

## ВЛИЯНИЕ АКТОВЕГИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ



*Изучено влияние препарата «Актовегин» на пролиферативную активность и митотический режим клеток перевиваемых линий РК-15-1ЕКВМ и ВНК-21 clone 13/04. Показано стимулирующее действие препарата на пролиферацию клеток при его добавлении в ростовую среду, содержащую различные по своему составу сыворотки крови крупного рогатого скота в разных концентрациях. Сделан вывод о перспективности использования актовегина в биотехнологии культур клеток.*

© А.К. ГУЛЕВСКИЙ, А.В. ТРИФОНОВА, А.А. ЛАВРИК, 2008

**Введение.** В мировой медицинской практике широко применяются препараты, созданные на основе крови животных и человека [1, 2]. Одним из таких препаратов является актовегин, который получен методом ультрафильтрации из дефибринированной крови молочных телят, подвергнутой гемолизу. В его состав входят вещества, имеющие молекулярную массу до 5 кДа. К таким веществам относятся пептиды, аминокислоты, нуклеозиды, гликолипиды и олигосахариды, а также электролиты и микроэлементы.

Основой действия актовегина является его способность влиять на процессы внутриклеточного метаболизма. Под влиянием этого препарата улучшается транспорт глюкозы в клетки и поглощение кислорода в тканях. Увеличение транспорта глюкозы в клетку происходит благодаря прямой активации переносчика глюкозы в мембране гликолипидной фракцией, содержащейся в актовегине [3–8]. На сегодняшний день идентифицированы составляющие этой фракции – инозитолфосфат-олигосахариды (ИФО), обладающие структурным сходством с медиаторами действия инсулина [6, 9]. Одновременное повышение обоих показателей – накопления кислорода и глюкозы – свидетельствует о том, что поглощенная глюкоза потребляется путем окисления. Этот эффект приводит к повышению энергетического статуса клетки, что влияет на ее функциональный метаболизм [4].

В современной клеточной биотехнологии одной из главных задач является разработка универсальной питательной среды для культивирования клеток, которая не содержит сыворотки крови или имеет пониженное ее содержание, поскольку известно, что использование нативной сыворотки крови в качестве ростового фактора имеет ряд недостатков. Существующие прописи бессывороточных сред или сред с низким содержанием сыворотки, как правило, обеспечивают рост ограниченного числа клеточных культур [10–12]. Актуальным является также повышение эффективности использования культур клеток в области биотехнологии за счет увеличения как прироста клеток за единицу времени, так и физиологической активности клеток *in vitro*.

На сегодняшний день влияние актовегина на процессы пролиферации клеток подробно исследовано не было. Кроме того, в нашей ра-

боте впервые изучена возможность его применения в биотехнологии культур клеток как компонента питательной среды.

**Материалы и методы.** В работе были использованы клеточные линии, полученные из Коллекции клеточных культур лаборатории биотехнологии Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» (ННЦ «ИЭКВМ»): РК-15-IEKVM и ВНК-21 clone 13/04. Клеточная линия РК-15-IEKVM адаптирована к росту в смеси питательных сред Игла DMEM и 199 (1 : 1) с добавлением 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС), обработанной полиэтиленгликолем (ПЭГ) с молекулярной массой 6000, по протоколу, позволяющему на фоне преципитации высокомолекулярных фракций белка максимально удалять остатки ПЭГ [13]. Культивирование клеток линии ВНК-21 clone 13/04 проводили в смеси питательных сред Игла DMEM и 199 (1 : 1) с добавлением 10 % нативной сыворотки крови КРС. Для диспергирования клеточного пласта при пассировании использовали смесь 0,02%-ного раствора Версена (90 %) и 0,25%-ного раствора трипсина (10 %).

Воздействие актовегина на пролиферативную активность клеток линии РК-15-IEKVM исследовали на протяжении трех пассажей, линии ВНК-21 clone 13/04 – на одном пассаже. Культивирование клеток проводили в стеклянных сосудах емкостью 250 см<sup>3</sup>. Актовегин добавляли в питательную среду во время переноса клеток в новые культуральные емкости. Пролиферативную активность определяли по приросту клеток, которые подсчитывали в камере Горяева на 4-е сутки роста культуры [14].

