

Ультроструктурная оценка гепатотоксических эффектов пегилированной гиалуронидазы в экспериментах *in vitro*

А.М. Швецова¹, М.А. Королев¹, А.А. Чурин², Н.А. Бондаренко¹, Н.П. Богатова¹,
К.И. Ершов^{1,3}, П.Г. Мадонов^{1,3}, Ю.Р. Равилова³, С.В. Мишенина³

¹Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

²НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Препараты тестикулярной гиалуронидазы имеют широкое применение в медицинской практике. Модификация нативных биологически активных молекул путем электронно-лучевого пегилирования позволяет усовершенствовать их фармакокинетические свойства, что обуславливает последующее улучшение фармакодинамических эффектов. Создание оригинального перорального лекарственного средства с фармакологически активным ядром, в качестве которого выступает гиалуронидаза, представляется перспективным, однако требует изучения безопасности применения на доклиническом этапе.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я . Ультроструктурная оценка гепатотоксических эффектов пегилированной гиалуронидазы *in vitro*.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Объект исследования – пегилированная на полиэтиленоксиде посредством электронно-лучевого синтеза тестикулярная гиалуронидаза (ПЭГ-ГИАЛ). Культуральная среда – перевиваемая культура клеток печени человека Chanq liver. Оценка цитотоксического действия проводили с помощью МТТ-теста. Ультроструктурные изменения оценивали методом электронной микроскопии.

Р е з у л ь т а т ы . Разрабатываемое оригинальное лекарственное средство ПЭГ-ГИАЛ в изучаемых концентрациях 37, 75 и 150 ЕД/мл не оказывает цитотоксического воздействия на культуру клеток печени человека (гепатоциты). Жизнеспособность клеток находится практически на уровне контроля при воздействии ПЭГ-ГИАЛ в концентрациях 37 и 75 ЕД/мл, а под влиянием максимальной концентрации 150 ЕД/мл статистически значимо стимулируется пролиферация клеток, о чем свидетельствует повышение их жизнеспособности до 106 %. Результаты оценки ультроструктурных изменений гепатоцитов показали, что воздействие ПЭГ-ГИАЛ во всех концентрациях приводит к усилению обменных процессов в клетках, развитию аутофагии, которая является одним из основных гомеостатических процессов.

З а к л ю ч е н и е . Исследуемое лекарственное средство ПЭГ-ГИАЛ во всех изучаемых концентрациях не оказывает токсического воздействия на культуру гепатоцитов человека. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшем исследовании при разработке ПЭГ-ГИАЛ.

Ключевые слова: гиалуронидаза, пегилирование, цитотоксичность, культура клеток печени человека.

Образец цитирования: Швецова А.М., Королев М.А., Чурин А.А., Бондаренко Н.А., Богатова Н.П., Ершов К.И., Мадонов П.Г., Равилова Ю.Р., Мишенина С.В. Ультроструктурная оценка гепатотоксических эффектов пегилированной гиалуронидазы в экспериментах *in vitro* // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):51-61. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-51-61

Поступила в редакцию 26.03.2024
Прошла рецензирование 13.05.2024
Принята к публикации 30.05.2024

Автор, ответственный за переписку
Швецова Александра Михайловна: НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН. 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
E-mail: aleksa-2904@mail.ru

Received 26.03.2024
Revised 13.05.2024
Accepted 30.05.2024

Corresponding author
Shvetsova Alexandra M.: Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2, Timakova str., Novosibirsk, 630060, Russia.
E-mail: aleksa-2904@mail.ru

Ultrastructural evaluation of hepatotoxic effects of PEGylated hyaluronidase *in vitro*

A.M. Shvetsova¹, M.A. Korolev¹, A.A. Churin², N.A. Bondarenko¹, N.P. Bgatova¹, K.I. Ershov^{1,3}, P.G. Madonov^{1,3}, Yu.R. Ravilova³, S.V. Mishenina³

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

²Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

³Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Testicular hyaluronidase preparations are widely used in medical practice. Modification of native biologically active molecules by electron beam PEGylation allows to improve their pharmacokinetic properties, which determines a subsequent improvement of pharmacodynamic effects. The development of an original oral drug with a pharmacologically active core, which is hyaluronidase, is promising, but requires studying the safety of use at the pre-clinical stage.

A i m . Ultrastructural evaluation of hepatotoxic effects of PEGylated hyaluronidase *in vitro*.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The object of a study was testicular hyaluronidase PEGylated on polyethylene oxide (PEG-HYAL) using electron beam synthesis. The culture medium is a continuous culture of human liver cells Chang liver. The cytotoxic effect was detected by the MTT assay. Ultrastructural changes were evaluated by electron microscopy.

