

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК MDCK¹

STUDY OF THE EFFECT OF PLANT HYDROLYSATES ON THE VIABILITY OF A CULTURE OF MDCK CELLS

N. Dumchenko

Summary. Nutrient medium and serum of animals are necessary components for cell cultivation. Nutrient medium has a certain chemical composition. Whey, as a product of animal origin, remains an unexplored complex of various components, creates non-standard conditions for cell growth and reproduction. In this paper, the effect of various hydrolysates as a serum substitute is studied. The stimulating effect of HyPep 2209 soybean hydrolyzate on the viability of the MDCK cell culture when it is added to the basic nutrient medium in various concentrations is shown. The optimal concentration of the hydrolyzate HyPep 2209 for the cultivation of transplantable MDCK lines has been determined.

Keywords: serum-free nutrient medium, cell culture, hydrolysates.

Думченко Наталья Борисовна

*Н.с., ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово, Новосибирская область, Россия
Dumchenko@vector.nsc.ru*

Аннотация. Необходимыми компонентами для культивирования клеток являются питательная среда и сыворотка крови животных. Питательная среда имеет определенный химический состав. Сыворотка, как продукт животного происхождения, остается неизученным комплексом различных компонентов, создает нестандартные условия для роста и размножения клеток. В работе изучено влияние различных гидролизатов как сывороткозаменителя. Показано стимулирующее действие соевого гидролизата HyPep 2209 на жизнеспособность культуры клеток MDCK при его добавлении в базовую питательную среду в разных концентрациях. Определена оптимальная концентрация гидролизата HyPep 2209 для культивирования пересаживаемых линий MDCK.

Ключевые слова: без сывороточная питательная среда, культура клеток, гидролизаты.

Введение

Получение клеточного пула при изготовлении биопрепаратов является важным технологическим процессом, результативность которого зависит от выбора питательной основы для культивирования клеток. В составе питательных сред присутствует сыворотка плазмы животных. Сыворотка, как продукт животного происхождения, остается неизученным комплексом различных компонентов, создает нестандартные условия для роста и размножения клеток и вирусов. Кроме того, существуют проблемы, связанные с потенциальной возможностью контаминации сыворотки бактериями, грибами, микоплазмами, вирусами, возбудителями трансмиссивной губчатой энцефалопатии. При использовании сыворотки велика вероятность попадания пирогенов и остаточных элементов сыворотки в конечный продукт [1]. Поэтому подбор гидролизатов для конкретной культуры клеток является на сегодняшний день одной из актуальных проблем клеточной биотехнологии. В настоящее время был проведен ряд исследований для выявления альтернативы заменителя сыворотки, в том

числе использование химически определенной среды, или дополнение базовой химически определенной среды гидролизатами растительных белков [2]. Цель данного исследования — подбор оптимального состава питательной среды с добавлением гидролизатов для культивирования клеток MDCK.

Материалы и методики исследования

Для культивирования клеток применяли питательные среды DMEM/F12 производства Sigma, США с добавлением дополнительных компонентов. Использовали следующие гидролизаты и пептоны производства фирмы Kerry, inc, США в следующих концентрациях: 60, 30, 15, 7,5, 3,75 и 1,875 г/л: соевый гидролизат HyPep 1510, гидролизат из пшеничного глютена HyPep 4601N, гидролизат из рисовых белков и пшеничного глютена HyPep 5603N, соевый гидролизат HyPep 2209, соевый пептон HyPep 1511.

В качестве контроля использовали питательную среду DMEM/F12 с добавлением 10% сыворотки крови пло-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-1746.2018.4).

Таблица 1. Зависимость жизнеспособности культуры клеток MDCK при добавлении разной концентрации гидролизата HyPer 2209

Питательная среда	Жизнеспособность, %
DMEM/F12+ HyPer2209 (60,0 г/л)	259,94±5,48
DMEM/F12+ HyPer 2209 (30,0 г/л)	243,61±5,48
DMEM/F12+ HyPer 2209 (15,0 г/л)	208,03±5,51
DMEM/F12+ HyPer 2209 (7,5 г/л)	108,93±6,77
DMEM/F12+ HyPer 2209 (3,75 г/л)	75,15±6,78
DMEM/F12+ HyPer 2209 (1,875 г/л)	55,08±2,96
DMEM/F12 +10% сыворотки	100,00±6,16
DMEM/F12 без сыворотки	35,16±3,74

