

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОК ЛИНИИ HepG2 ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧЕСКОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИПСИХОТИКОВ

© С. А. Снопов,^{1,*} Н. П. Терюкова,^{1,*} Е. И. Сахенберг,¹
В. В. Тепляшина,^{2,*} Р. Ф. Насырова^{2,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,
и ² С.-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В. М. Бехтерева
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 192019;
* электронные адреса: snopov@incras.ru; npter@yandex.ru;
tepvera@gmail.com; reginaf@bekhterev.ru

С целью исследования токсического и метаболического влияния антипсихотических препаратов (АП) на клетки печеночного происхождения *in vitro* использовали линию клеток гепатобластомы человека HepG2. Клетки культивировали в присутствии двух АП I и II поколений — галоперидола и оланзапина соответственно — в концентрациях, которые при их терапевтическом применении могут иметь место в печени и других тканях с высоким содержанием липидов. В процессе культивирования на нескольких сроках проводили количественное определение продуктов углеводного и липидного обменов, активности нескольких ферментов в среде культивирования, а также показателя жизнеспособности (пролиферации) клеток с помощью MTS-теста. Оба препарата обладали токсическим действием на клетки HepG2, которое проявлялось в угнетении пролиферации и увеличении активности щелочной фосфатазы в среде культивирования. Токсическое действие оланзапина в используемых дозах оказывалось менее выраженным, чем у галоперидола. По данным из литературы, АП увеличивают экспрессию генов липогенеза в клетках центральной нервной системы, жировой ткани и печени, что может вести, как предполагается, к гиперлипидемии. Однако мы не наблюдали увеличения содержания общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой и высокой плотности, триглицеридов в среде культивирования клеток HepG2 в присутствии галоперидола и оланзапина. Это могло быть связано с тем, что оба препарата, являющихся катионными амфифилами, способны ингибировать трафик внутриклеточных липидов. Оба препарата не оказывали влияния и на активность аспартатаминотрансферазы и гамма-глутамилтрансферазы в среде культивирования, но способствовали снижению активности аланинаминотрансферазы. В целом результаты нашей работы подтвердили, что клетки HepG2 могут служить полезной моделью для получения новых данных о влиянии лекарственных препаратов на метаболизм клеток печени и для оценки риска их гепатотоксичности в доклинических исследованиях.

Ключевые слова: клеточные культуры, гепатоциты, гепатотоксичность, метаболизм липидов, метаболизм углеводов, метаболические нарушения, антипсихотики.

Принятые сокращения: АП — антипсихотические препараты (антипсихотики), АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ГГТ — гамма-глутамилтрансфераза, ЖК — жирные кислоты, ЛПВП — липопротеиды высокой плотности, ЛПНП — липопротеиды низкой плотности, ТГ — триглицериды, ФЛ — фосфолипиды, ХС — холестерин, ХС-ЛПВП — холестерин в составе ЛПВП, ХС-ЛПНП — холестерин в составе ЛПНП, ЦНС — центральная нервная система, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

Для изучения действия на клетки печени человека различных веществ и лекарственных средств самой близкой моделью являются первичные культуры гепатоцитов (Maurel, 1996; Gómez-Lechón et al., 1997). Действительно, дифференцированные гепатоциты человека способны к пролиферации *in vitro* и к реакциям на воздействие патофизиологических факторов. В условиях культивирования *in vitro* эти клетки могут воспроизводить основные биохимические функции паренхимы печени и в том числе способны метаболизировать лекарственные препараты (Maurel, 1996). Однако слишком малая доступность гепатоцитов человека, их короткий жизненный цикл, высокая

изменчивость при культивировании и быстрое снижение метаболической активности крайне ограничивают возможности их использования (Madan et al., 2003).

В качестве альтернативных моделей гепатоцитов в последние годы предложено несколько клеточных линий гепатом человека, таких как HepG2, Hep3B, Huh7 и HераRG (Donato et al., 2013). По сравнению с клетками печени взрослого человека клетки указанных линий имеют менее дифференцированный фенотип, неполную сохранность некоторых функций зрелых гепатоцитов, низкие уровни (у отдельных клеточных линий) некоторых ферментов системы цитохрома P450 (CYP450)

(Gómez-Lechón et al., 2014) и более низкую метаболическую активность (Kannebratt, Andersson, 2008). Тем не менее указанные линии имеют и ряд достоинств: достаточно стабильный фенотип, сохранность многих функций, характерных для дифференцированных клеток печени, доступность и удобство в работе, неограниченный срок культивирования и хорошая повторяемость результатов при оценке действия лекарственных средств на клетки *in vitro* (Kannebratt, Andersson, 2008; Gómez-Lechón et al., 2014).

В настоящей работе мы использовали одну из таких клеточных линий для экспериментальной оценки изменений метаболизма в клетках печени под влиянием лекарственных препаратов группы нейролептиков, другое название которых — антипсихотики (АП). Эти препараты широко применяются для длительной терапии психических расстройств, в том числе шизофрении. Распространенность психических расстройств весьма высока во всем мире: средняя заболеваемость только шизофренией составляет 15.2 на 100 000 человек, а риск развития шизофрении на протяжении жизни оценивается показателем 7.2 на 1000 человек (McGrath et al., 2008).

Механизм действия АП окончательно не установлен. Предполагается, что в терапевтическом эффекте некоторых АП имеет значение блокада дофаминовых рецепторов D2 у клеток мозговой ткани (Burtis et al., 2002). Для многих АП возможным механизмом терапевтического действия считается индуцированная АП активация биосинтеза глиального холестерина (ХС), необходимого нейронам для процессов миелинизации и синаптогенеза (Fernø et al., 2005; Polymeropoulos et al., 2009). Установлено, что АП увеличивают экспрессию генов, вовлеченных в синтез ХС и жирных кислот (ЖК), в клетках центральной нервной системы (ЦНС), печени и жировой ткани (Fernø et al., 2005, 2006, 2009, 2011; Kristiana et al., 2010; Canfrán-Duque et al., 2013; Skrede et al., 2013).

Примечательно, что проведение лечения с помощью АП сопровождается, как правило, рядом нежелательных побочных явлений, связанных с нарушениями углеводного и липидного обменов. Распространенность сахарного диабета, ожирения, дислипотеинемии и сердечно-сосудистых заболеваний в группе больных с психическими расстройствами оказывается значительно выше, чем в общей популяции (Melkersson et al., 2004; Newcomer, 2005; Юнилайнен, Старостина, 2012). Так, ожирение развивается у 50—60 % пациентов, принимающих АП (Allison et al., 1999; Незнанов и др., 2013), а сахарный диабет у больных с шизофренией встречается в 2—4 раза чаще, чем в общей популяции (Usook, Gaebel, 2008). Кроме того, АП относят к числу психотропных средств с высокой гепатотоксичностью, применение которых связано с риском развития лекарственного гепатита (Сиволап, 2013).

Метаболические нарушения развиваются в неодинаковой степени при применении разных препаратов группы АП. Так, по выраженности эффекта увеличения массы тела традиционные или типичные АП (I поколения) располагаются в следующем порядке (по убыванию): тиоридазин > хлорпромазин > галоперидол > флуфеназин > перфеназин; среди атипичных АП (II поколения) наибольшую прибавку массы тела вызывают клозапин и оланзапин (Weiden et al., 2004). Нарушения углеводного обмена также чаще отмечают при терапии клозапином (у 12—36 % пациентов) и оланзапином (у 6—35 % пациентов) (Gury, 2004). При применении обладающих сравнительно меньшим лечебным эффектом АП I поколения

(хлорпромазина и тиоридазина) и II поколения (кветиапина, клозапина и оланзапина) показан высокий риск развития гиперлипидемии, в то время как более эффективные АП I и II поколений (зипразидон, рисперидон и арипипразол) реже приводят к гиперлипидемии (Meyer, Koro, 2004).