R e s u l t s . The original drug PEG-HYAL in the studied concentrations of 37, 75 and 150 U/ml has no cytotoxic effect on the human liver cell culture (hepatocytes). Cell viability is virtually at the control level when PEG-HYAL administration at concentrations of 37 and 75 U/ml, and in the maximum concentration of 150 U/ml, cell proliferation is stimulated significantly, as evidenced by an increase in cell viability up to 106%. The results of evaluation of ultrastructural changes in hepatocytes showed that exposure to PEG-HYAL in all concentrations leads to the enhancement of metabolic processes in cells, development of autophagy, which is one of the main homeostatic processes.

C o n c l u s i o n . The drug PEG-HYAL in all studied concentrations has no toxic effect on the human hepatocyte culture. The results obtained can be used in further research in the development of PEG-HYAL.

Keywords: hyaluronidase, PEGylation, cytotoxicity, human liver cell culture.

Citation example: Shvetsova A.M., Korolev M.A., Churin A.A., Bondarenko N.A., Bgatova N.P., Ershov K.I., Madonov P.G., Ravilova Yu.R., Mishenina S.V. Ultrastructural evaluation of hepatotoxic effects of PEGylated hyaluronidase *in vitro*. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):51-61. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-51-61

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуронидаза является ферментом, который расщепляет гиалуроновую кислоту. При создании лекарственных препаратов энзимы проявляют ряд недостатков, среди которых низкая стабильность и биодоступность, повышенная способность вызывать различные аллергические реакции, в том числе со стороны иммунной системы. Обширные показания к применению препаратов на основе тестикулярной гиалуронидазы позволяют успешно использовать их в различных областях медицины на протяжении нескольких десятков лет. Однако многолетний опыт использования препаратов гиалуронидазы в качестве перспективного средства для лечения

INTRODUCTION

Hyaluronidase is an enzyme that breaks down hyaluronic acid. When developing drugs, enzymes show several disadvantages, including low stability and bioavailability, increased ability to cause various allergic reactions, in particular from the immune system. A wide range of indications for the use of testicular hyaluronidase preparations allows their successful use in various fields of medicine for several decades. However, many years of experience in using hyaluronidase preparations as a promising drug for the treatment of several diseases has a disadvantage – lack of their oral forms because of low bioavailability in this route of administration. By modifying the active substance on a polymeric carrier by

ряда заболеваний имеет и недостаток – отсутствие у них пероральных форм ввиду низкой биодоступности при данном способе приема. Путем модификации активного вещества на полимерном носителе посредством электронно-лучевого воздействия можно получить конъюгат с устраненными негативными свойствами [1, 2]. Создание оригинального перорального лекарственного средства с фармакологически активным ядром, в качестве которого выступает гиалуронидаза, иммобилизованная на полиэтиленгликоле с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, представляется нам весьма перспективным и требует изучения безопасности применения на доклиническом этапе [3].

Оценка токсичности лекарственных препаратов является неотъемлемой частью регистрационного досье, в частности цитотоксичность представляет собой отдельный этап при разработке нового лекарственного средства [4]. Анализ риска развития гепатотоксичности является важной составляющей доклинических исследований. Наиболее часто развитие нежелательных реакций со стороны органов желудочно-кишечного тракта при применении лекарств происходят именно в печени. Лекарственная гепатотоксичность выступает главенствующей из причин изъятия и отзыва препаратов [5]. В связи с тем, что печень – основной орган детоксикации и метаболических процессов, культуру клеток гепатоцитов можно использовать в качестве модели для токсикологических исследований лекарственных средств [6]. На доклиническом этапе исследования перспективным является проведение экспериментов именно на клеточных культурах. Клетки – первый уровень организации жизни, на котором можно провести оценку нарушений структуры внутриклеточных структурных компонентов, их взаимодействий, что в конечном итоге даст картину механизма повреждающего действия. Оценка цитотоксичности чаще всего используется в качестве скрининга для определения собственной токсичности вещества [7]. Эксперименты *in vitro* обладают рядом преимуществ наряду с простотой проведения, низкой стоимостью и большим запасом материала, что в последующем позволяет сократить численность экспериментов в ходе доклинических испытаний *in vivo*. Кроме того, исследование цитотоксичности на лабораторных животных *in vivo* бывают нерелевантны ввиду видоспецифичных различий с человеком [8].

electron beam exposure, a conjugate with eliminated negative properties can be obtained [1, 2]. Developing an original oral drug with a pharmacologically active core, which is hyaluronidase immobilized on polyethylene glycol (PEG) using electron beam synthesis technology, seems to us very promising and requires studying the safety of use at the preclinical stage [3].

Evaluation of drug toxicity is an integral part of the registration dossier, in particular, cytotoxicity assessment represents a separate stage in the development of a new drug [4]. Analysis of the risk of hepatotoxicity is an important part of preclinical studies. The most frequent of gastrointestinal adverse drug reactions occurs in the liver. Drug hepatotoxicity is the main reason for withdrawal and recall of drugs [5]. Because the liver is the main organ orchestrating the detoxification and metabolic processes, hepatocyte cell culture can be used as a model for toxicological studies of drugs [6]. At the preclinical stage of research, it is promising to conduct experiments on cell cultures. Cells are the first level of life organization, at which it is possible to assess the disorders in the structure of intracellular components, their interactions, which will finally reveal the mechanism of damage. Cytotoxicity assessment is most often used as screening to determine the proper toxicity of a substance [7]. *In vitro* experiments have several advantages along with ease of conducting, low cost and large stock of material, which subsequently allows for a reduction in the number of experiments during *in vivo* preclinical experiments. In addition, *in vivo* cytotoxicity studies on laboratory animals are not relevant because of species-specific differences with humans [8].

