

УДК 577.32.579

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПОИСКА И ДОКЛИНИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ
С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУР КЛЕТОК**

¹Чиркин А.А., ²Абакумова О.Ю., ³Зафранская М.М., ¹Толкачева Т.А.

¹*Витебский государственный университет им. П.М.Машерова, г. Витебск*

²*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАН им. В.Н.Ореховича,
г. Москва, Россия*

³*Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск*

Поиск активных субстанций природного происхождения и их скрининг на доклиническом этапе исследования является трудной и затратной проблемой. Правила GLP предусматривают целый комплекс исследований с использованием различных видов лабораторных животных, перечень тканей для гистологического исследования, набор тестов для оценки морфо-функционального состояния систем и биохимического статуса организма. В этих условиях целесообразен первичный анализ возможных биологических

эффектов, сопряженных с действием биофармацевтических субстанций, с использованием нормальных, трансформированных и стволовых клеток.

Целью данного сообщения явилась оценка биофармацевтических субстанций антиоксидантного действия, появляющихся в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда (*Antheraea perni*) в результате гистолиза тканей гусеницы V возраста [1].

Материал и методы. Для разделения гемолимфы куколок дубового шелкопряда использовали колонку диаметром 2,5 см и объемом 130 мл, заполненную сефадексом G25 fine, уравновешенную 0,01 М NH_4HCO_3 . Собирали фракции объемом 3 мл со скоростью 3 мин/фракция. Анализ элюатов (пробирки 1-53) проводили путем спектрофотометрии при 210, 260 и 280 нм. Для культивирования клеток жирового тела куколки использовали среды: 1) модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 4,5 г/л с добавкой 10% эмбриональной телячьей сыворотки; pH доведен до 6,3 добавкой NaH_2CO_3 0,2М; 2) модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 1 г/л с добавкой 20% эмбриональной телячьей сыворотки; pH доведен до 6,3 добавкой HCl; 3) среда 199 с добавкой 20% эмбриональной телячьей сыворотки; pH доведен до 6,3 добавкой HCl. Для культивирования клеток жирового тела и гемолимфы использовали модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 1 г/л с добавкой 10% эмбриональной телячьей сыворотки; pH 8. Культивирование: клетки ($3,2 \cdot 10^7$ клеток жирового тела или $2 \cdot 10^5$ клеток гемолимфы) высевали в чашки Петри (21 см²) в 4 мл среды и инкубировали во влажном эксикаторе при 27⁰С. По истечении 1 суток проводили смену среды для удаления неприкрепившихся клеток. Окраска ядер: клетки инкубировали 15 минут в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с добавкой флуоресцентного красителя Хехст-33342 (по 10⁻⁵ М) или красителей Хехст-33342 и йодистый пропиций (по 10⁻⁵ М). На втором этапе исследования изучали влияние фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда, содержащих пептиды, на культивирование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани крыс (ЖТК). Окраска CFSE: МСК ЖТК крысы, полученные трипсинизацией 3-го пассажа при конфлюэнтности ≈75%, дважды в отмытые в ФСБ с добавкой 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (РНПЦ ЭиМ, РБ), ресуспендировали до концентрации 10⁶ клеток/мл в ФСБ с добавкой 10% ЭТС и 7мМ CFSE. Инкубировали 10 минут (37⁰С, атмосфера 5% CO₂, влажность 99%) и дважды отмывали в ФСБ с добавкой 5% ЭТС [2]. Материал фракций гемолимфы использовали для определения цитотоксической активности в опытах *in vitro* в культуре фибробластов и трансформированных клеток. Линии клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), Skov 3 (аденокарцинома яичника), Hep G2 (гепатокарцинома) были получены из American Type Culture Collection (США), НГУК-1 (невринома Гассерова узла крыс) – из коллекции НИИ морфологии человека РАМН. Фибробласты кожи здоровых людей (ФБЧ), которые использовали в эксперименте только на 2-8 пассажах, были получены из лаборатории биотехнологии ММУ им.

Н.М.Сеченова. Остальные линии клеток брались из коллекции НИИ БМХ им. В.Н.Ореховича РАМН. Культивирование клеток производили во влажной атмосфере (5% CO₂, 37⁰C). Использовали среды DMEM, RPMI 1640, а также термоинактивированные эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и лошадиную сыворотку (ЛС) фирмы «Gibco» США. Оценивали цитотоксичность с помощью МТТ-теста. Для оценки скорости синтеза белка или ДНК к клеткам добавляли за 5 часов до окончания эксперимента 1 μCi/лунку [¹⁴C]-аминокислоты или 1 μCi/лунку [¹⁴C]-тимидина (Чехия, препараты с активностью 100 mCi/mmol и 56 mCi/mmol, соответственно) [3].