Имеются предположения, что причиной метаболических нарушений, возникающих у пациентов под влиянием АП, может быть стимуляция липогенеза в клетках печени. Так, в первичной культуре гепатоцитов крыс под влиянием клозапина и оланзапина наблюдали значительное увеличение синтеза *de novo* ХС и других липидов, хотя галоперидол увеличивал липогенез без изменения синтеза ХС (Laouressergues et al., 2010).

Изложенное выше дает основание полагать, что исследование АП-индуцированных нарушений метаболизма в модельных экспериментах на клеточных культурах могут существенно расширить представления о патогенезе нарушений обмена веществ у пациентов, принимающих АП I и II поколений, повысить эффективность лечения этими препаратами и снизить частоту осложнений и побочных эффектов (Насырова и др., 2016).

При подборе модельной системы мы учитывали, что печеночно-клеточная линия гепатобластомы человека HepG2 является одной из наиболее часто используемых в экспериментальных исследованиях. Эти клетки высокодифференцированы и обладают многими генотипическими особенностями нормальных клеток печени (Sassa et al., 1987). Показано, что клетки HepG2 имеют сниженный уровень активности CYP450, но обладают нормальными уровнями активности ферментов фазы биотрансформации II, за исключением УДФ-глюкурозилтрансферазы (Westerink, Schoonen, 2007). Использование линии HepG2 позволило изучить действие многих химических веществ — гепатотоксинов и лекарственных препаратов, о токсичности которых судили по многим параметрам — жизнеспособности клеток, пролиферации, целостности мембраны, уровню АТФ и пр. (O'Brien et al., 2006; Schoonen et al., 2012). О пороге токсичности различных АП I и II поколений в отношении клеток HepG2 пока нет таких сведений, которые получены *in vitro* для клеток глиальных и нейрональных линий (Fernø et al., 2006).

Цель настоящей работы — сопоставление токсичности, а также метаболического влияния на углеводный и липидный обмены двух АП — галоперидола (I поколения) и оланзапина (II поколения) при их воздействии на клетки печеночного происхождения — гепатобластомы человека HepG2. Оценивали токсическое действие обоих препаратов на клетки в процессе их роста (по MTS-тесту), а также следующие биохимические показатели в культуральной среде: концентрация глюкозы, общего ХС, ХС в составе липопротеидов высокой и низкой плотности (соответственно ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП), триглицеридов (ТГ), а также активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) и щелочной фосфатазы.

Материал и методика

Клетки постоянной линии HepG2 гепатобластомы человека получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Культивирование проводили в пластиковых чашках Петри (Orange Scientific, Бельгия) в полной пита-

тельной среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки плодов коровы Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина, при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Клетки высевали и культивировали в чашках в среде без добавления АП (контроль) и в среде, содержащей галоперидол в концентрации 1 или 2 мкг/мл или оланзапин (Gedeon Richter, Венгрия) в концентрации 2 или 4 мкг/мл (эксперимент). Указанные концентрации АП в несколько раз превышают те, что могут иметь место в крови пациентов при введении этих препаратов в максимальных терапевтических дозах (60 мг/сут для галоперидола и 120 мг/сут для оланзапина), но соответствуют дозировкам катионных амфифилов (к каковым относятся оба препарата), применяющимся при изучении их действия на клетки *in vitro* (Adams et al., 2003; Fernø et al., 2005, 2006). При выборе концентраций учитывали, что вследствие высокой липофильности АП могут накапливаться в богатых липидами тканях (ЦНС, печени и жировой ткани) до уровней, в 10—30 раз превышающих их концентрации в крови, что показано для галоперидола и клозапина (Fernø et al., 2006).

Всего нами проведено 4 отдельных эксперимента по культивированию клеток при трехкратном повторении посевов в каждом из вариантов эксперимента (без АП, с галоперидолом в дозах 1 или 2 мкг/мл, с оланзапином в дозах 2 или 4 мкг/мл).

Клетки исследовали на сроках 36 ± 2 ч (время завершения периода адаптации клеток к условиям культивирования) и 132 ± 2 ч (время активного роста). Из всех чашек отбирали по 0.5 мл культуральной среды и измеряли в ней концентрации глюкозы, общего ХС, ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП, ТГ, а также активность АЛТ, АСТ, ГГТ и щелочной фосфатазы. Измерения проводили с использованием реагентов Randox (Великобритания) согласно протоколам фирмы-производителя, на автоматическом биохимическом анализаторе Sapphire 400 (Tokyo Boeki Machinery LTD, Япония).

Для оценки токсического действия АП использовали показатель численности жизнеспособных клеток при их культивировании, который определяли колориметрически с помощью MTS-теста (по восстановлению тетразолия). Суспензию клеток в среде культивирования ($5 \cdot 10^4$ кл./мл) вносили в лунки четырех плоскодонных 96-луночных планшетов (по 0.1 мл суспензии в лунку), клетки каждого экспериментального варианта повторяли в четырех лунках на каждом планшете. Планшеты с клетками содержали во влажной атмосфере CO₂-инкубатора при 37 °С. Через 16, 40, 64 и 88 ч по одному планшету забирали для тестирования, добавляли в его лунки с клетками по 20 мкл реагента CellTiter 96 Aqueous One Cell Proliferation Assay (Promega, США) и через 1.5 ч измеряли оптическую плотность среды с помощью фотометра с вертикальным лучом (Titertek Multiskan, Финляндия). Величина оптической плотности среды в лунках планшета (при 492 нм) пропорциональна содержанию в них живых клеток, и последовательные ее изменения отражают рост численности клеток в результате пролиферации.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ SPSS 19.0. Использовали критерии Колмогорова—Смирнова с поправками Лиллиефорса для проверки выборки разностей пар связанных наблюдений на нормальность распределения, критерий Стьюдента для связанных выборок в случае нормального распределения разностей и

критерий Уилкоксона в случае отсутствия их нормального распределения. Для сравнения трех групп независимых выборок применяли дисперсионный анализ с включением процедуры множественного сравнения. Различия считали значимыми при уровне $P < 0.05$.

