

**ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК
НА ПРИСУТСТВИЕ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ЦИТОКИНОВ**
**STUDYING THE RESPONSE OF CELL CULTURES
TO THE PRESENCE OF CYTOKINES IN THE NUTRITIONAL MEDIUM**

Э. М. Плотникова, И. А. Нестерова, Р. Н. Низамов
E. M. Plotnikova, I. A. Nesterova, R. N. Nizamov

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,
420075, г. Казань, Россия, Научный городок-2
vnivi@mail.ru

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyi Gorodok-2,
Kazan city, 420075, Russia

В настоящее время в медицине и ветеринарии нашли широкое применение иммуномодуляторы нового поколения – цитокины. Цитокины активны в очень малых концентрациях, они регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной системы. Учитывая на высокую биологическую активность для клеток животного, растительного и микробного происхождения *in vivo* и *in vitro*, были проведены исследования, целью которых было изучение возможности использования цитокинов в качестве активаторов метаболизма культур клеток животных *in vitro* для репродукции на них вирусов. В опытах использовали культуры клеток MDBK и ВНК-21/13-02, полученные из коллекции культур клеток ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Для выращивания культур клеток использовали питательные среды: Игла MEM, раствор Версена, трипсина, Хэнкса, сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС), сыворотки крови плодов (СКПК). В качестве активаторов метаболизма клеток использовали коммерческие цитокины: IL-3, IL-6, колоностимулирующий фактор – G-CSF производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Экспериментальным путем определяли стимулирующие и ингибирующие дозы цитокинов и добавляли в среды с культурами клеток из расчета 30 до 500 пг/см³. Установлено, что из испытанных классов цитокинов наиболее активным оказался интерлейкин – 6 (IL-6), которой при внесении в ростовую среду в концентрации 30–60 нг/см³ оказывал метаболизмстимулирующий эффект, обеспечивая индекс пролиферации клеток линии MDBK в 1,33 раза и линии клеток ВНК-21/13-02 – в 1,17 раза соответственно.

Currently, a new generation of immunomodulators, cytokines, are widely used in medicine and veterinary medicine. Cytokines are active in very low concentrations, they regulate the proliferation and differentiation of cells of the immune system. Taking into account the high biological activity for cells of animal, plant and microbial origin *in vivo* and *in vitro*, we conducted the present studies, the purpose of which was to study the possibility of using cytokines as activators of the metabolism of animal cell cultures *in vitro* for the reproduction of viruses on them. In the experiments, cell cultures MDBK and VNK-21/13-02 obtained from the collection of cell cultures of the Federal State Budget Scientific Institution FSBSI «FCTRBS-ARRVI» were used. Nutrient media were used for growing cell cultures: Needle MEM, solution of Versen, trypsin, Hanks, bovine blood serum (BRS), fetal blood serum (FBMS). As activators of cell metabolism, commercial cytokines were used: IL-3, IL-6, colon-stimulating factor G-CSF produced by Cytokin LLC (St. Petersburg). Stimulating and inhibitory doses of cytokines were experimentally determined and added to media with cell cultures at the rate of 30 to 500 pg/cm³. It was found that among the tested classes of cytokines, interleukin-6 (IL-6) turned out to be the most active, which, when introduced into the growth medium at a concentration of 30-60 ng/cm³, had a metabolism-stimulating effect, providing a proliferation index of MDBK cells by 1.33 times and cell lines VNK-21/13-02 – 1.17 times, respectively.

Ключевые слова: культура клеток, цитокины, антигены, гомогенность, конфлюэнтный монослой.