Полученные результаты и обсуждение. В результате хроматографии на колонке с сефадексом G25 fine получены более 50 фракций, в которых судя по величинам поглощения при 210, 260 и 280 нм, содержатся три группы веществ: полимеры (возможно, белки и нуклеопротеины), пептиды и низкомолекулярные биорегуляторы. Пептиды находятся во фракциях 10-32. Установлено, что гемолимфа куколок в первой четверти диапаузы обогащается продуктами гистолиза тканей, поскольку выявлена интенсивная гибель резидентных и циркулирующих клеток по механизмам апоптоза. Пептиды такой гемолимфы обладают способностью подавлять жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток крыс. Следовательно, продолжается гистолиз тканей и цитолиз клеток куколок, что может быть использовано в биотехнологии для получения фармацевтических субстанций. При исследовании влияния пептидсодержащих фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда установлено, что фракции 18-22 подавляли рост клеток гепатомы Нер G2, иммортализованных аденовирусом 5 типа эмбриональных клетки почек человека 293Т и клеток карциномы молочной железы MCF7. Рост клеток невриномы гассерова узла крысы НГУК1 и клеток карциномы шейки матки HeLa частично ингибировался компонентами фракций 10-13. Выявлены эффекты стимуляции роста клеток *in vitro* фракциями гемолимфы, расположенными рядом с фракциями, ингибирующими рост трансформированных клеток. В противоположность действию большинства исследованных культур трансформированных клеток, рост фибробластов не подавлялся, а даже усиливался компонентами фракций 19 и 20. Кроме того, активировали рост фибробластов также компоненты фракций 31 и 32. Интенсивность включения метки в ДНК клеток гепатомы Нер G2 практически полностью совпадает с влиянием их на рост клеток в культуре (подавление включения метки фракциями 20-24 и повышение интенсивности включения меченого тимидина фракциями 26-32). Для клеток карциномы толстого кишечника COLO 320 выявлены две области ингибирования включения меченого тимидина в ДНК (фракции 12, 13, а также 23-28) и две области стимуляции синтеза ДНК в клетках (фракции 15-22 и 30-32). При регистрации включения меченых аминокислот в белки культивируемых трансформированных клеток получен достаточно большой разброс данных по влиянию компонентов рядом расположенных фракций гемолимфы. В клетках карциномы толстого кишечника фракции гемолимфы 12-13 оказывали проти-

воположное влияние на интенсивность включения меченых предшественников в ДНК (ингибирование) и в белки (стимуляция).

Вывод: клеточные культуры являются удобным объектом для скринингового исследования свойств биофармацевтического сырья, поиска биологически активных субстанций, оценки их цитотоксичности и изучения характера биологического эффекта (подавление, стимуляция синтеза ДНК и белков), типа гибели клеток (апоптоз, некроз).

Литература:

1. Chirkin, A.A. Biological effects of C200 Oak Silkworm Pupae's hydrophilic components / A.A. Chirkin [et al.] // *Homoeopathic Lincs. Internat. Journ. Classical Homoeopathy*. – 2011. – Vol. 24, № 3/11. – P. 195-197.
2. Чиркин, А.А. Жизнеспособность клеток куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин, М.М. Зафранская, Т.А. Толкачова // *Вісник ВДУ*. – 2011. – № 1 (61). – С. 30-36.
3. Чиркин, А.А. Исследование цитотоксического действия антиоксидантного комплекса из куколок дубового шелкопряда на культуры трансформированных клеток / А.А. Чиркин [и др.] // *Вісник ВДУ*. – 2011. – № 5 (65). – С. 43-48.

OPTIMIZATION OF SEARCH AND PRE-CLINICAL STUDIES OF BIOPHARMACEUTICAL SUBSTANCES WITH THE HELP OF CELL CULTURES

Chirkin A.A., Abakumova O.Yu., Zafranskaya M.M., Tolkacheva T.A.

Cell cultures are a convenient object for studying the properties of biopharmaceutical screening of raw materials, searching for biologically active substances, evaluation of their cytotoxicity and explore the nature of the biological effect. (inhibition, stimulation of DNA and protein synthesis), a type of cell death (apoptosis, necrosis).