

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-10-8-12

## ВЛИЯНИЕ ГАЛОПЕРИДОЛА НА МЕТАБОЛИЗМ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК HEPG2 *IN VITRO*

Р. Ф. Насырова<sup>1</sup>, Е. И. Сахенберг<sup>2</sup>,  
Н. П. Терюкова<sup>2</sup>, С. А. Снопов<sup>2,\*</sup>

Проведена оценка метаболического и токсического влияния галоперидола на клетки печеночного происхождения на экспериментальной модели *in vitro*. Клетки гепатобластомы человека HepG2 культивировали в присутствии галоперидола (в концентрациях, близких к тем, в которых препарат обнаруживается в крови и тканях при применении в терапевтических дозах) и проводили количественное определение продуктов углеводного, липидного обменов и активности ферментов в среде культивирования, а также показателя жизнеспособности/пролиферации клеток в MTS-тесте. Установлено, что галоперидол не оказывает непосредственного влияния на потребление глюкозы клетками HepG2 и не изменяет уровень липидов во внеклеточной жидкости, но обладает токсическим действием, угнетая жизнеспособность/пролиферацию клеток, согласно снижению оптической плотности (для света с длиной волны 492 нм) среды с тетразолием, восстановленным культивируемыми клетками, — в среднем на 0,135 ед. и 0,077 ед. через 16 ч и на 0,177 ед. и 0,282 ед. ( $p \leq 0,04$ ) через 88 ч в присутствии 1 и 2 мкг/мл галоперидола, соответственно, по сравнению с клетками без препарата, и увеличивая активность щелочной фосфатазы в среде культивирования (в среднем, на 2,46 и 4,34 ед./л через 36 ч и на 8,88 и 14,09 ед./л ( $p \leq 0,05$ ) через 132 ч в присутствии 1 и 2 мкг/мл галоперидола, соответственно. На основании полученных данных можно предположить, что обнаруживаемые при применении галоперидола изменения углеводного и липидного обменов реализуются не только через непосредственное влияние на клетки печени, синтезирующие данные метаболиты, но и через центральные механизмы — нервную и гормональную регуляцию их синтеза.

**Ключевые слова:** галоперидол; побочные эффекты; гепатоциты; клеточные культуры; метаболизм; жизнеспособность; *in vitro*.

### ВВЕДЕНИЕ

Метаболические нарушения, возникающие при назначении антипсихотических средств (АПС), являются частой причиной прекращения применения этих препаратов и, следовательно, становятся клинически значимой проблемой. Показано, что АПС могут обладать негативным влиянием, в первую очередь, на углеводный и липидный обмен, которое проявляется повышением массы тела пациентов, развивающейся резистентностью к инсулину, изменениями уровня глюкозы и липидов в крови [3, 4]. С самого начала клинического применения АПС (в первую очередь, галоперидола, а затем и других АПС, как первой, так и второй генерации) обнаружилась их гепатотоксичность. Так, увеличение содержания в плазме щелочной фосфатазы, отражающее ухудшение функционального состояния печени, выявляется при приеме галоперидола у большинства пациентов [14].

Считают, что метаболические нарушения и гепатотоксическое действие могут быть обусловлены как центральными, так и периферическими эффектами галоперидола и других АПС. Предполагают, что при метаболизме АПС в клетках печени, их окислении с участием цитохрома P450 (CYP3A4) и сульфатировании образуются токсические вещества, нарушается синтез холестерина и т.д. [6, 10].

Одним из подходов, позволяющих оценить прямое (без участия центральных механизмов) действие препаратов на клетки, является моделирование *in vitro*. В качестве эффективных *in vitro* моделей гепатоцитов для исследований токсичности в последние годы успешно используются несколько линий клеток гепатоцеллюлярного происхождения (HepG2, Hep3B, Huh7, HepaRG) [5].

Цель настоящей работы — оценка на экспериментальной *in vitro* модели с использованием клеток печеночного происхождения HepG2 непосредственного токсического действия галоперидола и его возможного вклада в развитие нарушений углеводного и липидного обменов.

<sup>1</sup> ФГБУ “НМИЦ ПН имени В. М. Бехтерева” Минздрава РФ, Отделение персонализированной психиатрии и неврологии, Россия, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 3.

<sup>2</sup> ФГБУН “Институт цитологии РАН”, Россия, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4.

\* e-mail: reginaf@bekhterev.ru

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на клетках постоянной линии НерG2 гепатобластомы человека [12] из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН.