AIM OF THE RESEARCH

To evaluate *in vitro* experiments on human cell culture (hepatocytes) the possible cytotoxic effect of PEGylated hyaluronidase as an original drug.

MATERIALS AND METHODS

Object of the research. Hyaluronate-endo- β -N-acetylhexosaminidase subjected to electron beam immobilization on a polymer carrier polyethylene oxide Macrogol-1500 (PEG-HYAL) by accelerated electron flow at a dose of 1.5 Mrad, which is created by a pulsed linear accelerator ILU-10 (Budker Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk, Russia). PEG-HYAL was manufactured at the Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology, JSC (Novosibirsk, Russia) and was kindly provided as part of scientific cooperation. PEG-HYAL was studied at concentrations of 37, 75 and 150 U/ml. These dosages, simulating the presence of PEG-HYAL in the

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить в экспериментах *in vitro* на культуре гепатоцитов человека возможное цитотоксическое действие пегилированной гиалуронидазы, рассматриваемой в качестве оригинального лекарственного средства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидаза, подвергнутая электронно-лучевой иммобилизации на полимерном носителе полиэтиленоксиде Макрогол-1500 (ПЭГ-ГИАЛ) потоком ускоренных электронов в дозе 1.5 Мрад, который создается импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия). ПЭГ-ГИАЛ изготовлена в АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск, Россия) и любезно предоставлена в рамках научного сотрудничества. ПЭГ-ГИАЛ изучали в концентрациях 37, 75 и 150 ЕД/мл. Данные дозировки, моделирующие нахождение ПЭГ-ГИАЛ в системном кровотоке, были рассчитаны с учетом объема циркулирующей крови лабораторных мышей. Степень чистоты препаратов > 97% (измерялась на жидкостном хроматографе Ackta Purifier 100, GE Healthcare).

Культура клеток. В эксперименте использовали перевиваемую культуру клеток печени человека Chanq liver (ФГБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия). Клетки печени Chanq liver культивировали в питательной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, US Origin), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (ОАО «Дальхимфарм», Россия) и 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя.

Исследование цитотоксичности. Эксперименты по изучению и оценке цитотоксичности проводили с использованием двух методов:

MTT-тест – данный метод позволяет определить жизнеспособность клеток. Основан на том, что живые и метаболически активные клетки с помощью митохондриальных дегидрогеназ преобразовывают желтую растворимую соль тетразолия (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия) и восстанавливают ее до фиолетовых нерастворимых кристаллов формазана. При лизисе клеток кристаллы формазана легко переходят в раствор органических растворите-

systemic circulation, were calculated taking into account the volume of circulating blood of laboratory mice. Pharmaceutical grade > 97% (measured using an Ackta Purifier 100 liquid chromatograph, GE Healthcare).

Cell culture. In the experiments, a continuous culture of human liver cells Chanq liver (State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Russia) was used. Chanq liver cells were cultured in a RPMI-1640 medium (BioloT, LLC, Russia) with the addition of 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, US Origin), 40 µg/ml gentamicin sulfate (Dalkhimpharm, JSC, Russia) and 2 mmol L-glutamine (ICN, USA) in a CO₂ incubator at 37°C and 5% CO₂ until a confluent monolayer is formed.

Cytotoxicity study. Experiments to study and evaluate cytotoxicity were carried out using two methods:

MTT assay – this method allows to determine the viability of cells. It is based on the fact that living and metabolically active cells, using mitochondrial dehydrogenases, convert the yellow soluble tetrazolium salt (3[4,5-dimethyl-thiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) and reduce it to purple insoluble formazane crystals. During cell lysis, formazane crystals easily pass into a solution of organic solvents such as isopropanol or dimethyl sulfoxide. By measuring the absorbance of the formazane solution, the activity of mitochondrial dehydrogenases and, accordingly, cell viability are determined [9].

To determine the cytotoxicity of PEG-HYAL, cells were cultured in 96-well plates at the rate of 2×10^4 cells per well. After 24 hours, the medium was removed, complete medium with 1% FBS and PEG-HYAL at concentrations of 37, 75 and 150 U/ml was added, and cells were cultured for 72 hours. After incubation of cells with drugs in a CO₂ incubator at 37°C, the culture medium was removed from the wells, 100 µl of medium with MTT (3[4,5-dimethyl-thiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium, Sigma) was added at an initial concentration of 5 mg/ml and incubated for 4 hours. The absorption of dissolved formazane crystals was measured at a wavelength of 492 nm using a Stat Fax-2100 microplate reader (Awareness Technology Inc., USA) and expressed in units of absorbance (UA). Cell viability was calculated as the ratio of UA in the experiment $\times 100/\text{UA}$ in the control.