Оценку митотического режима проводили в препаратах клеток, выращенных на покровных стеклах. Клетки фиксировали в спирт-уксусном фиксаторе каждые 24 ч роста культуры в течение 3 сут, затем окрашивали гематоксилином Каррачи. Митотическую активность определяли по числу делящихся клеток, отнесенных к общему количеству посчитанных из расчета на 1000 клеток. Показатель митотической активности выражали в промилле (‰). Патологические митозы подсчитывали одновременно с проведением анализа митотической активности. Процент патологических де-

лений определяли по отношению к среднему количеству выявленных митозов [14, 15].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Изучение воздействия актовегина на пролиферативную активность клеточных культур проводили при его добавлении в ростовые среды, содержащие минимальные концентрации сывороток крови КРС, которые обеспечивали жизнедеятельность клеточных линий. Для линии РК-15-IEKVM такая концентрация сыворотки составила 2 % от объема питательной среды, для линии ВНК-21 clone 13/04 – 1 %. Актовегин добавляли в ростовую среду клеток в конечной концентрации 0,14 % от ее объема. Выбранная концентрация препарата приблизительно соответствует эффективной дозе для животных *in vivo*.

Изучение пролиферативной активности клеток линии РК-15-IEKVM показало, что уменьшение концентрации сыворотки крови в питательной среде до 2 % приводит к снижению прироста клеток линии РК-15-IEKVM на первом пассаже – на 20 %, на третьем пассаже – на 43,5 % по сравнению с аналогичным показателем при росте клеток в среде с 10 % сыворотки крови. При этом добавление актовегина стимулировало прирост клеток на этих пассажах на  $21 \pm 3$  %. Отмечено, что на первом пассаже рост клеточной культуры РК-15-IEKVM в среде с пониженной концентрацией сыворотки крови и добавлением актовегина не отличался от роста в среде с 10 % сыворотки крови КРС (рис. 1).

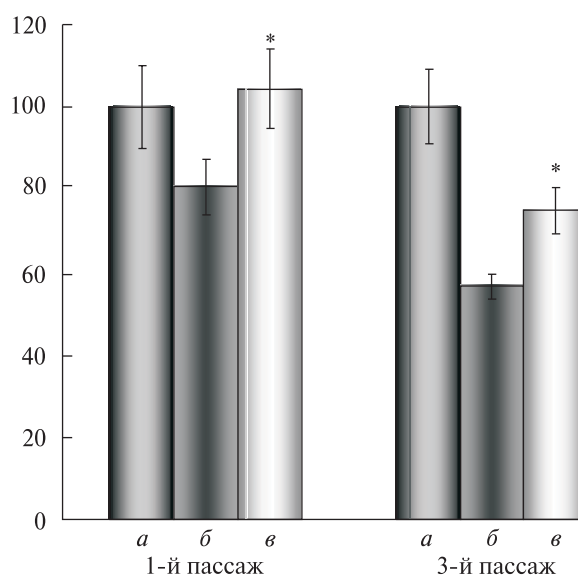
При культивировании линии ВНК-21 clone 13/04 уменьшение концентрации сыворотки в питательной среде до 1 % привело к снижению прироста клеток на первом пассаже на 30 % по сравнению с их ростом в среде с 10 % сыворотки крови. Добавление актовегина стимулировало прирост клеток на  $36 \pm 3$  %. Таким образом, пролиферативная активность линии ВНК-21 clone 13/04 на первом пассаже в среде с пониженной концентрацией сыворотки крови и добавлением актовегина также соответствовала активности в среде с 10 % сыворотки крови КРС. При понижении концентрации препарата в ростовой среде в 2 раза, т.е. до 0,07 %, достоверного стимулирующего эффекта не обнаружено (рис. 2).