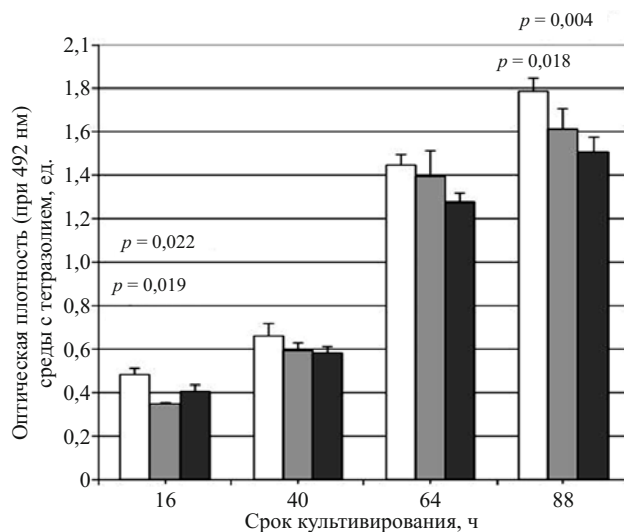
Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри (Orange Scientific, Бельгия) в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С, в полной питательной среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10 % сыворотки телят Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина.

В контрольных чашках клетки высевали и культивировали в питательной среде без добавления галоперидола, в опытных чашках — в среде, содержащей галоперидол (Gedeon Richter, Венгрия) в 2 конечных концентрациях — 1 и 2 мкг/мл. Данные концентрации в несколько раз превышают те, что могут возникать в крови при введении препарата в максимальных терапевтических дозах (60 мг в сутки), но соответствуют дозам катионных амфифилов (к ним относится галоперидол), применяющихся при изучении их действия на клетки *in vitro* [2, 7]. Учитывали, что вследствие высокой липофильности многие АПС (в частности, галоперидол и клозапин) накапливаются в богатых липидами тканях (например, в ЦНС) до уровней, в 10–30 раз превышающих их концентрации в крови [8].

В качестве маркеров функционального состояния клеток проводили количественное определение в культуральной жидкости следующих биохимических показателей: глюкозы, холестерина, липопротеидов высокой и низкой плотности, триацилглицеридов, аланин-аминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтрансферазы.

На 2 фиксированных сроках — (36 ± 2) ч (время завершения периода адаптации клеток к условиям культивирования) и 132 ± 2 ч (время активного роста культуры) — из всех чашек отбирали по 0,5 мл культуральной среды и измеряли в ней концентрации глюкозы, общего холестерина (ХС), ХС липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП), ХС липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛПНП), триглицеридов, а также активность аланин-аминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы и щелочной фосфатазы. Измерения проводили с использованием реагентов Randox (Великобритания), согласно протоколам фирмы-производителя, на автоматическом биохимическом анализаторе Sapphire 400 (Токуо Воэки Machinery Ltd, Япония).

Для оценки интегрального токсического действия галоперидола использовали показатель численности жизнеспособных клеток при их культивировании, который определяли колориметрически с помощью MTS-теста (по восстановлению тетразолия). Вносили по 0,1 мл суспензии с концентрацией клеток 5 · 10<sup>4</sup>/мл в лунки 4 плоскодонных 96-луночных планшетов; клетки каждого образца сеяли в 4 повторах. Планшеты



Жизнеспособность/пролиферация клеток НерG2 в присутствии галоперидола.

Оптическая плотность окрашенной питательной среды в MTS-тесте при культивировании клеток линии НерG2 в образцах без добавления галоперидола в среду культивирования (контроль, светлые столбики) и с добавлением галоперидола в концентрации 1 мкг/мл (серые столбики) и 2 мкг/мл (темные столбики). Скобки и цифры над столбиками показывают достоверное отличие (*p*) показателя среды с галоперидолом от контроля на данном сроке культивирования. По оси абсцисс — срок культивирования, ч, по оси ординат — оптическая плотность (для света с длиной волны 492 нм) культуральной среды с восстановленным тетразолием, ед.

содержали во влажной атмосфере CO<sub>2</sub>-инкубатора при 37 °С. Через 16, 40, 64 и 88 ч инкубации забирали для тестирования по одному планшету, добавляли в его лунки по 20 мкл реагента CellTiter 96 Aqueous One Cell Proliferation Assay (Promega, США) и через 1,5 ч измеряли оптическую плотность среды при 492 нм с помощью фотометра с вертикальным лучом Titertek Multiskan (Финляндия). Величина оптической плотности среды в лунках планшета пропорциональна содержанию в них живых клеток, и последовательные ее измерения отражали рост численности таких клеток в результате пролиферации.

