

Дозозалежний вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів шкіри в культурі

І.Г. Беспалова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Dose-Related Effect of Extract of Cryopreserved Newborn Piglet Skin Fragments on Metabolic Activity of Skin Fibroblasts in Culture

I.G. Bespalova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Дослідження тканинспецифічності та дозозалежності впливу екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят (ЕШП) на метаболічну активність фібробластів шкіри дозволяє з'ясувати механізм їх дії і визначити можливості культивування клітин у середовищах з меншим вмістом ембріональної телячої сироватки (ЕТС). Зниження концентрації сироватки в середовищі культивування зменшує ризик інфікування культури та можливої імунної відповіді при експериментальному або клінічному застосуванні фібробластів.

Мета роботи – вивчити дозозалежний вплив ЕШП на метаболічну активність фібробластів шкіри в культурі.

Екстракт одержували з кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят при їх інкубації в фізіологічному розчині протягом 60 хв. Для видалення високомолекулярних термолабільних білків екстракт прогрівали на киплячій водяній бані та фільтрували. Одержані екстракти стерилізували в автоклаві. Первинну культуру фібробластів шкіри новонароджених шурів отримували шляхом вільного виселення клітин з фрагментів шкіри і подальшого пересівання фібробластів. Одержані фібробласти інкубували в живильному середовищі DMEM/F12 з 10% ЕТС, в дослідні зразки додавали 5 або 2% ЕТС та вносили ЕШП до кінцевої концентрації пептидів 0,1, 0,5, 1,0 і 1,5 мкг/мл, а в контрольні – еквівалентний об'єм фізіологічного розчину. Метаболічну активність клітин оцінювали по відновленню нетоксичного редокс-індикатора AlamarBlue та за допомогою МТТ-тесту.

Додавання до середовища культивування ЕШП при кінцевій концентрації пептидів 0,1 мкг/мл статистично достовірно збільшило метаболічну активність фібробластів. При зменшенні концентрації ЕТС в середовищі культивування з 5 до 2% та додаванні ЕШП в кінцевій концентрації пептидів 1 і 1,5 мкг/мл метаболічна активність фібробластів зберігалася на рівні, який спостерігався в контрольних пробах з 10% ЕТС. На 5 добу культивування фібробластів їх кількість в середовищі з 2% ЕТС та 1 мкг/мл пептидів більша, ніж в середовищі без ЕШП, але менша, ніж в середовищі з 5% ЕТС. Відмінностей в метаболічній активності клітин при визначенні за допомогою AlamarBlue або МТТ-тесту виявлено не було.

Таким чином, при додаванні ЕШП в культуру фібробластів є можливість знизити концентрацію ЕТС без втрати метаболічної активності фібробластів.

Research of tissue specificity and dose-related effects of the extract of frozen-thawed newborn piglet skin fragments (NPSE) on metabolic activity of skin fibroblasts in culture is interesting both in terms of elucidation of the mechanism of their action and to determine the possibility of culturing cells in media with lower content of fetal bovine serum (FBS). Reducing the concentration of serum in the culture medium decreases the risk of contamination of culture and possible immune response in experimental or clinical application of fibroblasts.

The aim of this research was to establish the dose-related influence of NPSE on metabolic activity of skin fibroblast in culture.

The extract was derived from frozen-thawed fragments of piglet skin by their incubation with physiological solution for 60 min. The extract was warmed up in a boiling water bath and filtered for removal of high molecular and thermolabile proteins. The obtained extracts were sterilized by autoclaving.

Primary culture of neonatal rat skin fibroblasts was obtained by free cell transfer from skin fragments and the following reseeding. The obtained fibroblasts were incubated in DMEM/F12 culture medium supplemented with 10% FBS, the test samples were supplemented with 5 or 2% FBS, and NPSE up to the final peptide concentration 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, into the control ones the equivalent volume of physiological solution was introduced. Metabolic activity was assessed by the reduction of nontoxic Alamar Blue redox indicator and by MTT test.

The cell metabolic activity of fibroblasts was statistically significantly increased after addition of NPSE to the culture medium up to the final peptide concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Decreasing of FBS concentration in the culture medium from 5% down to 2% and the addition of NPSE up to the final peptide concentration of 1 and 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resulted in the preservation of the metabolic activity of fibroblasts at the level observed in the control samples with 10% FBS. On the 5th day of culturing the number of fibroblasts in medium with 2% FBS and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of peptides was higher than in the medium without NPSE, but less than in medium with 5% FBS. No differences in cell metabolic activity in AlamarBlue or MTT tests were found.

Thus, the addition of NPSE allowed to reduce the concentration of FBS without loss of metabolic activity of fibroblasts.