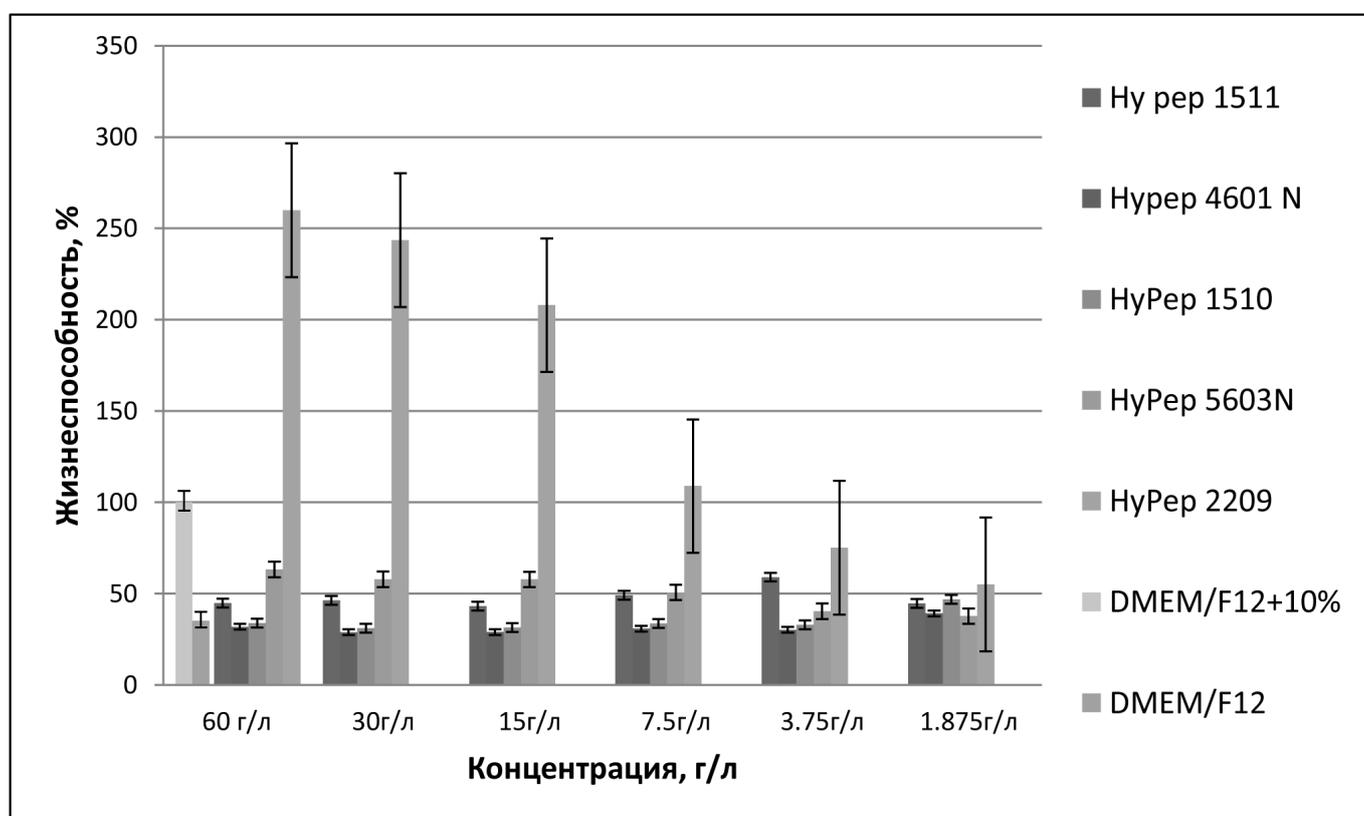


Рис. 1. Жизнеспособность культуры клеток MDCK с добавлением гидролизатов

дов коровы (Gibco, США) и без добавления сыворотки. Работу выполняли на культуре клеток MDCK из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста[3]. Культуру клеток MDCK в концентрации 5×10^3 в 100 мкл среды DMEM/F12, содержащей 5% сыворотки крови плодов коровы, помещали в 96-луночный планшет (Costar, США) и инкубировали 24 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. После прикрепления клеток к подложке прово-

дили смену среды на перечисленные выше питательные среды, клетки инкубировали в течение 48 ч при тех же условиях. Затем в лунки вносили 5мкл3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (Sigma, США), инкубировали 4 ч. По окончании инкубации добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (Вектон, Россия) и определяли жизнеспособность клеток по интенсивности окраски раствора формазана, измеряя его оптическую плотность в лунках на микропланшетном ридере Tecan Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 492 нм.

Математическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента [4].

Результаты исследования и обсуждение

Для получения экспериментальной питательной среды было разработано несколько составов. К базовой питательной среде DMEM/F12 добавляли различные гидролизаты. Соевый гидролизат NuPer 1510 использовали в качестве дополнительного компонента при замене сыворотки плодов коровы. Данный гидролизат получен путем ультрафильтрации ферментативного гидролиза соевых гранул, не содержит животных компонентов.