Всего провели 4 отдельных эксперимента по культивированию клеток при трехкратном повторении посевов в каждом из вариантов эксперимента (без галоперидола и с галоперидолом в концентрациях 1 и 2 мкг/мл).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 21.0. Проверку на нормальность распределения данных проводили с использованием критерия Колмогорова — Смирнова с поправками Лиллиефорса. Рассчитывали среднее ( $\bar{X}$ ) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Для обработки зависимых переменных применяли критерий Стьюдента для связанных выборок в случае нормального распределения. В случае отсутствия нормального распределения применяли критерий Уилкоксона. Различия считали значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биохимические показатели функционального состояния клеток линии HepG2 в обычной среде культивирования, содержащей питательные вещества (контроль), и в той же среде с добавлением в нее галоперидола представлены в таблице.

Культивирование клеток как в присутствии, так и в отсутствие галоперидола, сопровождалось значительным снижением уровня глюкозы в среде на протяжении всего эксперимента (в 4 – 6 раз,  $p = 0,001$ ), очевидно, в результате потребления глюкозы клетками в процессе их жизнедеятельности и репликации.

При этом на сроке 132 ч суммарное потребление глюкозы популяцией клеток в присутствии галоперидола оказывалось достоверно ниже, чем в контроле. Простой расчет удельного потребления (снижение содержания глюкозы в среде, деленное на количество живых клеток) показал, что больше глюкозы оставалось в среде в присутствии галоперидола не вследствие его угнетающего действия на ее потребление индивидуальными клетками, а вследствие уменьшения численности живых клеток (рисунок).

При определении показателей липидного обмена исследуемых клеток HepG2 выяснилось, что уровни

ХС, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП и триглицеридов в среде культивирования, независимо от присутствия галоперидола, значимо не изменялись на протяжении всего эксперимента (таблица). Таким образом, влияния галоперидола на эти показатели у клеток HepG2 (в исследованных концентрациях препарата и в условиях проводившегося культивирования) не обнаружили и в том числе не выявили увеличения выхода холестерина из клеток под действием галоперидола.

Известно, что содержание липидов и их распределение внутри клетки строго регулируется сложными механизмами обратной связи, контролирующими синтез, этерификацию, поглощение и выведение холестерина из клетки [13]. Так, холестерин, поступающий в эндоплазматический ретикулум, может этерифицироваться в качестве запасной формы и/или связываться со стерол-регуляторными-элемент-связывающими белками семейства SREBP (sterol-regulatory-element-binding protein) [15]. Показано, что под влиянием галоперидола может происходить накопление внутриклеточного холестерина и ЛПНП в эндо-лизосомах вследствие уменьшения их перехода в эндоплазматический ретикулум и транс-Гольджи [4, 9]. Снижение уровня холестерина в мембранах ретикулума сочетается с ак-

### Влияние галоперидола на биохимические показатели функционального состояния культивируемых клеток линии HepG2 ( $M \pm m$ )

Показатель	Срок тестирования					
	контроль (без препарата)	1 точка (36 ч культивирования)		контроль (без препарата)	2 точка (132 ч культивирования)	
		галоперидол			галоперидол	
		1 мкг/мл	2 мкг/мл		1 мкг/мл	2 мкг/мл
Глюкоза, ммоль/л	18,70 ± 0,13	18,85 ± 0,08	18,93 ± 0,07	2,56 ± 0,17 <sup>#</sup>	3,64 ± 0,21*	4,47 ± 0,30
ХС, ммоль/л	0,05 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,04
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,002	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
ХС-ЛПНП, ммоль/л	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,16 ± 0,02
Триглицериды, ммоль/л	0,14 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,03
Аланин-амино-трансфераза, ед./л	5,48 ± 0,82	5,00 ± 0,83	5,52 ± 0,63	10,79 ± 0,63 <sup>↑</sup>	9,70 ± 1,96	7,14 ± 0,83
Аспартат-аминотрансфераза, ед./л	3,41 ± 0,18	3,25 ± 0,32	3,16 ± 0,35	44,43 ± 5,83 <sup>↑</sup>	42,66 ± 7,11	37,83 ± 8,69
Гамма-глутамил-трансфераза, ед./л	0,28 ± 0,16	0,54 ± 0,31	0,70 ± 0,35	3,66 ± 0,93 <sup>↑</sup>	4,56 ± 1,17	2,89 ± 1,26
Щелочная фосфатаза, ед./л	68,98 ± 0,49	71,44 ± 0,34*	74,32 ± 0,59**	49,43 ± 0,70 <sup>↓</sup>	58,31 ± 2,45*	63,52 ± 1,51**

