клеточных культур для проведения токсикологических исследований. Целесообразным представляется определение спектра типов клеток, необходимых для проведения оценки токсичности. Разработка тестов должна быть скоординирована с разработкой вычислительных моделей клеточных ответов (*in silico*), связанных с нарушениями путей токсичности, для более глубокого понимания вариантов зависимости доза-реакция на клеточном уровне. Даже самые выгодные с экономической и этической точек зрения методы исследования *in vitro* не могут дать достоверной информации о влиянии того или иного вещества на многоклеточный организм без исследований на живых организмах, однако использование клеточных культур для измерения потенциально неблагоприятных эффектов на человеческий организм может быть легко переведено в формат высокопродуктивного скрининга токсических веществ.

Список литературы

1. ГОСТ 31891-2012. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение принципов GLP к исследованиям *in vitro*. - Введ. 2013-01-01. – М.: Стандартиформ, 2013. – 12 с.
2. Романова М.А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / М.А. Романова, А.Ш. Додонова // Молодой учёный. – 2016. – №18 (22). – С.110-113.
3. Harrison R. G. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4: 140-143.

4. Carel, A. 1912. On the permanent lift of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* 15: 516-528.
5. Rous, P., Jones F.S. 1916. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J. Exp. Med.* 23(4): 549-555.
6. Astashkina A., Mann B., Grainger D.W. 2012. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacol. Ther.* 134(1): 82-106.
7. Zhang, Z., N. Guan, T. Li, D.E. Mais, and M. Wang. 2012a. Quality control of cell-based high-throughput drug screening. *Acta. Pharma. Sin. B* 2(5): 429-438.
8. Bhogal, N., C. Grindon, R. Combes, and M. Balls. 2005. Toxicity testing: Creating a revolution based on new technologies. *Trends Biotechnol.* 26(6): 299-307.
9. Sharma, P., D.M. Ando, A. Daub, J.A. Kaye, and S. Finkbeiner. 2012. High-throughput screening in primary neurons. *Methods Enzymol.* 506:331-360.
10. Berg, E.L., M.A. Polokoff, A. O'Mahony, D. Nguyen, and X. Li. 2015. Elucidating mechanisms of toxicity using phenotypic data from primary human cell systems a chemical biology approach for thrombosis-related side effects. *Int. J. Mol. Sci.* 16(1): 1008-1029.
11. David J. Dix, Keith A. Houck, Matthew T. Martin, Ann M. Richard, R. Woodrow Setzer, Robert J. Kavlock, The ToxCast Program for Prioritizing Toxicity Testing of Environmental Chemicals, *Toxicological Sciences*, Volume 95, Issue 1, January 2007, Pages 5–12
12. Houck, K.A., D.J. Dix, R.S. Judson, R.J. Kavlock, J. Yang, and E.L. Berg. 2009. Profiling bioactivity of the ToxCast chemical library using BioMAP primary human cell systems. *J. Biomol. Screen* 14(9): 1054-1066.
13. Kleinstreuer, N.C., J. Yang, E.L. Berg, T.B. Knudsen, A.M. Richard, M.T. Martin, D.M. Reif, R.S. Judson, M. Polokoff, D.J. Dix, R.J. Kavlock, and K.A. Houck. 2014. Phenotypic screening of the ToxCast chemical library to classify toxic and therapeutic mechanisms. *Nat. Biotechnol.* 32(6):583-591.
14. Soldatow, V.Y., E.L. Lecluyse, L.G. Griffith, and I. Rusyn. 2013. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res. (Camb)*. 2(1): 23-39.
15. Abdo, N., M. Xia, C.C. Brown, O. Kosyk, R. Huang, S. Sakamuru, Y.H. Zhou, J.R. Jack, P. Gallins, K. Xia, Y. Li, W.A. Chiu, A.A. Motsinger-Reif, C.P. Austin, R.R. Tice, I. Rusyn, and F.A. Wright. 2015. Population-based in vitro hazard and concentration-response assessment of chemicals: The 1000 genomes high-throughput screening study. *Environ. Health Perspect.* 123(5): 458-466.

16. Yamasaki, K., S. Kawasaki, R.D. Young, H. Fukuoka, H. Tanioka, M. Nakatsukasa, A.J. Quantock, and S. Kinoshita. 2007. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(2): 604-613.
17. Wills, L.P., G.C. Beeson, D.B. Hoover, R.G. Schnellmann, and C.C. Beeson. 2015. Assessment of ToxCast Phase II for mitochondrial liabilities using a high-throughput-respirometric assay. *Toxicol Sci.* 146(2): 226-234.
18. Liu, J., K. Mansouri, R.S. Judson, M.T. Martin, H. Hong, M. Chen, X. Xu, R.S. Thomas, and I. Shah. 2015. Predicting hepatotoxicity using ToxCast in vitro bioactivity and chemical structure. *Chem. Res. Toxicol.* 28(4): 738-751.
19. Подчерняева Р.Я., Суетина И. А., Михайлова Г. Р., Лопатина О. А., Бобринецкий И. И., Морозов Р. А., Селезнев А. С. Культивирование перевиваемых клеточных линий на подложках из углеродных нанотрубок и влияние электростимуляции на пролиферацию клеток // Вопросы вирусологии. 2012. №5.
20. Romero, A.C., E. Del Río, E. Vilanova, and M.A. Sogorb. 2015. RNA transcripts for the quantification of differentiation allow marked improvements in the performance of embryonic stem cell test (EST). *Toxicol. Lett.* 238(3): 60- 69.
21. Tonk, E.C., J.F. Robinson, A. Verhoef, P.T. Theunissen, J.L. Pennings, and A.H. Piersma. 2013. Valproic acid-induced gene expression responses in rat whole embryo culture and comparison across in vitro developmental and non- developmental models. *Reprod. Toxicol.* 41:57-66.
22. Hung S. S., Khan S., Lo C. Y., Hewitt A. W., Wong R. C. 2017. Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases. *Pharmacol. Therapeutics.* 177 : 32—43.
23. Мележникова О.Н., Домнина П.А., Горячая Т.С., Петросян М.А. Клеточные технологии в фармакологических исследованиях. Настоящее и будущее./ Цитология 2018. Т 60, №9, с. 673-678.
24. Varani, J., P. Perone, D.M. Spahlinger, L.M. Singer, K.L. Diegel, W.F. Bobrowski, and R. Dunstan. 2007. Human skin in organ culture and human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) in monolayer culture for assessment of chemically induced skin damage. *Toxicol. Pathol.* 35(5): 693- 701.
25. Dickreuter, E., Vehlow, A. & Cordes, N. *Biospektrum* (2015) 21: 397. <https://doi.org/10.1007/s12268-015-0593-8>
26. Esch, E.W., A. Bahinski, and D. Huh. 2015. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:248-260.

27. Wang, Gang et al. “Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies”*Nature medicine* vol. 20,6 (2014): 616-23.

28. Skardal A., Sean V. Murphy, M. Devarasetty, I. Mead, Hyun-Wook Kang, Young-Joon Seol et al. 2017 Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Scientific Reports* 7 Article number: 8837

29. Sakolish, C. M., Esch, M. B., Hickman, J. J., Shuler, M. L. & Mahler, G. J. Modeling Barrier Tissues In Vitro: Methods, Achievements, and Challenges. *EBioMedicine* 5, 30–39, doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.023 (2016)

30. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство/пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2018.-691с.

31. ОФС.1.7.2.0011.15 «Требования к клеточным культурам-субстратам»