Как видно на рис. 1 и 2, при добавлении актовегина увеличение пролиферативной ак-

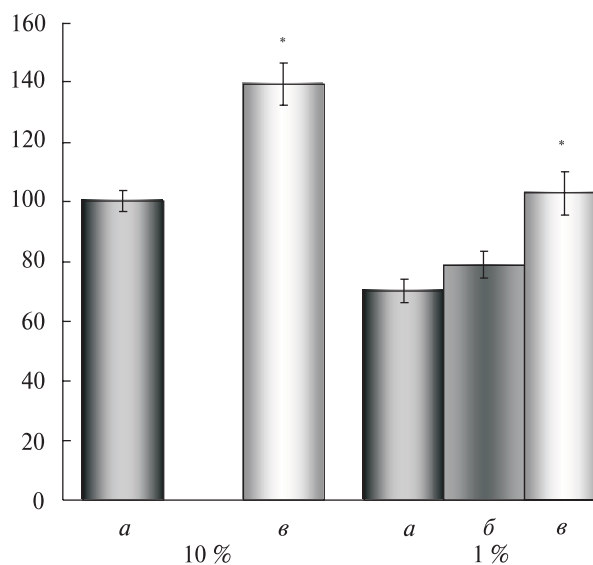
тивности обеих исследованных линий было различным. Для выяснения причины этого было произведено культивирование клеток линии ВНК-21 clone 13/04 с добавлением актовегина в ростовую среду, содержащую 10 % сыворотки крови КРС. В указанном варианте отмечена стимуляция актовегином пролиферативной активности на ту же величину, что и при пониженной концентрации сыворотки в питательной среде. Таким образом, установлено, что различия в стимуляции пролиферативной активности актовегином линии РК-15-IEKVM и линии ВНК-21 clone 13/04 не связаны со снижением концентрации сыворотки крови в ростовой среде. Также не являлось причиной различий в стимуляции пролиферативной активности клеток влияние разных сывороток крови КРС, которые использовали для культивирования линии РК-15-IEKVM и линии ВНК-21 clone 13/04. Ранее было показано [13], что рост клеточной линии РК-15-IEKVM при культивировании в среде с сывороткой, обработанной ПЭГ-6000, не отличался от роста в среде, содержащей нативную сыворотку. Исходя из этого, можно предположить, что причиной различной стимуляции пролиферативной активности актовегином у разных клеточных линий являлись их собственные физиологические особенности.

Культивирование клеток в средах, не содержащих сыворотки крови как при добавлении актовегина в концентрации 0,14 %, так и без него, привело к гибели культуры уже на первом пассаже. На 1-е сутки роста в среде с актовегином клетки прикреплялись к стеклу в отличие от клеток, культивировавшихся в среде без ростовых факторов, что свидетельствует о стимуляции актовегином адгезивных свойств клеток. Однако ввиду отсутствия ростовых факторов клетки к делению не приступали, а на 4-е сутки после прикрепления отслаивались от поверхности культурального сосуда.

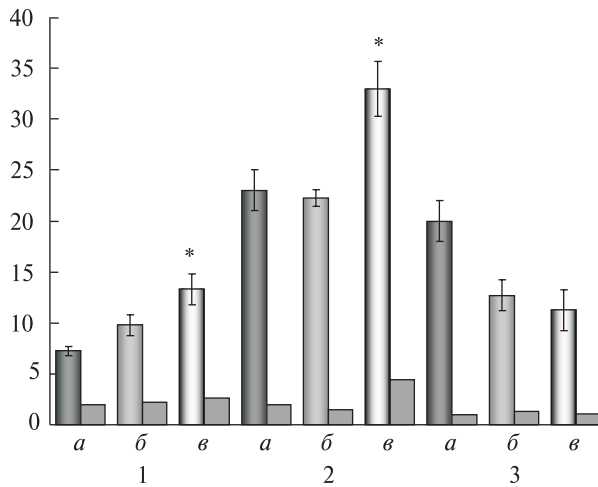
В литературе имеются данные о возможности культивирования клеток линии ВНК-21 в среде, содержащей различные низкомолекулярные фракции сыворотки крови КРС в концентрации 10 %. При добавлении фракции с молекулярной массой до 10 кДа отмечено некоторое понижение пролиферативной активности клеток и их жизнеспособности, при до-



