

УДК 57.085.20

Н.Ш. Акимбеков^{1*}, И. Дигель², З.А. Мансуров¹, А.А Жубанова¹

¹Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

²Аахенский университет прикладных наук, Германия

*e-mail: akimbeknur@gmail.com

Изучение влияния карбонизованного материала на основе рисовой шелухи на жизнеспособность и миграцию фибробластов в культуре клеток Т3В3

Изучен цитотоксический эффект карбонизованной рисовой шелухи (КРШ) на культуру Т3В3 клеток фибробластов дермы мышей, а также процесс миграции и пролиферации этих клеток в присутствии КРШ. Делается вывод о безвредности и перспективности применения КРШ в сорбционно-аппликационной терапии для лечения острых и хронических гнойно-некротических процессов в ранах и мягких тканей.

Ключевые слова: Сорбент, эффект, фибробласты, миграция, пролиферация, жизнеспособность клеток.

N.Sh. Akimbekov, I.Digel, A.A. Zhubanova.

Investigation the Influence of Carbonized Material Based On Rice Husk on Viability and Migration of Fibroblasts in T3B3 Cell Culture

Cytotoxic effect of carbonized rice husk (CRH) on fibroblasts of mice derma in T3B3 cell culture and processes of migration and proliferation of these cells in the presence of CRH were investigated. Received results showed that the application of CRH in sorption therapy for treatment of acute and chronic purulo-necrotic processes is innocuous and perspective.

Keywords: sorbent, influence, fibroblasts, migration, proliferation, cell viability.

Н.Ш. Акимбеков, И. Дигель, А.А Жубанова

Күріш қауызы негізіндегі карбонизделген материалдың Т3В3 клетка дақылындағы фибробластардың тіршілік қабілеттілігі мен миграциясына әсерін зерттеу

Тышқанның Т3В3 клетка дақылындағы дермалық фибробластына карбонизделген күріш қауызының (ККҚ) цитотоксикалық әсері және оның клеткалар миграциясы мен пролиферация процестеріне әсері зерттелді. Созылмалы және ауыр іріңді-некротизді процестерді емдеуде сорбциялық-аппликациялық терапияда ККҚ қолдану – оның зиянсыздығын және перспективті материал екендігі белгілі болды.

Вестник КазНУ. Серия биологическая. №3/1(59). 2013

Түйін сөздер: сорбент, эффект, фибробласттар, миграция, пролиферация, клеткалардың тіршілікке кабілеттілігі.

Медицинское применение сорбентов сформировало целое направление в методах сорбционной терапии – эфферентные (физико-химические) методы, которые приобретают особое значение в решении одной из самых острых современных медико-социальных проблем – охраны внутренней среды организма [1].

К наиболее древним методам эфферентной терапии относится аппликационная сорбция, основанная на использовании сорбентов, обладающих специфическими свойствами. Выявлено, что, если сорбенты при прямом контакте с раневой поверхностью используются для извлечения из ран и раневых полостей токсических метаболитов, микробных клеток и бактериальных токсинов, то при энтеральном применении они способны также проявлять антитоксические и антибактериальные свойства, нормализуя таким образом микрофлору кишечника.

Известно, что активные сорбенты можно получать из вторичного растительного сырья (древесина, косточки плодовых деревьев, рисовая и пшеничная шелуха и т.п.), путем его высокотемпературной карбонизации и активации. Установлено, что полученные таким образом карбонизованные сорбенты представляют класс высокомолекулярных пористых углеродных материалов, обладающих развитой наноструктурированной поверхностью и способностью эффективно и избирательно поглощать молекулы веществ различной природы из жидких сред [2-3].

Установлено [4], что дешевым и экологически чистым сырьем для получения дешевых и доступных полифункциональных сорбентов может быть вторичное сырье пищевой промышленности - рисовая шелуха, высокотемпературная обработка которой позволяет получить высокопористый карбонизованный сорбент с наноструктурированной поверхностью (КРШ).

В предыдущих экспериментах *in vivo* выявлено [5], что использование КРШ в качестве сорбционного аппликационного материала предупреждает или снижает риск распространения гнойного процесса у лабораторных животных.

В наших экспериментах установлено, что применение сорбентов оказало заметный тормозящий эффект на развитие гнойной инфекции.