Statistical analysis was performed using STATISTICA 10.0 software (StatSoft Inc., USA). The data are presented as the mean value (M) and standard deviation (SD). Significance of differences between the groups was assessed according to the Mann-Whitney

лей, таких как изопропанол или диметилсульфоксид. По измерению оптической плотности раствора формазана проводят определение активности митохондриальных дегидрогеназ и, соответственно, жизнеспособности клеток [9].

Для определения цитотоксичности ПЭГ-ГИАЛ клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве 2×10^4 клеток на лунку. Через 24 ч культивирования среду удаляли, добавляли полную среду с 1% содержанием ЭТС и ПЭГ-ГИАЛ в концентрациях 37, 75 и 150 ЕД/мл, далее культивировали клетки в течение 72 ч. После инкубации клеток с препаратами в CO_2 -инкубаторе при 37 °С культуральную среду убрали из лунок, добавляли по 100 мкл среды с МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, Sigma) в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Поглощение растворенных кристаллов формазана измеряли при длине волны 492 нм с использованием планшетного ридера Stat Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США) и выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Жизнеспособность клеток рассчитывали как отношение ЕОП в опыте $\times 100/\text{ЕОП}$ в контроле.

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения (М) и стандартного отклонения (SD). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна – Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

Электронно-микроскопическое исследование: влияние ПЭГ-ГИАЛ на цитоархитектонику клеток оценивали визуально. Клетки фиксировали в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере (рН 7.4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом LEICA DME и выбирали клетки для электронно-микроскопического исследования. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония) Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия).

test. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Electron microscopic examination. The effect of PEG-HYAL on the cytoarchitectonics of cells was assessed visually. The cells were fixed in a 1% solution of OsO_4 using a phosphate buffer (pH 7.4), dehydrated in ethyl alcohol of increasing concentrations and enclosed in EPON (Serva, Germany). Semi-thin 1 μm sections were prepared from the obtained blocks on a Leica UC7/FC7 ultramicrotome (Germany/Switzerland), stained with toluidine blue, studied on a LEICA DME light microscope, and cells were selected for electron microscopic examination. Ultrathin 70–100 nm sections were obtained from the selected samples, contrasted with a saturated aqueous solution of uranyl acetate and lead citrate, and studied using a JEM-1400 electron microscope (JEOL, Japan) of the Center for Collective Microscopic Analysis of Biological Objects of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia).

RESULTS AND DISCUSSION

Cytotoxicity assessment using MTT assay. The viability of liver cells with the addition of PEG-HYAL at concentrations of 75 and 37 U/ml was at the control level – 99 and 100%, respectively. At the same time, the viability of liver cells in the maximum concentration of PEG-HYAL 150 U/ml significantly stimulated cell proliferation, as evidenced by an increase in cell viability up to 106%. This fact indicates the absence of a dose-dependent effect, as well as the cytotoxic effect of PEG-HYAL on human hepatocytes (Fig. 1).

Electron microscopic examination. Incubation of human liver cells, hepatocytes, with PEG-HYAL for 72 hours had some effect on the ultrastructural organization of cells.

Electron microscopic examination of intact hepatocytes revealed a small content of microvilli on the cell surface. In the cytoplasm of cells, rounded nuclei with a predominance of euchromatin and a nucleolus of granular fibrillar structure were observed. Mitochondria were more often oval or rounded in shape and had well-defined cristae. Glycogen in the form of rosettes was evenly distributed throughout the cytoplasm or formed clusters in certain areas of hepatocytes. Cisterns of the granular endoplasmic reticulum, peroxisomes and lysosomes were well represented. Single autolysosomes and lipid inclusions were found (Fig. 2, A and 3, A).

Ultrastructural analysis of hepatocytes cultured with PEG-HYAL at a dose of 37 U/ml revealed an increase in the electron density of cell cytoplasm and

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка цитотоксичности с использованием МТТ-теста. Жизнеспособность клеток печени при добавлении ПЭГ-ГИАЛ в концентрациях 75 и 37 ЕД/мл находилась на уровне контроля – 99 и 100 % соответственно. При этом жизнеспособность клеток печени под влиянием максимальной концентрации ПЭГ-ГИАЛ 150 ЕД/мл статистически значимо стимулировала пролиферацию клеток, о чем свидетельствует повышение жизнеспособности клеток до 106 %. Данный факт указывает на отсутствие дозозависимого эффекта, а также цитотоксического действия ПЭГ-ГИАЛ на гепатоциты человека (рис. 1).

Электронно-микроскопическое исследование. Инкубация клеток печени человека – гепатоцитов с ПЭГ-ГИАЛ в течение 72 ч оказала некоторое влияние на ультраструктурную организацию клеток.

