

**Щеглова А.В., Яковлева Е.А., Сичкар Д.А., Makeev O.G.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ПЕПТИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ
ФАБРИЦИЕВОЙ СУМКИ ПТИЦ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Отдел молекулярных и клеточных технологий
и радиоизотопная лаборатория ЦНИЛ
ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

**Shcheglova A.V., Yakovleva E.A., Sichkar D.A., Makeev O.G.
RESEARCH OF EFFECTS OF PEPTIDE EXTRACTS OF BIRDS
FABRICIAN BAG ON CELL PROLIFERATION**

Department of Medical Biology and Genetics
Ural State Medical University
Department of Molecular and Cell Technologies and Radioisotope Laboratory
Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В статье рассмотрен способ получения пептидного экстракта фабрициевой сумки птиц и приведены результаты использования данного экстракта на культурах клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ-3-81).

Annotation. The article describes a method for producing a peptide extract of a bird's Fabrician bag and presents the results of using this extract on human lung embryo cell cultures (HLE-3-81).

Ключевые слова: фабрициева сумка, клеточная пролиферация, культура клеток ЛЭЧ-3-81.

Key words: Fabrician bag, cell proliferation, cell culture HLE-3-81.

Введение

На фармацевтических рынках представлен ряд препаратов, получаемых из животных тканей. Из последних получают вытяжки (пептидные экстракты), а из них - синтетические вещества (цитокины), используемые для создания различных вакцин и биологически активных добавок. Разработки в данном направлении продолжают и на сегодняшний день.

Цель исследования – оценить влияние экстракта, полученного из фабрициевой сумки птиц, на пролиферативные способности клеток культуры ЛЭЧ-3-81.

Материалы и методы исследования

Экстракт был получен из фабрициевой сумки (в дальнейшем – бурса), иссеченной из сырья (молодые цыплята-бройлеры). Извлеченную бурсу отмывали попеременно в растворах хлоргексидина и в физиологическом растворе (0,9 % раствор хлорида натрия). Затем измельченную скальпелем бурсу инкубировали в холодильной камере (при $t=+4^{\circ}\text{C}$). После окончания времени инкубации из раствора механически удалялись крупные частицы бурсы. Раствор центрифугировали 30 минут при 800g и температуре 0°C , осадок утилизировали, супернатант отделяли автоматической пипеткой и помещали в стерильные флаконы. Раствор фильтровали с помощью фильтрационной установки под отрицательным давлением и с диаметром пор 0,22 мкм.

Клеточную культуру ЛЭЧ-3-81 в культуральных флаконах помещали в CO_2 -инкубатор, где хранили при 5% CO_2 , $t=37^{\circ}\text{C}$ и 95% влажности в течение суток. По истечению суток флаконы извлекали из CO_2 -инкубатора. Переводили клетки из монослоя в суспензию и переносили в центрифужную пробирку. Центрифугировали в течение 5 минут при 200g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 2 мл полной питательной среды и проводили подсчет клеток в камере Горяева. Затем проводили посев клеток в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (10^4 клеток в каждой лунке) и помещали планшет в CO_2 -инкубатор.

После 24 часов культивирования к культуре клеток ЛЭЧ-3-81 методом раститровки добавляли различные концентрации пептидного экстракта. В верхние три лунки каждого ряда добавлялась смесь клеток с определенной концентрацией препарата, а в нижние три лунки добавлялась смесь клеток с физиологическим раствором (0,9% раствор хлорида натрия). Каждую концентрацию препарата выполняли в восьми повторностях. В контрольные лунки препарат не добавляли. Планшет с внесенным экстрактом помещался в CO_2 -инкубатор на 24 часа.