**Рис. 1.** Пролиферативная активность клеток линии РК-15-IEKVM на 4-е сутки (по вертикали, %) при снижении концентрации сыворотки крови КРС в среде и при добавлении актовегина; по горизонтали: а – 10 % сыворотки крови КРС; б – 2 % сыворотки крови КРС; в – 2 % сыворотки крови КРС + 0,14 % актовегина



**Рис. 2.** Пролиферативная активность клеток линии ВНК-21 clone 13/04 на 4-е сутки роста (по вертикали, %) при культивировании в средах с различными концентрациями сыворотки крови КРС (по горизонтали) и актовегина. Концентрация актовегина в ростовой среде: а – нет, б – 0,07 %, в – 0,14 %



**Рис. 3.** Митотический режим линии РК-15-IEKVM при снижении концентрации сыворотки крови КРС в среде и добавлении актовегина (по вертикали – %, по горизонтали – сутки роста): а – 10 % сыворотки крови КРС; б – 2 % сыворотки крови КРС; в – 2 % сыворотки крови КРС + 0,14 % актовегина

бавлении фракции до 1 кДа наблюдалась гибель культуры на втором-третьем пассажах [16].

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что низкомолекулярные вещества, содержащиеся в актовегине, не могут выступать в роли факторов роста, обеспечивающих жизнедеятельность клеток *in vitro*. Однако добавление малых доз препарата в питательную среду, содержащую ростостимулирующие факторы, приводит к включению механизмов, обеспечивающих повышение биоэнергетического состояния клеток, по-видимому, за счет усиления потребления кислорода и глюкозы [4, 5], что приводит к усилению их метаболизма и пролиферативной активности.

Для более детального изучения воздействия препарата актовегина на рост культур клеток нами был исследован митотический режим клеток перевиваемой линии РК-15-IEKVM. Культивирование клеток в среде с пониженной до 2 % концентрацией сыворотки крови КРС приводит по сравнению с 10%-ной ее концентрацией: на 1-е сутки роста – к увеличению количества делящихся клеток, на 2-е сутки – к сопоставимому их количеству, на 3-и сутки – к резкому снижению количества митозов. Таким образом, было показано, что

клетки для вступления в стадию деления требуют пороговое значение концентрации ростовых факторов в питательной среде. Поскольку сыворотка крови КРС имеет в своем составе как ростостимулирующие, так и ингибирующие факторы, повышенная ее концентрация (в данном случае – 10 %) в питательной среде, по сравнению с пороговым значением (в данном случае – 2 %), угнетает пролиферативные свойства клеток РК-15-IEKVM, что было показано на 1-е сутки их роста.

Стимуляция митотической активности при добавлении актовегина в ростовую среду с 2 % сыворотки крови также наблюдается нами только на 1-е и 2-е сутки роста культуры. На 1-е сутки она составляет 36 %, на 2-е – 48 % относительно митотической активности клеток в среде, содержащей 2 % сыворотки (рис. 3). Учет патологических митозов показал, что при культивировании клеток в среде с добавлением актовегина на 2-е сутки роста культуры происходит увеличение их количества с 7 до 13 % от общего количества митозов. Среди патологических митозов преобладают «микроядра», К-митоз и трехполосный митоз, которые являются следствием как хромосомных нарушений, так и нарушений веретена деления клеток.

Факт повышения количества нарушений митозов позволяет предполагать возможность адаптивных перестроек клеток культуры в ответ на новый фактор ростовой среды [15, 17], в данном случае – препарат актовегин.

**Выводы.** В наших исследованиях показано, что добавление актовегина в концентрации 0,14 % к объему ростовой среды стимулирует пролиферативную активность культур клеток. Эффект стимуляции актовегином пролиферации клеток показан для перевиваемых линий РК-15-IEKVM и ВНК-21 clone 13/04 при культивировании с использованием разных по своему составу сывороток крови КРС и при различной концентрации этих сывороток в ростовой среде. Применение актовегина в области клеточной биотехнологии может быть полезным для увеличения скорости роста культур. Возможен также эффект повышения физиологической активности клеток *in vitro*, однако это предположение требует дальнейшей проверки.