Пшеничный гидролизат NuPer 4601 N также является дополнительным компонентом вместо сыворотки плодов коровы. Этот гидролизат получен путем ультрафильтрации ферментативного гидролиза пшеничного глютена, не содержит животных компонентов, является высококачественным источником пептидов, особенно богатых стабильными глутаминсодержащими пептидами.

Рисовый гидролизат NuPer 5603 N применяют в качестве дополнительного компонента вместо сыворотки плодов коровы. Он получен путем ультрафильтрации ферментативного гидролиза рисового белка и пшеничного глютена, не содержит животных компонентов. Гидролизат является высококачественный источник пептидов с низким уровнем свободных аминокислот.

Соевый гидролизат NuPer 2209 содержит дополнительные факторы роста, которые обеспечивают устойчивый рост клеток, а также повышенную жизнеспособность клеток. Включение дополнительных компонентов, не являющихся животными, позволяет полностью исключить сыворотку из базальной среды.

Соевый пептон NuPer1511 разработан специально для применения в клеточных культурах и предназначен для использования в качестве среды для культивирования клеток. Это ферментативная выборка сои, обладает хорошей растворимостью.

Клетки культивировали на питательных средах, содержащих в своем составе гидролизаты.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. МТТ-тест основан на ферментном восстановлении неокрашенной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) в живых метаболически активных клетках с образованием голубых кристаллов формазана. Нежизнеспособные,

мертвые клетки такой способностью не обладают. Чем больше клеток в культуре, чем они более жизнеспособны, тем больше образуется кристаллов формазана и тем больше значение оптической плотности субстрата [3]. В качестве контроля использовали питательную среду DMEM/F12 с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы и без добавления сыворотки. Результаты скрининга представлены на рис. 1.

Данные представлены в виде среднего \pm ошибка среднего.

При культивировании в питательной среде DMEM/F12 с добавлением гидролизатов NuPer 1511, NuPer 4601N, NuPer 1510, NuPer 5603N в разных концентрациях жизнеспособность клеток MDCK сопоставима с питательной средой DMEM/F12 без добавления сыворотки. Токсичных свойств гидролизаты не проявили. Жизнеспособность клеток составляла в пределах 35–50%. Гидролизат NuPer 2209 по сравнению с питательной средой без сыворотки значительно превосходит остальные гидролизаты. В связи с этим гидролизат NuPer 2209 был отобран для дальнейших исследований.

При культивировании в питательной среде DMEM/F12 с добавлением гидролизата NuPer 2209 жизнеспособность клеток MDCK увеличивалась по сравнению с питательной средой DMEM/F12 с добавлением 10% сыворотки. Изучение воздействия гидролизата NuPer 2209 на жизнеспособность культуры клеток проводили при его добавлении в ростовую среду в различных концентрациях без добавления сыворотки. Замена сыворотки гидролизатом NuPer 2209 показала, что при внесении в ростовую среду гидролизата в концентрациях от 7,5 до 60 г/л без добавления сыворотки увеличивает количество жизнеспособных клеток, по сравнению с аналогичным показателем при росте клеток в среде с 10% сыворотки (Таблица. № 1), в то время как при добавлении 1,875 г/л и 3,75 г/л гидролизата изменение жизнеспособности не обнаружено.

Выводы

Таким образом, в результате проведенного исследования состава питательной среды с добавлением гидролизатов для культуры клеток MDCK показано, что оптимальным является гидролизат NuPer 2209 в концентрации 30 г/л. Замена сыворотки гидролизатом в концентрации от 1,875 г/л до 7,5 г/л значительных изменений жизнеспособности не обнаружено. Добавление же концентрации 60 г/л экономически не целесообразно, так как ведет к значительному удорожанию стоимости питательной среды. Применение гидролизата NuPer 2209 в области клеточной биотехнологии может быть полезным для увеличения скорости роста культур клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нечаева Е.А., Радаева И. Ф., Думченко Н. Б., Сумкина Т.П., Богрянцева М. П., Сенькина Т. Ю. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток и вирусов // Вестник пермского национального исследовательского политехнического университета Химическая технология и биотехнология — 2018. — № 4. — С. 85–97.
2. Siemensma A., Babcock T., Wilcox C., Huttinga H. Towards an Understanding of How Protein Hydrolysates Stimulate More Efficient Biosynthesis in Cultured Cells // Protein Hydrolysates in Biotechnology. — 2010. — P. 33–54
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays //Journal of Immunological Methods.- 1983.-V.65 (1–2).-P.55–63.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — Пер. с англ. — 1999. — М. — 459 с.

© Думченко Наталья Борисовна (Dumchenko@vector.nsc.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Кольцово, Новосибирская область