Результаты

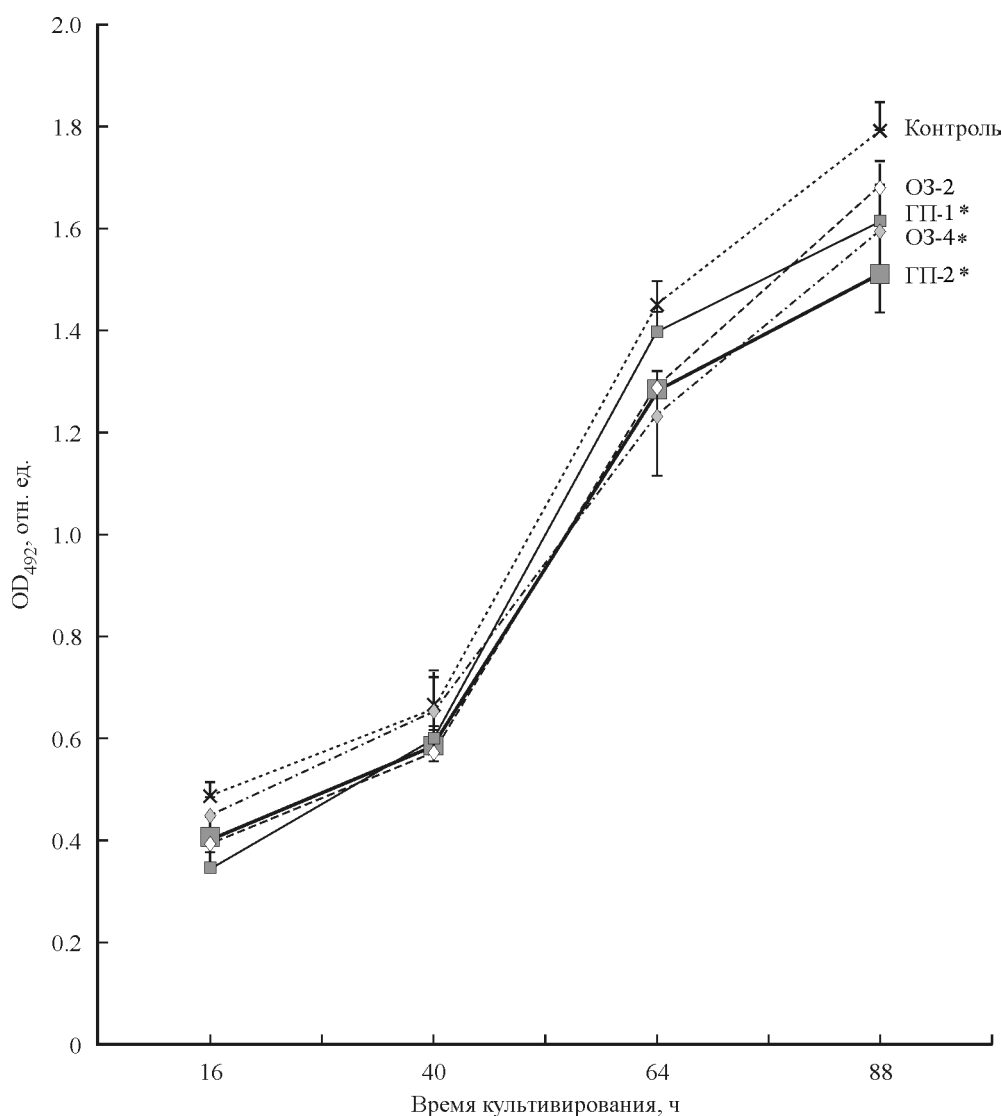
Определение пролиферативной активности (жизнеспособности) клеток HerG2 по MTS-тесту показало, что способность клеточной культуры восстанавливать тетразолий в контроле возрастала за период от 16 до 88 ч культивирования примерно в 4 раза (см. рисунок). В присутствии галоперидола (в обеих концентрациях) и оланзапина (в дозе 4 мкг/мл) эта способность оказывалась значительно более низкой, чем в контроле. Такие результаты свидетельствуют об угнетающем и (или) токсическом действии обоих препаратов на клетки HerG2 в культуре. Сравнение показывает, что у галоперидола в дозе 2 мкг/мл токсическое действие более выражено, чем у оланзапина в дозе 4 мкг/мл ($P = 0.043$).

Определяя показатели липидного обмена в среде культивирования клеток HerG2, мы учитывали данные из литературы о выявленном ранее влиянии АП на активацию генов, участвующих в синтезе ХС и других липидов. Однако в наших экспериментах определение уровней ХС, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП и ТГ в среде культивирования не выявило влияния ни галоперидола, ни оланзапина на эти показатели (табл. 1).

В то же время культивирование клеток HerG2 как в отсутствие, так и в присутствии обоих АП сопровождалось значительным снижением содержания глюкозы в среде, а также изменениями активности всех тестируемых трансфераз, имеющих ключевое значение в белковом обмене, и щелочной фосфатазы, обеспечивающей клеткам трансмембранный транспорт самых разных молекул (табл. 1).

Так, во всех вариантах культивирования происходило значительное снижение уровня глюкозы в среде (в 4—6 раз, $P = 0.001$), которое, очевидно, являлось результатом потребления глюкозы клетками в процессе их жизнедеятельности и репликации. При этом абсолютная величина такого снижения на сроке 132 ч в присутствии галоперидола в обеих дозах была меньше, чем в контроле (соответственно $P = 0.007$ и $P = 0.0001$). Влияние оланзапина на содержание глюкозы в среде было значимо ниже, чем галоперидола ($P = 0.006$), и снижение ее концентрации в среде с оланзапином не отличалось от такового в контроле.

С учетом выявленного влияния АП на жизнеспособность клеток HerG2 мы попытались оценить, насколько зарегистрированное нами уменьшение общего потребления глюкозы в присутствии АП могло быть следствием простого снижения численности живых клеток по сравнению с контролем. В табл. 2 приведен расчет удельного потребления глюкозы, произведенный путем деления величины снижения ее концентрации в среде на показатель, отражающий численность жизнеспособных клеток — оптическую плотность окрашенной среды после восстановления тетразолия живыми клетками. Расчет указывал на то, что в присутствии обоих АП содержание глюкозы в среде снижалось в меньшей степени, чем в контроле, по всей видимости не вследствие угнетения ее индивидуального потребления клетками, а вследствие уменьшения об-



Изменение численности клеток НерG2 в процессе культивирования в среде без АП (контроль) и в среде с галоперидолом (ГП) или оланзапином (ОЗ).

ГП-1, ГП-2 — ГП в дозах 1 и 2 мкг/мл соответственно; ОЗ-2, ОЗ-4 — ОЗ в дозах 2 и 4 мкг/мл соответственно. Показаны средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки). Звездочки указывают на достоверные отличия показателей от контроля через 88 ч культивирования: $P = 0.018$ и $P = 0.004$ в случаях ГП-1 и ГП-2 соответственно и $P = 0.015$ в случае ОЗ-4. Численность клеток оценивали по оптической плотности среды (OD_{492}) с восстановленным тетразолием (MTS-тест).

щей численности живых клеток (см. рисунок). При этом удельное потребление глюкозы клетками даже немного увеличивалось в присутствии обоих АП, согласно расчету — приблизительно на 5 %.

Во всех вариантах культивирования на сроке 132 ч по сравнению со сроком 36 ч в среде происходило увеличение активности АЛТ — примерно вдвое ($P = 0.005$), активности АСТ и ГГТ — почти на порядок ($P = 0.001$ и $P = 0.008$ соответственно). В то же время активность щелочной фосфатазы значимо снижалась примерно на 1/4 ($P = 0.001$). При этом оба исследованных АП оказывали значимое влияние на активность только двух из четырех перечисленных ферментов — АЛТ и щелочной фосфатазы.

Так, активность АЛТ в среде культивирования клеток НерG2 в присутствии как галоперидола, так и оланзапина на сроке 132 ч была ниже, чем в контроле. Снижение было достоверным при использовании галоперидола в дозе 2 мкг/мл ($P = 0.001$) и оланзапина в дозе 4 мкг/мл

($P = 0.001$). Различий между двумя этими АП по влиянию на активность АЛТ не выявлено. Так же как в случае с глюкозой, мы оценили, насколько зарегистрированное нами снижение общей активности АЛТ в присутствии АП может быть следствием снижения численности живых клеток НерG2 по сравнению с контролем. В табл. 3 приведен расчет удельной активности АЛТ в среде культивирования клеток с учетом показателя жизнеспособности клеток (оптической плотности окрашенной среды после восстановления тетразолия). Результаты расчета подтвердили, что активность АЛТ на сроке 132 ч снижалась в присутствии обоих АП по сравнению с контролем (за исключением варианта с галоперидолом в дозе 1 мкг/мл) вследствие уменьшения не только численности живых клеток (см. рисунок), но и продукции АЛТ индивидуальными клетками.