При электронно-микроскопическом исследовании интактных гепатоцитов отмечали небольшое содержание микроворсинок на поверхности клеток. В цитоплазме клеток наблюдали ядра округлой формы с преобладанием эухроматина и наличием ядрышка гранулярно-фибрилярного строения. Митохондрии имели чаще овальную или округлую форму и хорошо выраженные кристы. Гликоген в виде розеток располагался равномерно по цитоплазме или образовывал скопления в отдельных участках гепатоцитов. Были хорошо представлены цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, пероксисомы и лизосомы. Встречались одиночные аутолизосомы и липидные включения и (рис. 2, А и 3, А).

При ультраструктурном анализе гепатоцитов, которые культивировали с ПЭГ-ГИАЛ в дозе

a significant increase in the size and number of microvilli on the surface of cells that were often in a budding state (Fig. 2, B). The size of the nucleoli was significantly increased. The cytoplasm of hepatocytes was abundant in organelles. Mitochondria had different shapes and sizes. An increase in the content of cristae and in the electron density of the matrix was noted (Fig. 3, B). A significant increase in the content of free polysomal complexes of ribosomes, autolysosomes and vesicular structures was observed (Fig. 2, B).

When culturing hepatocytes with PEG-HYAL at a dose of 75 U/ml, an increased content and size of microvilli on the cell surface were noted (Fig. 2, C). The electron density of the cytoplasm of cells and mitochondria was similar compared to the control. Mitochondria were arranged in groups, and most of them had clearly defined membrane boundaries with poorly visualized cristae. Well-defined cisterns of the granular endoplasmic reticulum and an increased content of free polysomal ribosome complexes were found. A significant accumulation of autophagosomes and autolysosomes was observed (Fig. 3, C).

When PEG-HYAL was added at a dose of 150 U/ml, numerous and enlarged microvilli on the cell surface were noted. Heterochromatin discrete masses were often observed in the structure of the nuclei, located throughout the whole organelle volume. Heterogeneity in the structure of mitochondria was noted, which had different sizes, shapes, electron density and content of cristae. An increased content of the cisterns of the granular endoplasmic reticulum, well-defined vacuoles of the Golgi complex, presence of small vesicular structures, moderate content of autophagosomes, autolysosomes and

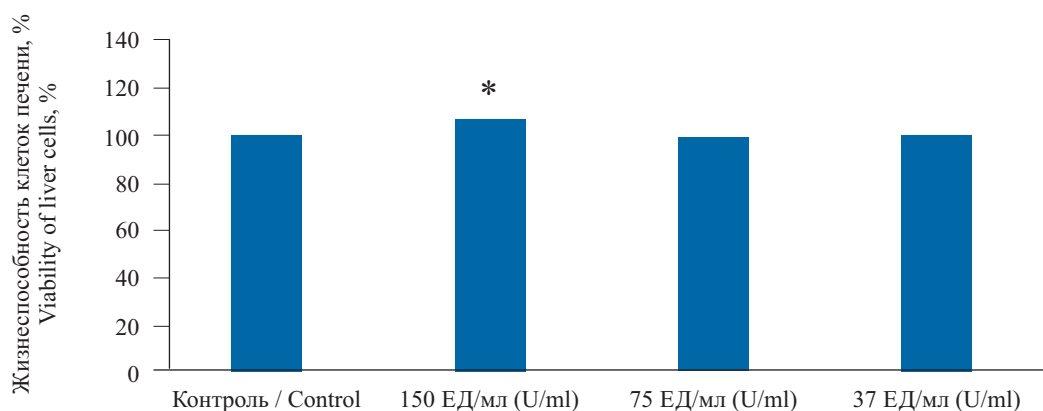


Рис. 1. Жизнеспособность клеток печени под влиянием ПЭГ-ГИАЛ в различных концентрациях (* достоверность различий в сравнении с контролем $p = 0.04$)

Fig. 1. Viability of liver cells in the use of PEG-HYAL in different concentrations (* significance of differences compared with the control $p = 0.04$)