**SUMMARY.** The influence of Actovegin on proliferation activity and mitotic regimen of cells of permanent lines PK-15-IEKVM and ВНК-21 clone 13/04 was investigated. Addition of Actovegin into growth media containing bovine serums of different components and concentrations stimulates cell proliferation. Conclusion has been made that Actovegin can be used in cell culture biotechnology.

**РЕЗЮМЕ.** Вивчено вплив актовегіну на проліферативну активність та мітотичний режим клітин перешеплованих ліній РК-15-ІЕКВМ та ВНК-21 clone 13/04. Показана стимулююча дія препарату на проліферацію клітин при його додаванні до ростових середовищ, які містять різні за складом та за концентрацією сироватки крові крупної рогатої худоби. Зроблено висновок про перспективність використання актовегіну в біотехнології культур клітин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колосков А.В. Современное представление о показателях для трансфузии эритроцитарных компонентов крови // Гематология и трансфузиология. — 2004. — № 6. — С. 38–42.
2. Колосков А.В. Современное представление о показателях к трансфузии свежезамороженной плазмы // Гематология и трансфузиология. — 2005. — № 6. — С. 41–42.
3. Нордвик Б. Актовегин. Новые аспекты клинического применения. — М., 2002. — С. 18–24.
4. Parade D. Untersuchungen Liber die insulinahnliche Wirkung eines niedermolekularen Blutextraktes auf den Glucosestoffwechsel des isolierten Fettgewebes der Ratte in vitro // Arzneim.-Forsch. — 1968. — 18. — P. 1019.
5. Mühlbacher C., Haring H. Glycolipide imitieren in Rattenfettzellen den Insulineffekt auf den Glucosetransport // Akt. Endokrin. Stoffw. — 1987. — 2.
6. Saltiel A. R., Cuatrecasas P. Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — 83 — P. 5793.
7. Obermaier-Kusser B., Muehlbacher C., Mushack J. et al. Regulation of glucose carrier activity by  $AlCl_3$  and phospholipase C in fat-cells // Biochem. J. — 1988 — 256 — P. 515–520.
8. Machicao F., Mushack J., Seffer E. et al. Mannose, glucosamine and inositol monophosphat inhibit the effects of insulin on lipogenesis. Further evidence for a role for inositolphosphat-oligosaccharides in insulin action // Biochem J. — 1990 — 266. — P. 909–916.
9. Mato J.M. Insulin mediators revisited // Cell. Signal. — 1989. — 1. — P. 143–146.
10. Дьяконов Л.П., Ситько В.И. Животная клетка в культуре. — М.: Спутник, 2000. — 400 с.
11. Богрянцева М.П., Фролова И.В., Трошкова Г.П. и др. Питательные среды и другие препараты для культур клеток млекопитающих // Цитология. — 1996. — 38, № 2. — С. 182–183.
12. Нариманов А.А. Бессывороточная среда для культивирования лимфоидных клеток человека и миеломных клеток мышей // Биотехнология. — 1991. — № 1. — С. 49–52.
13. Деклараци́нный патент на винахід 4432, МКИ С12N5/00. Стегній Б.Т., Білоконь В.С., Кіпріч В.В., Лаврік О.А., Кучерявенко Р.О., Кучерявенко В.В. Спосіб очищення сироватки великої рогатої худоби № 20040503502; Заявлено 11.05.2004; Опубл. 17.01.2005. Бюл. № 4.
14. Методические рекомендации по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани. — Харьков, 1993. — 20 с.
15. Бломкин В.Н., Жданов В.М. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клетки. — М.: Медицина, 1973. — 267 с.
16. Пригода А.С., Коренева А.И. и др. Конструирование бессывороточных питательных сред для культивирования клеток млекопитающих. 2. Изучение ростостимулирующей активности ультрафильтрационных фракций панкреатического гидролизата казеина // Биотехнология. — 1991. — № 4. — С. 38–40.
17. Алов И.А. и др. Основы функциональной морфологии клетки. — М.: Медицина, 1966. — 415 с.

Поступила 28.08.06