Активность щелочной фосфатазы в присутствии обоих АП оказывалась выше, чем в контроле, уже на первом

Биохимические показатели в среде культивирования клеток НерG2 с галоперидолом (ГП) или оланзапином (ОЗ)

Концентрация метаболита, ммоль/л	Длительность культивирования клеток, ч									
	36 (1-е тестирование)					132 (2-е тестирование)				
	контроль (без АП)	ГП, мкг/мл		ОЗ, мкг/мл		контроль (без АП)	ГП, мкг/мл		ОЗ, мкг/мл	
		1	2	2	4		1	2	2	4
Глюкоза	18.70 ± 0.13	18.93 ± 0.07	18.66 ± 0.19	16.74 ± 1.94	2.56 ± 0.17	3.64 ± 0.21	2.52 ± 0.36	3.25 ± 0.26	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.04
Общий ХС	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01
ХС-ЛПВП	0.02 ± 0.01	0.010 ± 0.002	0.02 ± 0.01	0.020 ± 0.006	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.03
ХС-ЛПНП	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.050 ± 0.016	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.19	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
ТГ	0.14 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.060 ± 0.004	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	5.00 ± 0.83	5.18 ± 1.03
Активность фермента, Ед/л										
АЛТ	5.48 ± 0.80	5.00 ± 0.83	5.82 ± 0.77	5.61 ± 0.73	10.79 ± 0.63	9.70 ± 1.96	8.18 ± 1.03	6.85 ± 0.29	3.48 ± 0.18	37.83 ± 8.69
АСТ	3.48 ± 0.18	3.25 ± 0.32	2.75 ± 0.35	2.360 ± 0.056	44.43 ± 5.83	42.66 ± 7.11	51.61 ± 6.89	58.91 ± 10.19	0.28 ± 0.16	2.89 ± 1.26
ГГТ	68.98 ± 0.49	71.44 ± 0.34	70.84 ± 0.52	71.03 ± 0.51	3.66 ± 0.93	4.56 ± 1.17	5.25 ± 0.97	4.50 ± 1.18	68.98 ± 0.49	63.52 ± 1.51
Щелочная фосфатаза					49.43 ± 0.70	58.31 ± 2.45	52.87 ± 1.75	51.89 ± 0.57		

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контроля на том же сроке тестирования ($P = 0.001$ — 0.002).

сроке тестирования при обеих концентрациях и галоперидола ($P = 0.02$ и $P = 0.0001$ соответственно), и оланзапина ($P = 0.02$ и $P = 0.001$ соответственно). Более высоким, чем в контроле, уровень щелочной фосфатазы сохранялся и через 132 ч культивирования в присутствии галоперидола в обеих концентрациях ($P = 0.006$ и $P = 0.0001$ соответственно) и оланзапина в обеих концентрациях ($P = 0.02$ и $P = 0.0001$ соответственно). Обнаруженное повышение активности щелочной фосфатазы в среде культивирования по сравнению с контролем было более выражено в присутствии галоперидола в дозе 2 мкг/мл, чем в присутствии оланзапина в дозе 4 мкг/мл на обоих сроках тестирования ($P = 0.03$ и $P = 0.045$ соответственно).

Обсуждение

Согласно современным представлениям, психические расстройства, включая шизофрению, могут быть непосредственно связаны с дисрегуляцией гомеостаза ХС в ЦНС. Предполагается, что дисфункции олигодендроглиальных клеток, сопровождающиеся пониженным формированием миелина, состоящего главным образом из ХС, ведут к снижению плотности дендритных отростков и развитию нарушений синаптических процессов (Fernø et al., 2005). Как показано в обзорной работе Петрова с коллегами (2016), при целом ряде расстройств нарушения в обмене ХС могут выступать в роли пусковых факторов дисбаланса синаптической передачи, ведущего к когнитивным расстройствам и массивной нейродегенерации.

ЦНС представляет собой закрытую систему в отношении поддержания гомеостаза ХС, поскольку циркулирующие в крови липопротеиды не могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в паренхиму мозга (Dietschy, Turley, 2004). В ткани мозга сосредоточено около 23—25 % ХС всего организма, большая его часть (95 %) синтезируется de novo клетками ЦНС, при этом функции, регулирующие гомеостаз метаболически активного ХС в мозге, строго распределены между разными клетками (Fernø et al., 2005; Vance et al., 2005). Глиальные клетки, астроциты, микроглиальные клетки и олигодендроциты гораздо более эффективно синтезируют ХС по сравнению с нейронами из-за различий в уровнях ХС-синтезирующих ферментов, постскваденовых предшественников ХС и его метаболитов (Nieweg et al., 2009). Астроциты и клетки микроглии синтезируют также апопротеин Е, который в комплексе с ХС образует липопротеиды, подобные ЛПВП, в составе которых ХС циркулирует в ткани мозга. Метаболизируют ХС исключительно нейроны с помощью холестерин-24-гидроксилазы СYP46A1. Через свои рецепторы, связывающиеся с апопротеином Е, нейроны захватывают апопротеин Е-содержащие частицы ХС в составе ЛП, после чего используют ХС для роста аксонов и в синаптогенезе (Göritz et al., 2002; Pfrieger, 2003; Chen et al., 2013). С точки зрения терапии именно нейрональные клетки могут являться основными мишенями, на которые направлено действие АП.

Впервые модельную систему для изучения влияния АП на липогенез в клетках, родственных клеткам ЦНС, предложили Ферно и соавторы (Fernø et al., 2005, 2006, 2011). Они использовали культивируемые линии глиальных клеток (GaMg глиомы и CCF-STTG1 астроцитомы) и линии нейрональных клеток человека (SH-SY5Y нейробластомы и HCN2 кортикальных нейронов). Выяснилось,

что АП увеличивают экспрессию генов липогенеза как в клетках ЦНС, так и в клетках печени и клетках жировой ткани (Fernø et al., 2005, 2006, 2009, 2011; Yang et al., 2007; Kristiana et al., 2010; Canfrán-Duque et al., 2013; Skrede et al., 2013) через мембранно-связанные транскрипционные факторы SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins). SREBPs контролируют липидный гомеостаз в клетках, непосредственно активируя экспрессию более 30 генов, участвующих в синтезе и захвате ХС, ЖК, ТГ, ФЛ и кофактора NADPH, необходимого для синтеза этих молекул (Shimano, 2001; Horton et al., 2002; Sato, 2010).

Предполагается что индуцированная АП и контролируемая факторами SREBP активация биосинтеза глиального ХС, необходимого для процессов миелинизации и синаптогенеза в клетках мозга, представляет собой важный механизм терапевтического действия АП (Raeder et al., 2006a; Polymeropoulos et al., 2009). Активация липогенных генов выявлена у разных клеточных линий человека (GaMg глиомы, CCF-STTG1 астроцитомы, SH-SY5Y нейробластомы, HCN2 кортикальных нейронов, гепатобластомы HepG2), так же как активация генов, участвующих в транспорте и оттоке ХС (Vik-Mo et al., 2009).

Наряду с этим стимуляция липогенеза в клетках печени может служить причиной метаболических нарушений, возникающих под влиянием АП при проведении лечения. Так, значительное увеличение синтеза *de novo* ХС и других липидов наблюдается в первичной культуре гепатоцитов крыс под влиянием клозапина и оланзапина, в то время как галоперидол увеличивает липогенез без изменения синтеза ХС (Laouressergues et al., 2010). В клетках гепатобластомы HepG2 и в иммортализованных клетках печени THLE-3 галоперидол и клозапин индуцируют значительный посттрансляционный протеолиз SREBP, приводящий к увеличению транскрипционной активности липогенных генов HMGCS1 и SCD, принимающих участие в синтезе ХС и ЖК соответственно; при этом оланзапин (схожий по химической структуре с клозапином) обладает в 2 раза менее выраженным эффектом (Raeder et al., 2006b). Протеолиз SREBP также меняет и белковый метаболизм в указанных клетках, приводя к преобладанию в них зрелых форм белков (Raeder et al., 2006b).