Выбор методов лечения обширных ран достаточно широк и зависит от фазы раневого процесса. В фазе регенерации главную роль играют эндотелий капилляров и фибробласты. Фибробласт – важнейший компонент грануляционной ткани, который, образуя коллагеновые волокна, обеспечивает заживление (рубцевание) раны.

Клеточная миграция в культурах описывается направленным движением клеток по поверхности матрикса. Мигрирующие клетки обладают направленной полярностью с ведущим краем по фронту клетки и ведомым краем позади. Изучение миграции клеток важно для понимания нормальных и патологических процессов клеточных культур. Хорошо известно, что движение клеток осуществляется благодаря перестройке их внутреннего каркаса – цитоскелета. Изменения цитоскелета позволяют клеткам вытягиваться, сокращаться и делиться.

В данной работе были изучены цитотоксический эффект КРШ на культуру клеток фибробластов ТЗВЗ и процесс миграции этих клеток в присутствии КРШ.

Материалы и методы

В качестве объекта использовали фибробласты дермы мышей ТЗВЗ (DSMZ Германия).

Для культуры фибробластов в качестве питательных сред применялась смесь DMEM (supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin) от немецкой фирмы DSMZ.

Культуры были получены в замороженном состоянии в криотрубках и разогревали в водяной бане при температуре 37°C. Затем, суспензию культуры клеток в криотрубках добавляли в питательную среду в чашки Т-25 и инкубировали в присутствии 5 % CO₂ при температуре 37°C. На следующий день после разморозки культуры клеток питательная среда заменялась на новую, во избежание токсического воздействия диметилсуль-фоксида (DMSO) на клетки.

При достижении конфлюэнтного слоя до 70% - 80%, проводилось разделение культур клеток. Старая питательная среда удалялась и клетки трижды промывались 5 мл раствора PBS, который затем удалялся. Для отделения клеток от матрикса

добавлялся 1 мл раствор трипсина (0,25% Trypsin/EDTA) и клетки инкубировались в присутствии 5% CO₂ при температуре 37°C в течение 3 мин. После этого, в чашки с отделенными клетками добавлялась свежеприготовленная питательная среда в объеме 1 мл. Далее клеточная суспензия тщательно перемешивалась и определенное количество клеток ($1-2 \times 10^6$ клеток/80 см²) переносилось в новые T-25 чашки (5 мл).

При достижении культуры конфлюэнтного состояния, для изучения миграции клеток с помощью культурального скальпеля (Nunclon™ Cell Scraper, NC-179693, 23 mm) делали царапину по длине матрикса, образуя «модельную рану» и добавляли КРШ в количестве 0,01 мг/мл. Рост и перемещение клеток наблюдалось под микроскопом, оценивалось движение клеток, объединенных в группы. Цифровые изображения были получены в $t = 1, 2, 3$ и 4 суток. Также измерялись изменения плотности клеточного слоя, вызванные делением клеток.

Результаты и их обсуждение

Оценка цитотоксического эффекта КРШ на фибробласты мышей в культуре проводилась подсчетом количества жизнеспособных клеток.

Этот показатель использовался нами как для выяснения эффективности КРШ при культивировании клеток *in vitro*, так и при функционировании клеток *in vivo*.

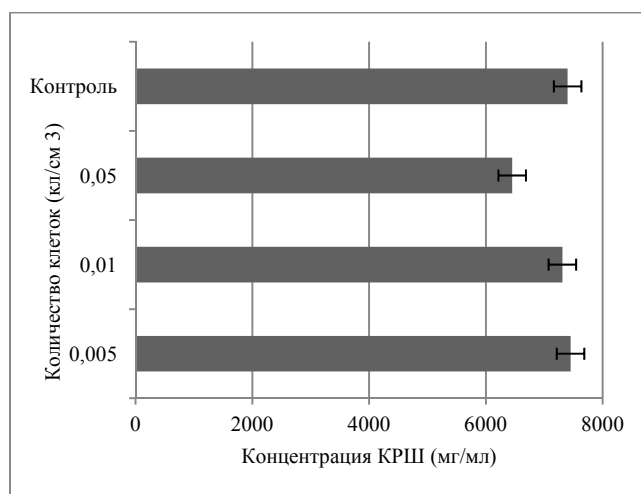


Рисунок 1 – Количество жизнеспособных Т3В3-фибробластов при добавлении КРШ в различных концентрациях (клетка/см²)