Примечания:

<sup>↑</sup> и <sup>↓</sup> – достоверное снижение или повышение параметра ко 2-му тестированию при культивировании без галоперидола ( $p = 0,001 - 0,049$ );

\* достоверное отличие параметра при культивировании с галоперидолом в концентрации 1 мкг/мл по сравнению с контролем на том же сроке тестирования ( $p = 0,001 - 0,002$ );

\*\* достоверное отличие параметра при культивировании с галоперидолом в концентрации 2 мкг/мл по сравнению с контролем на том же сроке тестирования ( $p = 0,001 - 0,018$ ).

тивацией белков SREBP и генов-мишеней (липогенных генов) данных транскрипционных факторов в ответ, например, на АПС терапию [4, 7, 8].

Указанное влияние галоперидола на распределение холестерина и липидов внутри гепатоцитов может и не сопровождаться значимыми изменениями в их содержании вне гепатоцитов, и, как показали наши эксперименты, в среде культивирования клеток НерG2. Данный вывод вполне согласуется с тем фактом, что применение галоперидола или рисперидона не приводит, в отличие от клозапина и оланзапина, к повышению общего холестерина в крови у взрослых пациентов с шизофренией [11].

Установлено, что культивирование клеток НерG2, безотносительно присутствия галоперидола в среде, сопровождалось изменениями активности всех тестируемых нами трансфераз, имеющих ключевое значение в белковом обмене (таблица). Так, на сроке 132 ч в среде культивирования происходило увеличение активности аланинамино-трансферазы — примерно вдвое, по сравнению первым сроком тестирования ( $p = 0,005$ ), активности аспартатаминотрансферазы — на порядок ( $p = 0,001 - 0,008$ ) и активности гамма-глутамилтрансферазы — на порядок ( $p = 0,008$ ). В то же время активность щелочной фосфатазы достоверно снижалась примерно на одну треть ( $p = 0,001$ ).

Галоперидол избирательно воздействовал только на щелочную фосфатазу. Уже на первом сроке тестирования в присутствии галоперидола ее активность оказывалась достоверно выше, чем в контроле, при обеих концентрациях препарата ( $p = 0,002$  и  $p = 0,001$ ). Более высоким, чем в контроле, уровень щелочной фосфатазы сохранялся и после 136 ч культивирования при обеих концентрациях галоперидола ( $p = 0,005$  и  $p = 0,001$ ).

Известно, что повышение активности щелочной фосфатазы наблюдается при различных видах поражения печеночных клеток, например, лекарственными препаратами, желчью, токсинами при опухолевом процессе, при вирусных гепатитах, мононуклеозе и др. [1]. В наших экспериментах повышение уровня щелочной фосфатазы в присутствии галоперидола в среде культивирования отражает его токсическое действие на клетки НерG2, приводящее к гибели и разрушению клеток.

Анализ пролиферативной активности/жизнеспособности клеток НерG2 показал, что численность их популяции за период с 16 до 88 ч культивирования возрастала примерно в 4 раза (рисунок). При этом на первом и последнем сроках тестирования число жизнеспособных клеток оказывалось при обеих концентрациях галоперидола значимо более низким, чем в контроле. Данный результат также свидетельствует об угнетающем и/или токсическом эффектах препарата на пролиферацию/выживаемость клеток НерG2 в культуре.

## ВЫВОДЫ

1. Галоперидол в концентрациях 1 и 2 мкг/мл (близких к верхней границе терапевтического диапазона и более высоких) не оказывал непосредственного влияния на потребление глюкозы культивируемыми *in vitro* клетками гепатоцеллюлярного происхождения НерG2 и на уровни общего ХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП и триглицеридов в среде культивирования.

2. Галоперидол в обеих концентрациях оказывал непосредственное токсическое действие на клетки НерG<sub>2</sub>, которое проявлялось в уменьшении числа жизнеспособных клеток при их росте (пролиферации) в культуре, выявленном по снижению оптической плотности раствора тетразолия, восстанавливаемого живыми клетками (в среднем на 0,135 и 0,077 ед. через 16 ч и на 0,177 и 0,282 ед. ( $p \leq 0,04$ ) через 88 ч в присутствии 1 и 2 мкг/мл галоперидола, соответственно), а также в повышении активности щелочной фосфатазы в среде культивирования (в среднем, на 2,46 и 4,34 ед./л через 36 ч и на 8,88 и 14,09 ед./л ( $p \leq 0,05$ ) через 132 ч в присутствии 1 и 2 мкг/мл галоперидола, соответственно).