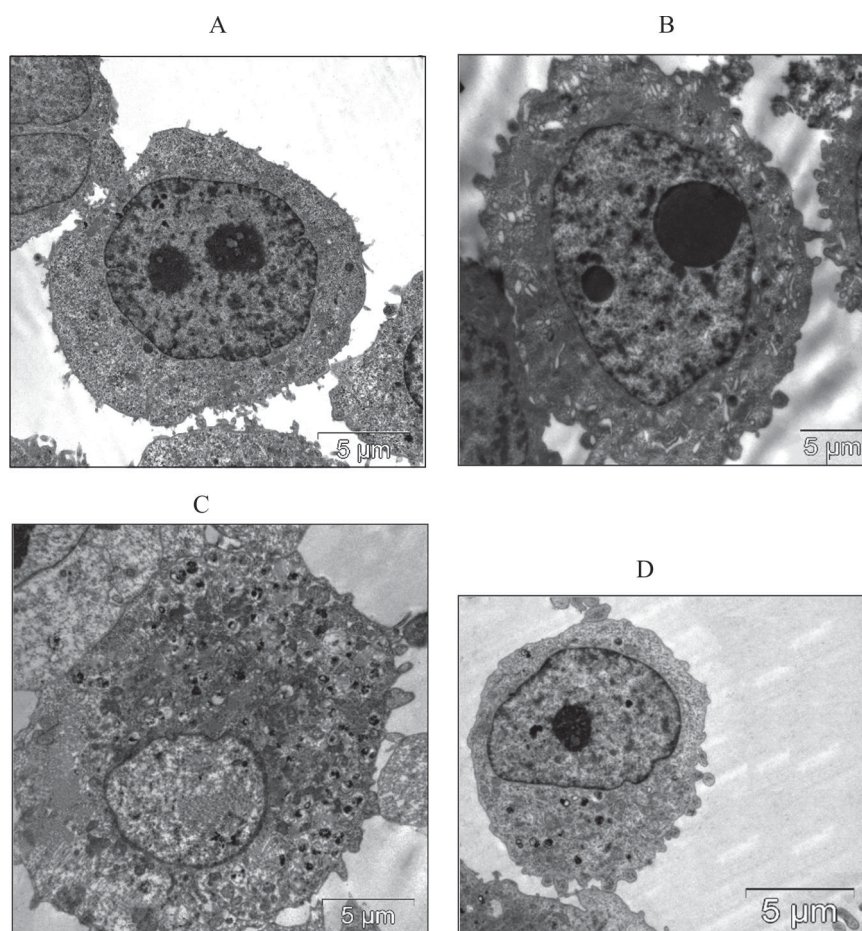


Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов при добавлении в культуральную среду ПЭГ-ГИАЛ в изучаемых дозах: А – контроль; В – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 37 ЕД/мл; С – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 75 ЕД/мл; D – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 150 ЕД/мл
Fig. 2. The ultrastructure of hepatocytes when PEG-HYAL is added to the culture medium in the studied doses: A – control; B – PEG-HYAL at a dose of 37 U/ml; C – PEG-HYAL at a dose of 75 U/ml; D – PEG-HYAL at a dose of 150 U/ml

37 ЕД/мл, было выявлено увеличение электронной плотности цитоплазмы клеток и значительное возрастание размеров и содержания микроворсинок на поверхности клеток, которые часто находились в состоянии почкования (рис. 2, В). Были значительно увеличены размеры ядрышек. Цитоплазма гепатоцитов была насыщена органеллами. Митохондрии имели различные формы и размеры. Отмечали рост содержания крист и увеличение электронной плотности матрикса (рис. 3, В). Наблюдали значительное возрастание содержания свободных полисомальных комплексов рибосом, аутолизосом и везикулярных структур (рис. 2, В).

При культивировании гепатоцитов с ПЭГ-ГИАЛ в дозе 75 ЕД/мл отмечали повышенное содержание и увеличенные размеры микроворсинок на поверхности клеток (рис. 2, С). Электронная плотность цитоплазмы клеток и митохондрий была сходной с соответствующими

lysosomes, single lipid inclusions and a small content of glycogen granules were revealed (Fig. 2, D and 3, D).

The morphological examination data showed that the addition of PEG-HYAL to the culture medium in all studied doses led to an increase in the number and size of microvilli on the outer membrane of hepatocytes, in the content of protein synthesis structures of cells – free polysomal complexes of ribosomes or membranes of the granular endoplasmic reticulum; change in the shape, size, electron density and number of mitochondrial crista, and also the content of autophagic structures.

The structural changes observed in hepatocytes during cultivation with PEG-HYAL indicate that in all doses the drug does not have a toxic effect and contributes to the enhancement of metabolic processes and the development of autophagy in cells as one of the main homeostatic processes. Activation of autophagy helps to maintain an adaptive cellular