В настоящей работе мы оценивали возможность исследовать *in vitro* влияние АП на показатели липидного, углеводного и белкового метаболизма клеток печеночного происхождения HepG2. Выбранные нами концентрации галоперидола (1—2 мкг/мл, или 2,6—5,8 мкМ) и оланзапина (2—4 мкг/мл, или 6,9—12,8 мкМ) не выше тех, что обнаруживаются в крови при введении препаратов в максимальных терапевтических дозах и могут иметь место в богатых липидами тканях, в том числе ЦНС и паренхиме печени, где АП накапливаются до уровней, в 10—30 раз превышающих их концентрации в крови. Так, согласно расчетам и данным аутопсии (Fernø et al., 2006), концентрация клозапина в печени (16.3—97.8 мкг/мл, или 5—30 мкМ) примерно в 10 раз выше его концентрации в сыворотке; поэтому авторы в экспериментах *in vitro* вносили его в среду культивирования глиальных клеток в дозе 81.5 мкг/мл (25 мкМ), близкой к верхней границе концентрации препарата в печени.

Потенциальную токсичность галоперидола и оланзапина в отношении клеток HepG2 мы оценивали, используя традиционный показатель пролиферативной активности (жизнеспособности) клеток, определяемый по их способности восстанавливать тетразолий. Мы установили,

Таблица 2

Сравнение потребления глюкозы клетками HepG2 при культивировании без АП, с галоперидолом (ГП) или оланзапином (ОЗ)

АП, мкг/мл	Суммарное потребление за период 36—132 ч, ммоль/л ^a (A)	Численность клеток через 88 ч, усл. ед. (OD ₄₉₂) (B)	Удельное потребление, усл. ед. (C = A/B)
Контроль, 0	16.14	1.80	8.97
ГП, 1	15.06	1.61	9.35
2	14.23	1.51	9.42
ОЗ, 2	16.18	1.68	9.63
4	15.45	1.60	9.65

^a Величина снижения концентрации глюкозы в среде культивирования на сроке 132 ч от концентрации в контроле на сроке 36 ч (18.70 ммоль/л; см. табл. 1).

что за период культивирования 16—88 ч суммарная численность жизнеспособных клеток возрастала примерно вчетверо. При этом в культурах и с галоперидолом, и с оланзапином на первом и последнем сроках тестирования она оказывалась значимо более низкой, чем в контроле (см. рисунок). Этот результат подтверждает угнетающее и (или) токсическое влияние обоих АП в использованных дозах на пролиферацию (выживаемость) клеток HepG2 в культуре. Токсическое влияние галоперидола в дозе 2 мкг/мл оказывалось более выраженным, чем влияние оланзапина в дозе 4 мкг/мл, как на численность жизнеспособных клеток (см. рисунок), так и на активность щелочной фосфатазы в среде культивирования (табл. 1). Известно, что активность щелочной фосфатазы повышается при различных видах поражения печеночных клеток, например лекарственными препаратами, желчью, токсинами при опухолевом процессе, вирусных гепатитах, мононуклеозе и др. (Кишкун, 2010). Очевидно, что более высокие по сравнению с контролем уровни активности щелочной фосфатазы в среде культивирования в присутствии обоих АП отражают и подтверждают их токсическое действие на клетки HepG2.

Данные о токсичности двух препаратов, полученные нами на клетках печеночного происхождения, дополняют существующие выводы о различной токсичности нескольких АП в отношении и нейрональных клеточных

Таблица 3

Сравнение активности АЛТ в среде культивирования клеток HepG2 без АП, с галоперидолом (ГП) или оланзапином (ОЗ)

АП, мкг/мл	Активность фермента на сроке 132 ч, Ед/л (A)	Численность клеток через 88 ч, усл. ед. (OD ₄₉₂) (B)	Удельная активность фермента, усл. ед. (C = A/B)
Контроль, 0	10.79	1.80	5.99
ГП, 1	9.70	1.61	6.02
2	17.1	1.5	4.72
ОЗ, 2	8.18	1.68	4.87
4	6.8	1.6	4.28

линий, а также о том, что оланзапин не влияет на выживаемость этих клеток в концентрациях ниже 100 мкМ (31 мкг/мл), в то время как галоперидол, клозапин и рисперидон имеют порог токсичности около 25 мкМ (Fernø et al., 2006).

Обнаруженное нами влияние галоперидола и оланзапина на активность АЛТ в среде культивирования клеток HepG2 (табл. 1, 3) мы пока не можем объяснить. Известно, что повреждение клеток печеночной ткани обычно приводит к высвобождению этого фермента во внеклеточную среду и что многие лекарственные препараты (например, противовоспалительные и антибиотики, а также АП II поколения рисперидон) повышают уровень его активности в среде (Watkins et al., 2006; Вышковский, 2013). Факт, что галоперидол и оланзапин в отличие от перечисленных препаратов ослабляли возрастание активности фермента в среде при культивировании клеток HepG2 во всех вариантах наших экспериментов, требует дополнительного изучения.

Кроме того, на некоторое увеличение удельного потребления глюкозы индивидуальными клетками HepG2 (около 5 %) под влиянием галоперидола и оланзапина указали пока только наши расчеты (табл. 2), и оно еще нуждается в прямом подтверждении. Возможно, этот эффект был бы заметнее, если бы концентрация глюкозы к концу культивирования не была так снижена по сравнению с начальной. Если предварительный вывод об увеличении потребления глюкозы клетками HepG2 при воздействии АП подтвердится, он может дополнить результаты и выводы других исследователей, свидетельствующие об изменении глюконеогенеза и гликогенеза при поражениях печени, например об увеличении синтеза гликогена в гепатоцитах крыс и человека при хронических гепатитах и циррозе (Безбородкина и др., 2008).

В качестве показателей липидного метаболизма в наших экспериментах мы определяли уровни общего ХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП и ТГ в среде культивирования клеток HepG2 в присутствии галоперидола и оланзапина. Оба АП не обнаружили значимого влияния на эти показатели и, таким образом, не приводили к увеличению выхода ХС из клеток. Такой результат может объясняться тем, что АП I, и II поколения не только активируют экспрессию генов липогенеза через SREBP-систему, но еще индуцируют задержку синтеза ХС на стадии его предшественников, которая приводит к увеличению содержания этих предшественников в клетках нескольких клеточных линий, в том числе HepG2 (Sánchez-Wandelmer et al., 2009; Kristiana et al., 2010; Canfrán-Duque et al., 2013, 2016).

Известно, что содержание липидов и их распределение внутри клетки строго регулируются сложными механизмами обратной связи, контролирующими синтез, этерификацию, поглощение и выведение ХС из клетки (Maxfield, van Meer, 2010). Так, ХС, поступающий в эндоплазматический ретикулум (ЭР), может этерифицироваться в качестве запасной формы и (или) связываться с белками семейства SREBP (Goldstein et al., 2006; Sato, 2010). Показано, что под влиянием АП может происходить накопление в эндосомах (лизосомах) внутриклеточного ХС и ЛПНП вследствие уменьшения их перехода в ЭР и транс-Гольджи (Kristiana et al., 2010; Sánchez-Wandelmer et al., 2010; Canfrán-Duque et al., 2013; Reverter et al., 2014). Снижение уровня ХС в ЭР сочетается с активацией белков SREBP и уменьшением ответа генов-мишеней на антипсихотическую терапию (Fernø et al., 2005,

2006, 2011; Polymeropoulos et al., 2009; Canfrán-Duque et al., 2013). Указанное влияние АП на распределение ХС и липидов внутри гепатоцитов, таким образом, может и не сопровождаться значимыми изменениями в их содержании вне гепатоцитов и, как показали наши эксперименты, в среде культивирования клеток HepG2.