Keywords: cell culture, cytokines, antigens, homogeneity, confluent monolayer.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-7-10>

Введение. К системе цитокинов в настоящее время относят около 200 индивидуальных полипептидных веществ [2, 9]. Все они имеют ряд общих биохимических и функциональных характеристик, среди которых важнейшими считаются следующие: плейотропность и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, проведение сигнала путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами, формирование цитокиновой сети [3,7]. Учитывая, что для длительного культивирования клеток крови и стволовых клеток костного мозга необходим ряд клеточных факторов, включающих цитокины (SCF, IL-3, IL-6, G-CSF) [9], использование полимеров (поли-(И), поли-(С) и ДЭАЭ-декстрана), являющихся индукторами цитокинов и интерферона [5], позволили бы достичь значительных успехов в биотехнологии, клеточной и генной инженерии.

Известно, что в настоящее время эффективными, стимулирующими рост средствами являются, например, рекомбинантные цитокины (интерлейкины, эритропоэтин, колониестимулирующие факторы), производные

гликозаминогликанов (D-глюкуроновая кислота, N-ацетилнейраминовая кислота, глицирам), эпидермальный фактор роста, гепаринсвязывающие факторы роста и многие другие [6].

Цитокины оказывают влияние практически на все клетки, воздействуя на большинство процессов, протекающих в организме [1, 8].

Первые методы по обнаружению цитокинов были связаны с определением их активности, культивированием иммунокомпетентных клеток и клеточных линий.

Использование цитокинов имеет ряд преимуществ перед другими препаратами (вакцины, сыворотки): во-первых, небольшие дозы цитокинов индуцируют интенсивный иммунный ответ и запускают синтез собственных медиаторов; во-вторых, многие цитокины обладают полифункциональностью (например, интерферон – ИНФ), оказывая противовирусное, антибактериальное, противоопухолевое действие, в-третьих, применение цитокинов может сочетаться с другими медиаторами, вакцинами, антибиотиками, сыворотками и т.д. [4]. Согласно данным ряда исследователей, цитокины представляют собой регуляторные пептиды, которые продуцируются почти всеми кариотическими клетками.

Поэтому есть основание предположить, что цитокины могут быть использованы в качестве ростстимулирующего фактора при культивировании клеток животных в искусственных условиях (*in vitro*) для репродукции вирусов при изготовлении вакцинных препаратов.

Однако эти исследования единичны и поэтому не дают полного представления о роли цитокинов в клеточной биотехнологии.

С учетом актуальности проблемы, проводили настоящие исследования, целью которых было изучение возможности использования цитокинов в качестве активаторов метаболизма культур клеток животных *in vitro* для репродукции на них вирусов.

Материалы и методы исследований. В исследованиях использовали питательные среды: Игла МЕМ, раствор Версена, трипсина, Хэнкса, сыворотку крови крупного рогатого скота (СККРС), сыворотку крови плодов коровы (СКПК). Культуры клеток пересеивали с коэффициентом пассирования 1:2-1:3. В качестве паспортизированных клеточных культур использовали 2 линии перевиваемых клеток: MDBK, ВНК 21/13-02, полученные из коллекции культур клеток ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Рабочие растворы цитокинов готовили согласно патенту РФ [4].

Результаты исследований. Влияние цитокинов на культуры клеток изучали методом их совместного культивирования после 24-часового культивирования, клеточный монослой исследовали с помощью инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse TS 100) по следующим параметрам: процент покрытия поверхности, форма клеток, количество клеточных агрегатов.

Результаты оценки влияния испытуемых цитокинов на культуры клеток представлены на рисунке 1.