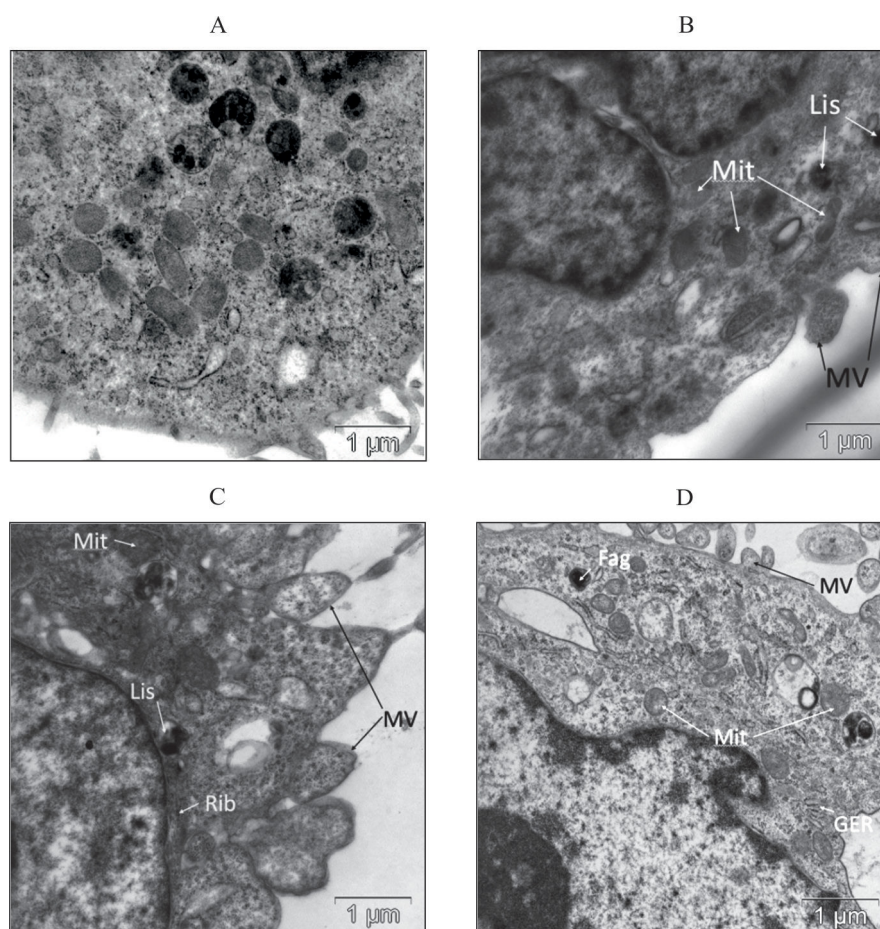


Рис. 3. Ультраструктура и цитоархитектоника гепатоцитов при воздействии ПЭГ-ГИАЛ в изучаемых дозах (MV – микроворсинки; Mit – митохондрии; Lis – аутолизосомы; Fag – аутофагосомы; Rib – рибосомы; GER – гранулярный эндоплазматический ретикулум):

A – контроль; B – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 37 ЕД/мл; C – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 75 ЕД/мл; D – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 150 ЕД/мл

Fig. 3. The ultrastructure and cytoarchitectonics of hepatocytes when PEG-HYAL is added in the studied doses (MV – microvilli; Mit – mitochondria; Lis – autolysosomes; Fag – autophagosomes; Rib – ribosomes; GER – granular endoplasmic reticulum):

A – control; B – PEG-HYAL at a dose of 37 U/ml; C – PEG-HYAL at a dose of 75 U/ml; D – PEG-HYAL at a dose of 150 U/ml

структурами в контроле. Митохондрии располагались группами, и большинство их имело четко очерченные границы мембран со слабо визуализируемыми кристами. Отмечали хорошо выраженные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума и повышенное содержание свободных полисомальных комплексов рибосом. Наблюдалось значительное накопление аутофагосом и аутолизосом (рис. 3, C).

При добавлении ПЭГ-ГИАЛ в дозе 150 ЕД/мл отмечали многочисленные и увеличенные в размере микроворсинки на поверхности клеток. В структуре ядер часто наблюдали глыбки гетерохроматина, расположенные по всему объему органеллы. Отмечали гетерогенность в структуре митохондрий, которые имели различные размеры, форму, электронную плотность и содержа-

response in changes of the intracellular and extracellular environment, protects the cell from the formation of cytotoxic components, and is also one of the mechanisms for overcoming possible stress reactions [10].

CONCLUSION

As part of the experimental study, it was shown that PEG-HYAL does not have a cytotoxic effect on human hepatocytes. The studied concentrations of PEG-HYAL did not cause a cytodestructive effect. The data obtained can be used in the further development of PEG-HYAL as an original drug.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ние крист. Выявляли повышенное содержание цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, хорошо выраженные вакуоли комплекса Гольджи, наличие мелких везикулярных структур, умеренное содержание аутофагосом, аутолизосом и лизосом, единичные липидные включения и небольшое содержание гранул гликогена (рис. 2, D и 3, D).

Полученные данные морфологического исследования показали, что добавление в культуральную среду ПЭГ-ГИАЛ во всех изучаемых дозах приводило к возрастанию содержания и размеров микроворсинок на наружной мембране гепатоцитов, увеличению содержания структур белкового синтеза клеток – свободных полисомальных комплексов рибосом или мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, изменению формы, размеров, электронной плотности и содержания крист митохондрий, а также содержания аутофагических структур.