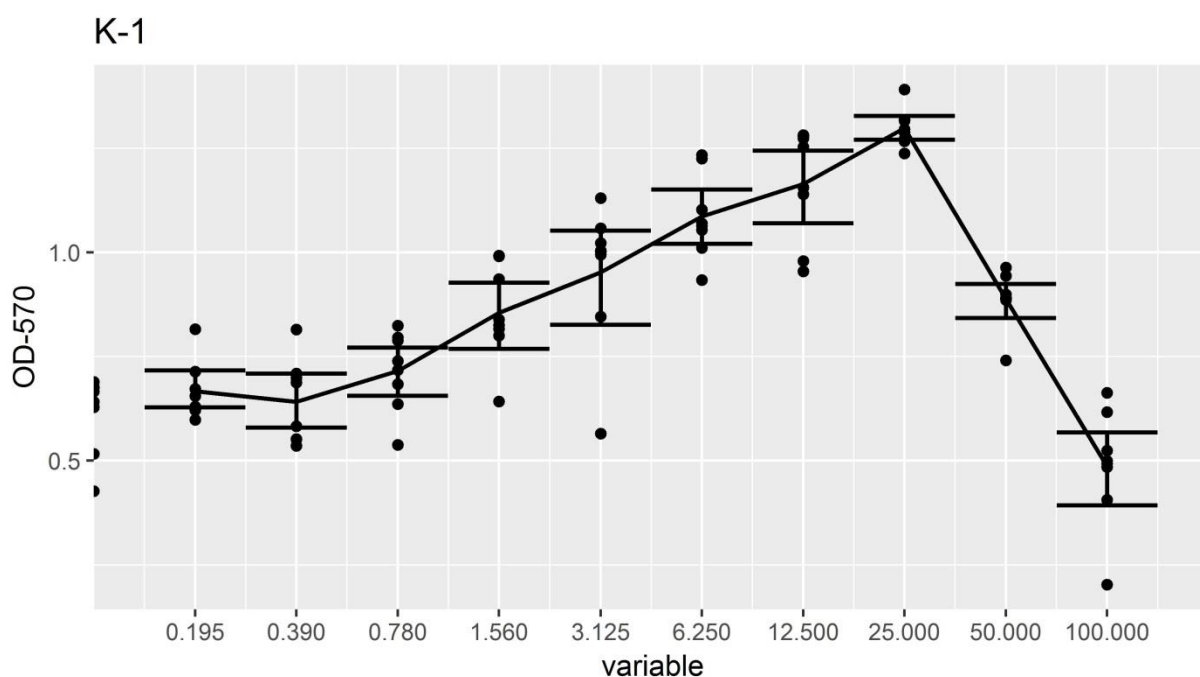
После 24 часов культивирования клеточной линии ЛЭЧ-3-81 с исследуемым экстрактом в каждую лунку культурального планшета вносили по 20 мкл рабочего раствора МТТ. Инкубировали еще 4 часа в условиях CO_2 -инкубатора. Через 4 часа среду в каждой лунке заменяли на лизирующий раствор (DMSO/изопропиловый спирт в соотношении 1:1). Тщательно пипетировали содержимое каждой лунки планшета до растворения кристаллов формазана. С помощью вертикального планшетного спектрофотометра MultiskanGo (ThermoScientific, Финляндия) определяли оптическую плотность каждой лунки при 570 нм, вычитали измеренное фоновое поглощение при 690 нм. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (OD50), определяли на основе дозозависимых кривых.

Жизнеспособность клеток ЛЭЧ-3-81 в присутствии пептидного экстракта рассчитывается по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контр.лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность. При этом ОП не должна превышать 0,05 ед. (по шкале 0,0–1,0). Стандартное отклонение

рассчитывается по формуле: $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$, где x – выборочное среднее значение (число1, число2, ...), n — размер выборки. Концентрация вещества, которая вызывает 50% гибель клеток (OD50), рассчитывается графически по дозозависимой кривой с помощью программного обеспечения R-Studio (R-ToolsTechnology). Значение функции рассчитывается по формуле: $y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{\log_{10} \frac{0-x}{p}}}$, а значение OD50 по формуле: $EC_{50} = 10^{\log x^0}$.

Результаты исследования и их обсуждение

Динамические изменения интенсивности образования кристаллов формазана в культуре клеток линии ЛЭЧ-3-81 свидетельствуют о повышении ферментативной активности клеток (повышение синтеза митохондриальных оксидоредуктаз), что косвенно указывает на повышение пролиферативной активности клеток. Максимальные значения наблюдались при добавлении препарата в концентрации 25%. Добавление препарата в минимальной концентрации (0,195%) незначительно повысило ферментативную активность клеточной культуры. Полная замена культуральной среды на исследуемый экстракт не привела к гибели клеток, однако снизила синтез внутриклеточных ферментов по сравнению с группой контроля. В результате эксперимента было установлено, что исследуемый образец не обладает цитотоксическим



эффектом. Результаты исследования представлены на рисунке 1.

Рис. 1. График дозозависимой кривой экстракта из бursy в отношении культуры клеток ЛЭЧ-3-81. Доверительный интервал +/- CI-95%.