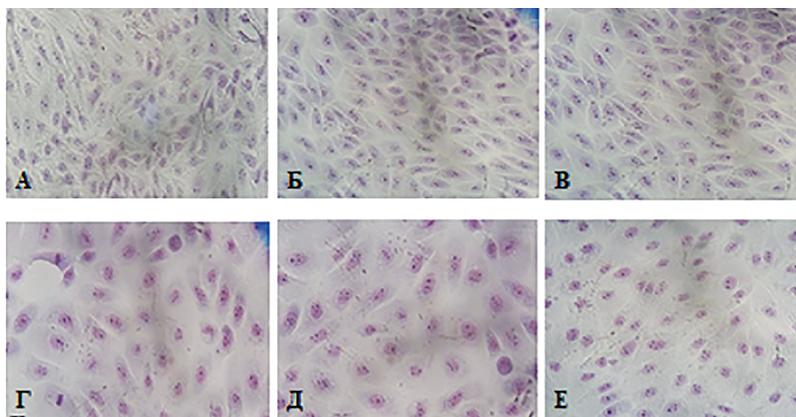


Рисунок 1 – культуры клеток: ВНК-21-13/02 – А – контроль, Б – IL-6, В- G-CSF; MDBK – Г – контроль, Д – IL-6, Е – G-CSF; (об. 10×, ок. 7×, окраска по Романскому-Гимза)

Из представленных на рисунке данных видно, что клетки, выращенные в цитокинсодержащей среде, имели форму, характерную для данного вида клеток с четко выраженными границами, без признаков дегенерации и морфологически не отличались от клеток, выращенных в контрольной среде. Монослой состоял из эпителиоподобных, плотно прилегающих друг к другу клеток, пролонгированной формы без зернистости цитоплазмы.

Клетки при пересеве с коэффициентом 1:2-1:3 формировали конfluэнтный монослой на 3-4 сут культивирования.

Клетки, выращенные в экспериментальной ростовой среде, имели эпителиоподобную форму, характерную для изучаемого вида клеток животных.

Результаты влияния цитокинов на морфологию перевиваемых культур клеток ВНК-21/13-02 MDBK представлены на рисунке 2.

В контроле (А, Б) просматривается целостный монослой клеток.

Также наблюдается морфологическая гомогенность монослоя. Плазматическая мембрана, ограничивающая клетку, имеет четкие выраженные границы.

При воздействии IL-6 в концентрации 60 пг/см³ (В, Г) наблюдалось улучшение качества монослоя. Плазматическая мембрана имела более четкие границы, плотный однородный монослой. На рисунке 2 (Д, Е) в монослой

клеток при воздействии происходят поверхностные изменения клеточной морфологии, отсутствует выраженный клеточный монослой, слабо выражена плазматическая мембрана, что указывает на ослабление динамических процессов эффективного прикрепления, распластывания, пролиферации и дифференцировки.

При увеличении дозы ИЛ-6 до 500 пг/см³ (Ж, З) наблюдается большое количество клеток, которые имеют измененную форму, что свидетельствует о подавлении процесса деления и увеличении количества гибнущих клеток.