Исследование поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-60025).

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Кишкун, *Руководство по лабораторным методам диагностики*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2009).
2. C. M. Adams, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**(19), 10647 – 10652 (2003).
3. S. L. Balt, G. P. Galloway, M. J. Baggott, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **90**(1), 179 – 183 (2011).
4. A. Canfran-Duque, M. E. Casado, O. Pastor, et al., *J. Lipid Res.*, **54**(2), 310 – 324 (2013).
5. M. T. Donato, R. Jover, M. J. Gomez-Lechon, *Cur. Drug Metab.*, **14**(9), 946 – 968 (2013).
6. J. Fang, G. B. Baker, P. H. Silverstone, R. T. Coutts, *Cell. Molec. Neurobiol.*, **17**(2), 227 – 233 (1997).
7. J. Ferno, M. B. Raeder, A. O. Vik-Mo, et al., *Pharmacogenom. J.*, **5**(5), 298 – 304 (2005).
8. J. Ferno, S. Skrede, A. O. Vik-Mo, et al., *BMC Neuroscience*, **7**, 69 (2006).
9. I. Kristiana, L. J. Sharpe, V. S. Catts, et al., *Pharmacogenomics J.*, **10**(5), 396 – 407 (2010).
10. S. Kudo, T. Ishizaki, *Clin. Pharmacokinet.*, **37**(6), 435 – 456 (1999).
11. J. P. Lindenmayer, P. Czobor, J. Volavka, et al., *Am. J. Psychiatry*, **160**(2), 290 – 296 (2003).
12. D. Lopez-Terrada, S. W. Cheung, M. J. Finegold, B. B. Knowles, *Hum. Pathol.*, **40**(10), 1512 – 1515 (2009).
13. F. R. Maxfield, G. van Meer, *Cur. Opin. Cell Biol.*, **22**(4), 422 – 429 (2010).
14. R. G. McCreddie, I. M. MacDonald, *Br. J. Psychiatry*, **131**(9), 310 – 316 (1977).
15. R. Sato, *Arch. Biochem. Biophys.*, **501**(2), 177 – 181 (2010).

## EFFECT OF HALOPERIDOL ON METABOLISM AND VIABILITY OF HEPG2 CELLS *IN VITRO*

R. F. Nasyrova<sup>1</sup>, E. I. Sakhenberg<sup>2</sup>, N. P. Teryukova<sup>2</sup>, and S. A. Snopov<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> V. M. Bekhterev National Medical Research Center for Psychiatry and Neurology, ul. Bekhtereva 3, St. Petersburg, 192019 Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

\* e-mail: reginaf@bekhterev.ru

Metabolic and toxic effects of haloperidol on cells of hepatic origin have been studied *in vitro* on an experimental model. Human hepatoblastoma HepG2 cells were cultivated in the presence of haloperidol (at concentration close to those detected upon application in therapeutic doses) and then products of the carbohydrate and lipid metabolism and the activity of enzymes in the culture medium, as well as the indices of cell viability/proliferation in the MTS-test, were quantitatively determined. It was established that haloperidol did not directly influence the glucose consumption by HepG2 cells and did not change the lipid levels in extracellular fluid, but produced a toxic action by suppressing the viability/proliferation of cells as manifested by decrease in the optical density at 440 nm wave length for cells in the medium with tetrazolium reduced by cells cultivated in haloperidol-free medium. The optical density of the medium with cells cultured without haloperidol was lower, on the average, by 0.135 and 0.077 units after 16 h and by 0.177 and 0.282 after 88 h ( $\delta = 0.04$ ) in the presence of 1 and 2  $\mu\text{g/mL}$  of haloperidol, respectively. Besides, the toxic effect of haloperidol on the cell growth was manifested by increased activity of alkaline phosphatase in the culture medium (on the average by 2.46 and 4.34 U/L after 36 h and by 8.88 and 14.09 U/L after 132 h,  $p = 0.05$ , in the presence of 1 and 2  $\mu\text{g/L}$  of haloperidol, respectively). On the basis of obtained data, it can be suggested that changes in the carbohydrate and lipid metabolism detected upon the treatment with haloperidol at the level of the whole organism are realized not only through direct influence on the liver cells synthesizing these metabolites, but also through central mechanisms involved in the nervous and hormonal regulation of this synthesis.

**Keywords:** antipsychotics; haloperidol; side effects; hepatocytes; cellular metabolism; viability.