Также в процессе исследования пептидного экстракта были определены условия его хранения. По результатам исследований, хранение раствора при температуре -20°C (и более) оптимально, так как такая температура позволяет

сохранить полезные свойства препарата. Хранение экстракта при температуре +4°C приводит к образованию осадка и помутнению раствора, в результате чего для дальнейшего его применения требуется дополнительная фильтрация в стерильных условиях. Однако, на полезные свойства опытного образца это не влияет – результаты МТТ–теста незначительно отличались от результатов исследований того же раствора с условиями хранения -20° С. Результаты исследования представлены на рисунке 2.

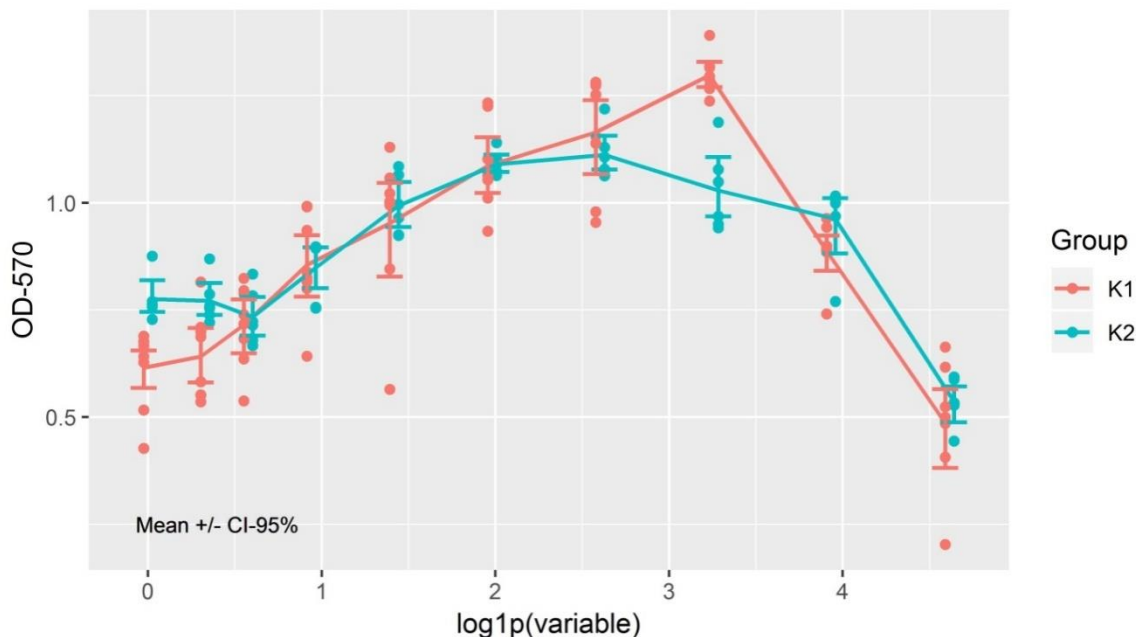


Рис. 2. Сравнительная характеристика влияния пептидного экстракта на пролиферативную активность культуры клеток ЛЭЧ-3-81. Группа К1 – хранение при -20°C (и более); группа К2 – хранение при +4° С. Доверительный интервал +/- CI-95%

Выводы:

1. Пептидный экстракт из фабрициевой сумки птиц не обладает цитотоксическим эффектом в отношении культуры клеток ЛЭЧ-3-81.

2. Рекомендуемые условия хранения данного опытного образца для сохранения полезных свойств – при температуре -20°C и более.

3. Хранение при температуре +4°C (в условиях обычной холодильной камеры) приводит к образованию осадка и помутнению раствора, что вынуждает проводить дополнительную фильтрацию. Однако на полезные свойства экстракта это не влияет.

Список литературы:

1. Gianoli A. C. Revitalisationstherapie in Klinik und Praxis //Z. praeklin. Geriatrie. – 2015. – Т. 5. – С. 186-192

2. Hagmeier W. et al. Successful treatment of cancer patients using immunotherapy with lyophilisate of the fetal mesenchyme // Cytobiol. Rev. - 2016. - Т. 3. - S. 10-14

3. Renner H. Clinical aspects of tumor immunotherapy with liophilized fetal cells // Cytobiol. Rev. - 2018. - Т.3. - С.3-6