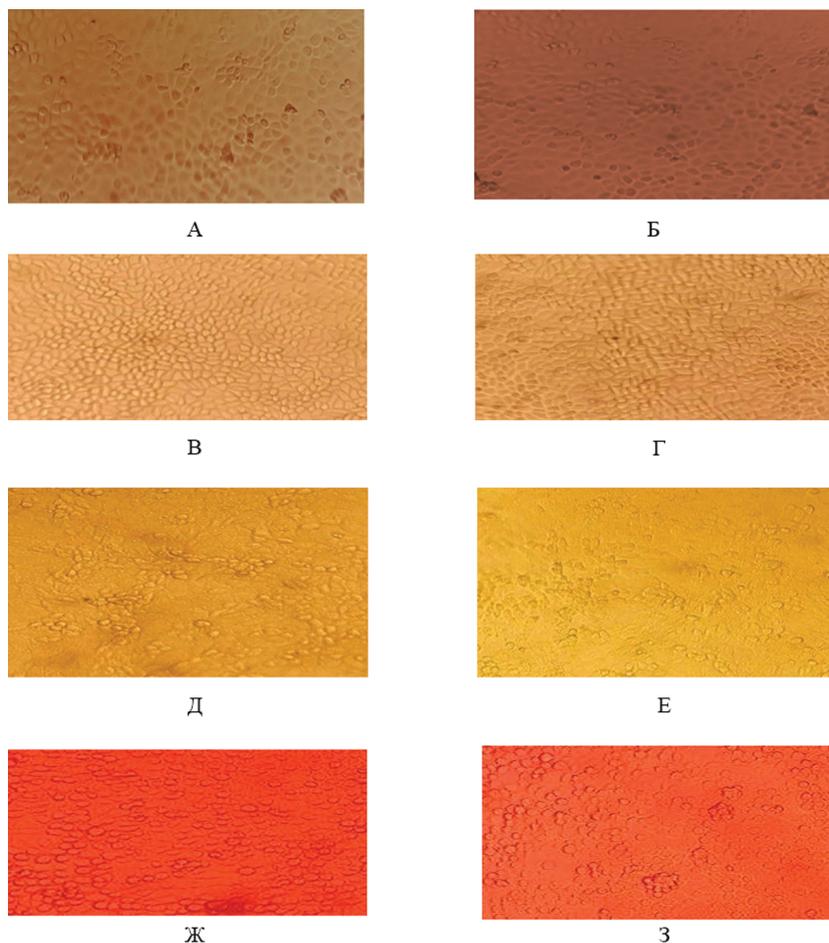


Рисунок 2 – Культуры клеток ВНК-21/13-02 и MDBK, выращенные в цитокинсодержащей среде: А, Б – контроль; В, Г – 60 пг/см³ ИЛ-6; Д, Е – 250 пг/см³ ИЛ-6; Ж, З – 500 пг/см³ ИЛ-6 (об. 10×, ок. 7×)

Результаты окрашивания акридиновым оранжевым монослоя культур клеток ВНК-21/13-02 и MDBK, выращенных в цитокинсодержащей среде (60 пг/см³), представлены на рисунке 3.

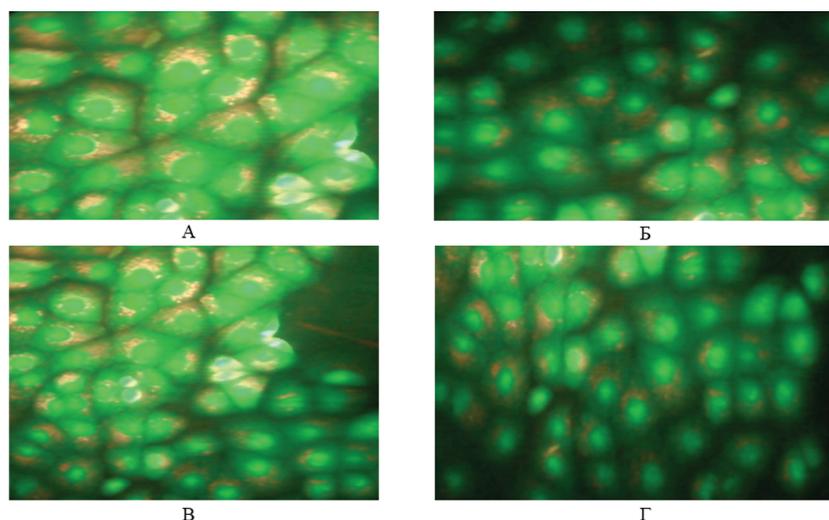


Рисунок 3 – Люминесцентная микроскопия. Окраска акридиновым оранжевым: А – перевиваемая линия клеток MDBK (контроль); Б – перевиваемая линия клеток MDBK (цитокинстимулированная); В – перевиваемая линия клеток ВНК-21/13-02 (контроль); Г – перевиваемая линия клеток ВНК-21/13-02 (цитокинстимулированная) – ок. 10, ×об.

При люминесцентной микроскопии препаратов культур клеток MDBK и ВНК-21/13-02 отмечается интенсивная люминесценция молекулярных компонентов. Зеленое свечение в большой степени излучает окрашенная флуорохромом ДНК, а оранжево-красное свечение – РНК. На рисунке 3 (А, Б) в экспериментальных образцах клеточного монослоя, окрашенного акридиновым оранжевым, мертвых клеток не выявлено.