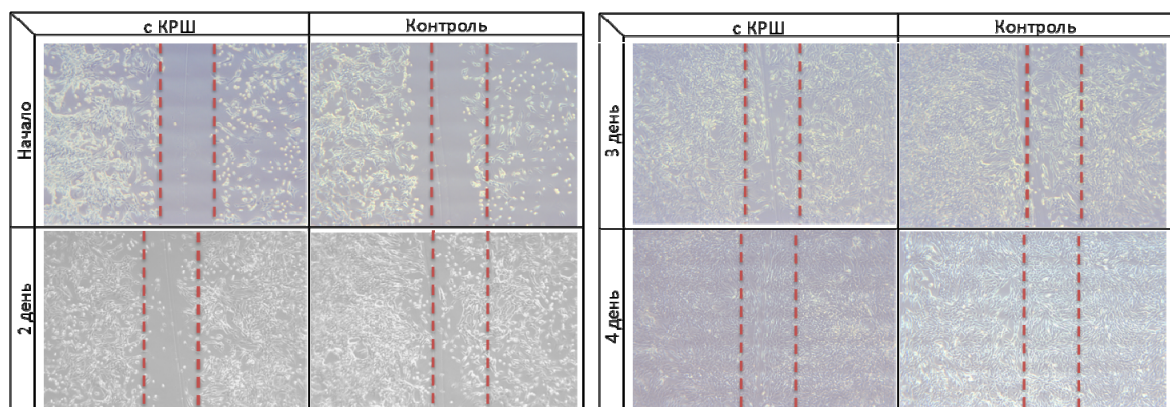


Рисунок 2 – Миграция фибробластов в культуре клеток NHDF

Как видно на рисунке 1, КРШ в концентрациях 0,005 и 0,01 мг/мл заметного влияния на количество жизнеспособных клеток не оказывает. Так, эти величины в опытах составляют $7450 \pm 1,1$, $7310 \pm 1,7$, а в контроле $7400 \pm 1,3$ клет/см² соответственно. В концентрации КРШ 0,05 мг/мл наблюдается некоторое уменьшение количества фибробластов. Это может быть обусловлено тем,

что в таких концентрациях КРШ покрывают почти всю поверхность культуры и потому задерживают рост клеток.

В контроле клетки в течение всего срока наблюдения сохраняли способность равно-мерно пролиферировать и мигрировать, что играет важную роль в процессах регенерации. При культивировании с КРШ в концентрации 0,01 мг/мл заметных изменений не наблюдается (рисунок 2).

Таким образом, результаты модельных экспериментов с использованием фибробластов в культуре клеток ТЗВЗ показали, что КРШ не оказывают заметного негативного действия на эти клетки. Данные, полученные в модельных экспериментах, дают наглядное представление о том, каким образом процессы могут осуществляться в присутствии КРШ в опытах *in vivo*.

Литература

- 1 Решетников В.И. Разработка лекарственных форм препаратов с иммунобиологической и сорбционной активностью // Фармация. – 2002. - №5. – С. 40-44.
- 2 Курманбеков А.С. Биосорбенты на основе карбонизованных абрикосовых косточек и рисовой шелухи: автореф. ... канд. хим. наук. - Алматы, 2008. – 20 с.
- 3 Тимофеев В.С., Темкин О.Н., Гафаров И.Г. Патент РФ 2237013. Способ приготовления активированного угля из растительного сырья. –БИПМ. - № 27.27.09.2004.
- 4 Мансуров З.А., Жилибаева Н.К., Уалиева П.С., Мансурова Р.М. Получение и свойства сорбентов из растительного сырья // Химия в интересах устойчивого развития. - 2002. - Т. 10. - № 4. – С. 339-346.
- 5 Mansurov Z., Digel I., Biisenbaev M., Savitskaya I., Kistaubaeva A., Akimbekov N., Zhubanova A. Chapter 11: Heterogeneous Composites on the Basis of Microbial Cells and Nanostructured Carbonized Sorbents, Composite Materials / Book 2 Ed. Prof. Ning Hu: InTech Publ., 2012. ISBN 980-953-307-495-0. – P.271-295.