В поисках механизмов влияния АП на липидный метаболизм обсуждаются: непосредственное влияние АП на свойства клеточных мембран и прямое связывание АП со специфическими белками (например, Scar); блокировка продвижения ХС из лизосом и ингибирование активности ферментов, катализирующих поздние этапы биосинтеза ХС; истощение ХС в мембранах ЭР, индуцирующее липогенез, усиливающийся по мере элиминации АП из циркуляции и сопровождающийся образованием и секрецией липопротейдов (ЛП) очень низкой плотности, нарушениями гомеостаза ХС и гипертриглицеридемией (Skrede et al., 2013).

Показано, что механизмом, с помощью которого АП снижают содержание свободного ХС во внутриклеточных мембранах, может быть блокировка поступления экзогенного ХС из циркуляции (Kristiana et al., 2010; Canfrán-Duque et al., 2013, 2016). Эти авторы проводили исследования на клетках CHO-7 и HepG2, культивируемых в ЛП-дефицитной среде, в которую добавляли ХС-ЛПНП. Галоперидол, пимозид, клозапин, рисперидон и зипразидон вызывали аккумуляцию свободного ХС в эндосомных (лизосомных) везикулах, предотвращая его поступление в мембраны ЭР и ингибируя процесс этерификации ХС. Окрашивая обработанные АП клетки филипином, дающим флуоресцентную окраску при связывании со свободным ХС, авторы визуализовали поздние лизосомы, наполненные стеролом (Kristiana et al., 2010; Canfrán-Duque et al., 2013, 2016). Перечисленные АП действуют подобно другим катионным амфифилам, для которых показано ингибирующее действие на трафик внутриклеточного ХС.

Подтверждением высокой вероятности вовлечения перечисленных механизмов в метаболическое действие АП служит тот факт, что при замене культуральной среды на свежую, не содержащую АП, наблюдается стимуляция липогенеза и увеличение внутриклеточного содержания ХС, эфиров ХС, ФЛ, ЖК и ТГ, а также увеличение синтеза и секреции апопротеина В100, участвующего в образовании ЛП очень низкой плотности, обогащенных ТГ (Laouressgues et al., 2010, 2011; Canfrán-Duque et al., 2013).

Отсутствие заметного увеличения выхода ХС и ЛП из клеток HepG2 в среду культивирования в присутствии относительно высоких концентраций галоперидола и оланзапина позволяет предположить, что наблюдаемые при лечении АП изменения липидного обмена, в частности развитие липидемии, могут осуществляться без увеличения выхода из клеток печени ХС и других липидов. В литературе имеются отдельные экспериментальные подтверждения такого предположения. Так, однократная инъекция клозапина или оланзапина взрослым самкам крыс линии Sprague-Dawley индуцирует быстрое и выраженное увеличение ЖК и глюкозы в сыворотке, но не сопровождается изменениями уровня общего ХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, ТГ и ФЛ (Jassim et al., 2012). Наряду с этим имеются и противоречивые сведения о том, что 6—8-недельный курс лечения взрослых пациентов с шизофренией галоперидолом или рисперидоном не приводит к повышению уровня общего ХС в крови, в то вре-

мя как такое же лечение клозапином и оланзапином индуцирует повышение такого ХС (Lindenmayer et al., 2003).

В целом полученные нами данные согласуются с представлениями о том, что нарушения углеводного и липидного обменов на уровне целого организма реализуются не только благодаря непосредственному токсическому и метаболическому действию АП на клетки печени, но и через другие механизмы — изменения нервной и гормональной регуляции синтеза липидов и углеводов, изменения функционального состояния адипоцитов, эндокринных клеток поджелудочной железы и др. Показано, что на фоне избыточного отложения жира АП повышают уровень лептина (гормона, отвечающего за чувство насыщения) в крови, что, однако, не приводит к снижению потребления пищи, поскольку у пациентов развивается резистентность к лептину. Развитие такой резистентности связывают как с непрохождением лептина через гематоэнцефалический барьер (Perez-Iglesias et al., 2008), так и со сродством АП к рецепторам гистамина (H1) и серотонина (5HT2C) и их конкурентной блокадой. Это ведет к нарушению активации системы проопиомеланокортина в дугообразном ядре гипоталамуса и как следствие — к повышению аппетита (Kroeze et al., 2003). Показано также, что АП изменяют уровень синтезируемого адипоцитами гормона адипонектина (Bartoli et al., 2015), который повышает чувствительность клеток к инсулину и угнетает глюконеогенез в периферических клетках-мишенях через АМФ-активируемую протеинкиназу (Kadowaki et al., 2006).

Представленные в настоящей работе подходы, результаты и выводы подтвердили, что культура клеток гепатобластомы человека HepG2 может служить полезной моделью для изучения действия лекарственных препаратов на метаболизм клеток печеночного происхождения и для оценки риска их гепатотоксичности. Применение такой модели может существенно помочь в исследованиях, направленных на улучшение переносимости АП и повышение эффективности лечения этими препаратами при неврологических и психических расстройствах.

Авторы не имеют никаких финансовых или персональных взаимоотношений с другими людьми или организациями, которые могли бы неправомерно повлиять на содержание настоящей статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60025).

Список литературы

Безбородкина Н. Н., Оковитый С. В., Кудрявцев Б. Н. 2008. Углеводный метаболизм при хронических поражениях печени. СПб.: Синтез Бук. 176 с. (Bezborodkina N. N., Okovity S. V., Kudriavtsev B. N. 2008. Metabolism of carbohydrates in chronic liver diseases. St. Petersburg: Sintez Book. 176 p.)

Вышковский Л. Г. (Гл. ред.). 2013. Регистр лекарственных средств России (РЛС). Энциклопедия лекарств. М.: ВЕДАНТА. 22 : 1428 с. (Vyshkovskii L. G. (Ch. Ed.). 2013. Russian register of drugs (RLS). Encyclopedia of drugs. Moscow: VEDANTA. 22 : 1428 p.)

Кишкун А. А. 2010. Руководство по лабораторным методам диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа. 971 с. (Kishkun A. A. 2010. Directives for laboratory diagnostic methods. GJOTAR-Media. 971 p.)

Насырова Р. Ф., Тепляшина В. В., Иващенко Д. В., Снопов С. А. 2016. Изучение механизмов метаболических нарушений, индуцированных антипсихотическими препаратами: возможности использования клеточных моделей. Обзорные психиатрии и медицинской психологии им. В. М. Бехтерева. 4 : 53—60. (Nasyrova R. F., Teplashina V. V., Ivaschenko D. V., Snopov S. A. 2016. Study of the mechanisms of metabolic disturbances induced by antipsychotic drugs: options of the cell model using. Obozrenie psikiatrii i meditsinskoj psikhologii im. V. M. Bekhtereva. 4 : 53—60.)

Незнанов Н. Г., Мартынихин И. А., Тянянский Д. А., Ротарь О. П., Солнцев В. Н., Соколян Н. А., Конради А. О., Денисенко А. Д. 2013. Шизофрения — фактор, увеличивающий риск развития метаболического синдрома. Результаты исследования с использованием метода подбора пар. Мед. академ. журн. 3 (13) : 90—96. (Neznznov N. G., Martynikhin I. A., Tanianskii D. A., Rotar' O. P., Solntsev V. N., Sokolian N. A., Konradi A. O., Denisenko A. D. 2013. Schizophrenia is a factor enhancing the risk of metabolic syndrome development. Results of the research used the pair selection method. Med. akadem. zhurn. 3 (13) : 90—96.)