Ядра в клетках, выращенных в средах с добавлением цитокинов, имеют ровные контуры, клетки с кариорексисом и кариопикнозом отсутствуют. Клетки с 2 и более ядрами в экспериментальном монослое не выявлены, что свидетельствует о нормальном митозе клеток.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что оптимальная метаболизмстимулирующая концентрация IL-6 – 30-60 пг/см³, обеспечивающая стимуляцию метаболизма клеток линии MDBK и ВНК – 21/13 – 02 с индексом пролиферации клеток в 1,33 раза и 1,17 раза соответственно по сравнению с контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ада Г. Вакцины, вакцинация и иммунный ответ / Г. Ада, А. Рамсей: пер. с англ. – М.: Медицина, 2002. – 344 с.
2. Бельмер С. В. Значение цитокинов в патогенезе воспалительных заболеваний толстой кишки у детей / С.В. Бельмер, А.С. Симбирцев, О.В. Головенко // РМЖ. – 2003. – Т. 11. – № 3. – С. 17-22.
3. Патент RU 2715336 Класс МПК: C12N 5/00 Способ стимуляции метаболизма культур клеток MDBK для репродукции вирусов /Плотникова Э.М., Архарова И.А., Низамов Р.Н., Матвеева Е.Л. - № 2019112375; заявлено 23.04.2019; Бюл. № 6. Оpubл. 26.02.2020.
4. Самуйленко А.Я. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК /А.Я. Самуйленко, В.М. Попова, И.Н. Матвеева, Л.А. Скороходова // Материалы международной научно-практической конференции. «Современные методы фильтрации в биотехнологии», 5 - 7 декабря, 2012. – Щелково, 2012. – 23 с.
5. Kim S.H. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF - alpha / S.H. Kim, S.Y. Han, T. Azam et al. // Immunity. – 2005. – Vol. 22. – № 1. – P. 131-142.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ГИДРОЛИЗАТОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА И МОЛОЗИВА С γ -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WHEY AND COLOSTRUM HYDROLYZATES COMPLEXES WITH γ -CYCLODEXTRIN

**Е. И. Тарун^{1,2}, П. А. Виноградов^{1,2}, Д. А. Карабун^{1,2}, Т. Н. Головач², Р. В. Романович²
E. I. Tarun^{1,2}, P. A. Vinogradov^{1,2}, D. A. Karabun^{1,2}, T. M. Halavach², R. V. Romanovich²**

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
kfi@iseu.by, ktarun@tut.by

²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

¹International Sakharov Environmental Institute of BSU, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Проведено сравнительное изучение антиоксидантной активности концентрата сывороточного белка молока, нативного молозива, их ультрафильтрованных гидролизатов, а также комплексов ультрафильтратов гидролизатов с γ -циклодекстрином. Получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации всех образцов, из которых графически определены показатели IC₅₀, которые находились в пределах 7,2–103,4 мкг/мл. Комплексы ультрафильтратов гидролизатов с γ -циклодекстрином восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 88–96 % при концентрации образцов 0,68–0,75 мг/мл.

The comparative study of the antioxidant activity of whey protein concentrate, native colostrum, their ultrafiltered hydrolysates, as well as complexes of ultrafiltered hydrolysates with γ -cyclodextrin was carried out. The dependences of the fluorescence intensity of fluorescein on the logarithm of the concentration of all samples were obtained, from which the IC₅₀ values were graphically determined, which were in the range of 7,2–103,4 μ g/ml. Complexes of ultrafiltrate hydrolysates with γ -cyclodextrin restored fluorescein fluorescence to 88–96 % at a sample concentration of 0,68–0,75 mg/ml.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, нативное молозиво, гидролизованное молозиво, гидролизат молока, циклодекстрин, флуоресцеин.