Наблюдаемые структурные изменения гепатоцитов при культивировании с ПЭГ-ГИАЛ свидетельствуют о том, что во всех изучаемых дозах средство не оказывает токсического дей-

ствия и способствует усилению обменных процессов и развитию аутофагии в клетках как одного из основных гомеостатических процессов. Активация аутофагии способствует поддержанию адаптивного клеточного ответа в условиях изменения внутри- и внеклеточной среды, защите клетки от образования цитотоксических компонентов, а также является одним из механизмов преодоления возможных стрессовых реакций [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного экспериментального исследования показано, что ПЭГ-ГИАЛ не оказывает цитотоксического воздействия на гепатоциты человека. Исследуемые концентрации ПЭГ-ГИАЛ не вызывали цитодеструктивного эффекта. Полученные данные можно использовать при дальнейшей разработке ПЭГ-ГИАЛ как оригинального лекарственного средства.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Фармакологические свойства пегилированного с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011;3(5):146-150.
2. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Гепатопротекторные эффекты иммобилизированной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидазы и механизмы их развития // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011;151(1):86-90.
3. Артамонов А.В., Бекарев А.А., Верещагин Е.И. и др. Средство, увеличивающее резерв стволовых клеток в организме: Патент РФ № 2405822; опубл. 10.12.2010.
4. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012;2:22-31.
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;14:10. DOI: 10.1186/s12916-016-0553-2.
6. Бгатова Н.П., Досымбекова Р.С., Таскаева Ю.С. и др. Аутофагия как маркер жизнеобеспечения изолированных гепатоцитов // Морфология. 2021;159(1):5-12. DOI: 10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12.
7. Мазеркина И.А. Оценка лекарственной гепатотоксичности in vitro на клеточных моделях (обзор) // Безопасность и риск фармакотерапии.

REFERENCES

1. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. Pharmacological properties of granulocytic colony-stimulating factor pegylated using electron beam synthesis nanotechnologies. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;152:133-137. DOI: 10.1007/s10517-011-1472-z.
2. Dygai A.M., Zyuzkov G.N., Zhdanov V.V. et al. Mechanism for hepatoprotective effects of hyaluronidase immobilized by the nanotechnology method of electron beam synthesis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;151(1):74-78. DOI: 10.1007/s10517-011-1263-6.
3. Artamonov A.V., Bekarev A.A., Vereshchagin E.I. et al. A product that increases the reserve of stem cells in the body. RF Patent No. 2405822. Published: 10.12.2010. (In Russ.)
4. Danchenko E.O. Evaluation of cytotoxicity of pharmaceutical substances with cell cultures. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2012;2:22-31. (In Russ.)
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;14:10. DOI: 10.1186/s12916-016-0553-2.
6. Bgatova N.P., Dosymbekova R.S., Taskaeva Y.S. et al. Autophagy as a life support marker of isolated hepatocytes. *Morphology*. 2021;159(1):5-12. DOI: 10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12. (In Russ.)
7. 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 Russ.)

- 2023;11(2):131-144. DOI: 10.30895/2312-7821-2023-11-2-351.
8. Довнар А.Г., Свирчевская Е.Ю., Ржеусский С.Э., Самойлович Е.О. Оценка цитотоксичности субстанции повияргол in vitro // Медицинские новости. 2016;9:62-64.
 9. Методы исследования цитотоксичности при скрининге лекарственных препаратов: учебно-методическое пособие к практическим занятиям по курсу «Методы скрининга физиологически активных веществ» / А.Г. Иксанова, О.В. Бондарь, К.В. Балакин. Казань: Казанский университет, 2016. 40 с.
 10. Пупышев А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты // Цитология. 2014;56(3):179-196.
 8. Dounar H.G., Svircheuskaya E.Y., Rzheussky S.E., Samailovich E.O. Cytotoxicity assessment of poviyargol substance in vitro. *Meditsinskie novosti*. 2016;9:62-64. (In Russ.)
 9. Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V. (2016). *Methods of Cytotoxicity Research in Drug Screening: a teaching guide to practical classes for the course "Methods of screening physiologically active substances"*. Kazan: Kazan University. 40 p. (In Russ.)
 10. Pupyshv A.B. Reparative autophagy and autophagy death of cells. Functional and regulatory aspects. *Tsitologiya*. 2014;56(3):179-196. (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS

Alexandra M. Shvetsova – Junior Researcher, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0009-0002-7735-6032.

Maxim A. Korolev – Dr. Sci. (Med.), Head, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-0471-652X.

Alexey A. Churin – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Head, Department of Drug Toxicology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-6088-7286.

Natalia A. Bondarenko – Cand. Sci. (Bio.), Head, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

Natalia P. Bgatova – Dr. Sci. (Bio.), Professor, Head, Laboratory of Ultrastructural Studies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4507-093X.

Konstantin I. Ershov – Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Senior Researcher, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-41399-036X.

Pavel G. Madonov – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Head, Department of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Швецова Александра Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0009-0002-7735-6032.

Королёв Максим Александрович – д-р мед. наук, руководитель Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-0471-652X.

Чурин Алексей Александрович – д-р мед. наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом лекарственной токсикологии НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-6088-7286.

Бондаренко Наталья Анатольевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

Бгатова Наталья Петровна – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4507-093X.

Ершов Константин Игоревич – канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фар-

макологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-41399-036x.

Мадонов Павел Геннадьевич – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель отдела экспериментальной фармакологии Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

Равилова Юлия Равильевна – канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4611-165X.

Мишенина Светлана Владимировна – д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-8377-7648.

Yulia R. Ravilova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4611-165X.

Svetlana V. Mishenina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-8377-7648.