Петров А. М., Касимов М. Р., Зефирова А. Л. 2016. Метаболизм холестерина мозга и его нарушения: связь с нейродегенерацией и синаптической дисфункцией. Acta Nature. 8 (1) : 64—80. (Petrov A. M., Kasimov M. R., Zefirova A. L. 2016. Brain cholesterol metabolism and its disturbances: connection to neurodegeneration and synaptic dysfunction. Acta Nature. 8 (1) : 64—80.)

Сиволоп Ю. П. 2013. Проблема гепатотоксичности в психиатрии. Психиатрия и психофармакотерапия им. П. Б. Ганнушкина. 1 : 29—32. (Sivolop Yu. P. 2013. Problems of hepatotoxicity in psychiatry. Psikihiatria i psikhofarmakoterapiia im. P. B. Ganushkina. 1 : 29—32.)

Юнилáйнен О. А., Старостина Е. Г. 2012. Влияние антипсихотических препаратов на обмен веществ. Ожирение и метаболизм. 3 : 11—13. (Yunilainen O. A., Starostina E. G. 2012. Influence of antipsychotic drugs on metabolism. Ozhirenie i metabolism. 3 : 11—13.)

Adams C. M., Goldstein J. L., Brown M. S. 2003. Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 10 647—10 652.

Allison D. B., Mentore J. L., Heo M., Chandler L. P., Capperelli J. C., Infante M. C., Weiden P. J. 1999. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. Amer. J. Psychiatry. 156 : 1686—1696.

Bartoli F., Crocamo C., Clerici M., Carra G. 2015. Second-generation antipsychotics and adiponectin levels in schizophrenia: a comparative meta-analysis. Eur. Neuropsychopharmacol. 25 : 1767—1774.

Burris K. D., Molski T. F., Xu C., Ryan E., Tottori K., Kikuchi T., Yocca F. D., Molinoff P. B. 2002. Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 302 : 381—389.

Canfrán-Duque A., Barrio L. C., Lerma M., de la Peña G., Serna J., Pastor Ó., Lasunción M. A., Busto R. 2016. First-generation antipsychotic haloperidol alters the functionality of the late endosomal/lysosomal compartment *in vitro*. Int. J. Mol. Sci. 17 : 404. Doi: 10.3390/ijms17030404.

Canfrán-Duque A., Casado M. E., Pastor Ó., Sánchez-Wandelmer J., de la Peña G., Lerma M., Mariscal P., Bracher F., Lasunción M. A., Busto R. 2013. Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism *in vitro*. J. Lipid Res. 54 : 310—324.

Chen J., Zhang X., Kusumo H., Costa L. G., Guizzetti M. 2013. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for braincholesterol homeostasis. Biochim. biophys. acta. 1831 : 263—275.

Dietschy J. M., Turley S. D. 2004. Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. J. Lipid Res. 45 : 1375—1397.

- Donato M. T., Jover R., Gomez-Lechon M. J. 2013. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr. Drug Metab.* 14 : 946—968.
- Fernø J., Raeder M. B., Vik-Mo A. O., Skrede S., Glambek M., Tronstad K. J., Brelid H., Løvlie R., Berge R. K., Stansberg C., Steen V. M. 2005. Antipsychotic drugs activate SREBP-regulated expression of lipid biosynthetic genes in cultured human glioma cells: a novel mechanism of action? *Pharmacogenomics J.* 5 : 298—304.
- Fernø J., Skrede S., Vik-Mo A. O., Håvik B., Steen V. M. 2006. Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: marked differences between various antipsychotic drugs. *BMC Neurosci.* 7 : 69. Doi: 10.1186/1471-2202-7-69.
- Fernø J., Skrede S., Vik-Mo A. O., Jassim G., Le Hellard S., Steen V. M. 2011. Lipogenic effects of psychotropic drugs: focus on the SREBP system. *Front Biosci. (Landmark Ed.)* 16 : 49—60.
- Fernø J., Vik-Mo A. O., Jassim G., Håvik B., Berge R. K., Skrede S., Gudbrandsen O. A., Waage J., Lunder N., Mørk S., Berge R. K., Jørgensen H. A., Steen V. M. 2009. Acute clozapine exposure *in vivo* induces lipid accumulation and marked sequential changes in the expression of SREBP, PPAR, and LXR target genes in rat liver. *Psychopharmacology. (Berlin)* 203 : 73—84.
- Goldstein J. L., DeBose-Boyd R. A., Brown M. S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 124 : 35—46.
- Gómez-Lechón M. J., Donato T., Ponsoda X., Fabra R., Trullenque R., Castell J. V. 1997. Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. In: J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón (eds.). *In vitro* methods in pharmaceutical research. San Diego, CA: Acad. Press. 129—153.
- Gómez-Lechón M. J., Tolosa L., Donato M. T. 2014. Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs. *Rev. Toxicol.* 31 : 149—156.
- Göritz C., Mauch D. H., Nägler K., Pfrieger F. W. 2002. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J. Physiol.* 96 : 257—263.
- Gury C. 2004. Schizophrenia, diabetes mellitus and antipsychotics. *Encephale.* 30 : 382—391.
- Horton J. D., Goldstein J. L., Brown M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109 : 1125—1131.
- Jassim G., Skrede S., Vázquez M. J., Wergedal H., Vik-Mo A. O., Lunder N., Diéguez C., Vidal-Puig A., Berge R. K., López M., Steen V. M., Fernø J. 2012. Acute effects of orexigenic antipsychotic drugs on lipid and carbohydrate metabolism in rat. *Psychopharmacology. (Berlin)* 219 : 783—794.
- Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116 : 1784—1792.
- Kanebratt K. P., Andersson T. B. 2008. Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.* 36 : 1444—1452.
- Kristiana I., Sharpe L. J., Catts V. S., Lutze-Mann L. H., Brown A. J. 2010. Antipsychotic drugs upregulate lipogenic gene expression by disrupting intracellular trafficking of lipoprotein-derived cholesterol. *Pharmacogenomics J.* 10 : 396—407.
- Kroeze W. K., Hufeisen S. J., Popadak B. A., Renock S. M., Steinberg S. A., Ernsberger P., Jayathilake K., Meltzer H. Y., Roth B. L. 2003. H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology.* 28 : 519—526.
- Laressergues E., Martin F., Helleboid A., Bouchaert E., Cussac D., Bordet R., Hum D., Luc G., Majd Z., Staels B., Duriez P. 2011. Overweight induced by chronic risperidone exposure is correlated with overexpression of the SREBP-1c and FAS genes in mouse liver. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 383 : 423—436.
- Laressergues E., Staels B., Valeille K., Majd Z., Hum D. W., Duriez P., Cussac D. 2010. Antipsychotic drug action on SREBP-related lipogenesis and cholesterol synthesis in primary rat hepatocytes. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 381 : 427—439.
- Lindenmayer J. P., Czobor P., Volavka J., Citrome L., Sheitman B., McEvoy J. P., Cooper T. B., Chakos M., Lieberman J. A. 2003. Changes in glucose and cholesterol levels in patients with schizophrenia treated with typical or atypical antipsychotics. *Amer. J. Psychiatry.* 160 : 290—296.
- Madan A., Graham R. A., Carroll K. M., Mudra D. R., Burton L. A., Krueger L. A., Downey A. D., Czerwinski M., Forster J., Ribadeneira M. D., Gan L.-S., LeChyue E. L., Zech K., Robertson P., Koch P., Antonian L., Wagner G., Yu L., Parkinson A. 2003. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 31 : 421—431.
- Maurel P. 1996. The use of adult human hepatocytes in primary culture and other *in vitro* systems to investigate drug metabolism in man. *Adv. Drug Delivery Rev.* 22 : 105—132.
- Maxfield F. R., van Meer G. 2010. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 : 422—429.
- McGrath J., Saha S., Chant D., Welham J. 2008. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol. Rev.* 30 : 67—76.
- Melkersson K., Dahl M. L. 2004. Adverse metabolic effects associated with atypical antipsychotics: literature review and clinical implications. *Drugs.* 64 : 701—723.
- Meyer J. M., Koro C. E. 2004. The effects of antipsychotic therapy on serum lipids: a comprehensive review. *Schizophr. Res.* 70 : 1—17.
- Newcomer J. W. 2005. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review. *CNS Drugs.* 19 (Suppl. 1) : 1—93.
- Nieweg K., Schaller H., Pfrieger F. W. 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J. Neurochem.* 109 : 125—134.
- O'Brien P. J., Irwin W., Diaz D., Howard-Cofield E., Krejsa C. M., Slaughter M. R., Gao B., Kaludercic N., Angeline A., Bernardi P., Brain P., Hougham C. 2006. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch. Toxicol.* 80 : 580—604.
- Perez-Iglesias R., Vazquez-Barquero J. L., Amado J. A., Berja A., Garcia-Unzueta M. T., Pelayo-Terán J. M., Carrasco-Marín E., Mata I., Crespo-Facorro B. 2008. Effect of antipsychotics on peptides involved in energy balance in drug-naive psychotic patients after 1 year of treatment. *J. Clin. Psychopharmacol.* 28 : 289—295.
- Pfrieger F. W. 2003. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 60 : 1158—1171.
- Polymeropoulos M. H., Licamele L., Volpi S., Mack K., Mitkus S. N., Carstea E. D., Getoor L., Thompson A., Lavedan C. 2009. Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 108 : 134—142.
- Raeder M. B., Fernø J., Glambek M., Stansberg C., Steen V. M. 2006a. Antidepressant drugs activate SREBP and up-regulate cholesterol and fatty acid biosynthesis in human glial cells. *Neurosci. Lett.* 395 : 185—190.
- Raeder M. B., Fernø J., Vik-Mo A. O., Steen V. M. 2006b. SREBP activation by antipsychotic- and antidepressant-drugs in cultured human liver cells: relevance for metabolic side-effects? *Mol. Cell. Biochem.* 289 : 167—173.
- Reverter M., Rentero C., Garcia-Melero A., Hoque M., Vilà de Muga S., Álvarez-Guaita A., Conway J. R. W., Wood P., Cairns R., Lykopoulou L., Grinberg D., Vilageliu L., Bosch M., Heeren J., Blasi J., Timpson P., Pol A., Tebar F., Murray R. Z., Grewal T., Enrich C. 2014. Cholesterol regulates Syntaxin 6 trafficking at trans-Golgi network endosomal boundaries. *Cell Reports.* 7 : 883—897.
- Sánchez-Wandelmer J., Hernández-Pinto A. M., Cano S., Dávalos A., de la Peña G., Puebla-Jiménez L., Arilla-Ferreiro E., Lasunción M. A., Busto R. 2009. Effects of the antipsychotic drug haloperidol on the somatostatinergic system in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 110 : 631—640.

Sassa S., Sugita O., Galbraith R. A., Kappas A. 1987. Drug metabolism by the human hepatoma cell, HepG2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143 : 52—57.

Sato R. 2010. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 501 : 177—181.

Schoonen W. G., Stevenson J. C., Westerink W. M., Horbach G. J. 2012. Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress and NAD(P)H production with Alamar Blue. *Toxicol. in Vitro.* 26 : 511—525.

Shimano H. 2001. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* 40 : 439—452.

Skrede S., Steen V. M., Fernø J. 2013. Antipsychotic-induced increase in lipid biosynthesis: activation through inhibition? *J. Lipid Res.* 54 : 307—309.

Uçok A., Gaebel W. 2008. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry.* 7 : 58—62.

Vance J. E., Hayashi H., Karten B. 2005. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin. Cell. Develop. Biol.* 16 : 193—212.

Vik-Mo A. O., Fernø J., Skrede S., Steen V. M. 2009. Psychotropic drugs up-regulate the expression of cholesterol transport pro-

teins including ApoE in cultured human CNS- and liver cells. *BMC Pharmacol.* 9 : 10. Doi: 10.1186/1471-2210-9-10.

Watkins P. B., Kaplowitz N., Slattery J. T., Colonese C. R., Colucci S. V., Stewart P. W., Harris S. C. 2006. Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: a randomized controlled trial. *JAMA.* 296 : 87—93.

Weiden P., Mackell J., McDonnell D. 2004. Obesity as a risk factor for antipsychotic noncompliance. *Schizophrenia Res.* 66 : 51—57.

Westerink W. M. A., Schoonen W. G. 2007. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. in Vitro.* 21 : 1592—1602.

Xu Y., Jones J. E., Kohno D., Williams K. W., Lee C. E., Choi M. J., Anderson J. G., Heisler L. K., Zigman J. M., Lowel B. B., Elmquist J. K. 2008. 5-HT2CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron.* 60 : 582—589.

Yang L. H., Chen T. M., Yu S. T., Chen Y. H. 2007. Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Pharmacol. Res.* 56 : 202—208.

Поступила 31 X 2016

USING OF CELL LINE HepG2 FOR ASSESSMENT OF TOXIC AND METABOLIC EFFECTS OF ANTIPSYCHOTIC DRUGS

S. A. Snopov,¹ * N. P. Teryukova,¹ * E. I. Sakhenberg,¹ V. V. Tepliashina,² * R. F. Nasyrova² *

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 196064,
and ² V. M. Bekhterev Research Psychoneurologic Institute, St. Petersburg, 192019;
* e-mail: snopov@incras.ru; npter@yandex.ru; tepvera@gmail.com; reginaf@bekhterev.ru

In order to study in vitro the toxic and metabolic effects of antipsychotic drugs (AP) on the cells of hepatic origin we used human hepatoblastoma cell line HepG2. We cultured HepG2 cells in the presence of two AP of the first and second generations (haloperidol and olanzapine, respectively) adding them to the culture medium in concentrations that may at the therapeutic use of AP take place in liver and other tissues of a high lipid content. In the process of cultivation, we detected several products of carbohydrate and lipid metabolism, measured activity of four hepatocellular enzymes in the culture medium, and estimated cell viability/proliferation in the MTS-test. We observed that both AP performed a toxic effect on HepG2 cells, the effect was manifested by a decrease in cell viability/proliferation and an increase in alkaline phosphatase activity in the culture medium. The toxic effect of olanzapine was less pronounced in comparison to haloperidol. According to the data from literature, AP upregulate the expression of lipogenesis genes in the cells of central nervous system, adipose tissue and liver, that might lead to hyperlipidemia. However, we observe in our experiments no increase in the levels of total cholesterol, of cholesterol in lipoproteins of high and low density, of triglycerides in the culture medium containing haloperidol or olanzapine. That observation may have been due to the fact that both AP, which are cationic amphiphiles, are capable to inhibit intracellular traffic of lipids. We also found no effects of haloperidol and olanzapine on the activity of aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase, while both AP did reduce the alanine aminotransferase activity. Our work proves that HepG2 cells can be helpful as an in vitro model to obtain new data on metabolic effects of drugs on the cells of hepatic origin and to assess the risk of a drug hepatotoxicity in preclinical studies.

Key words: cell cultures, hepatocytes, hepatotoxicity, lipid metabolism, carbohydrate metabolism, metabolism disorders, antipsychotics.