



УДК 606:61+576

## ВПЛИВ РЕКОМБІНАНТНОГО ТИМОЗИНУ БЕТА 4 НА ЗАГАЛЬНУ КІЛЬКІСТЬ ТА МЕТАБОЛІЧНУ АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРИ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН *VERO*

Студ. Кабан УД.М, гр. ББТск-17  
Науковий керівник доц. Н.М. Жолобак  
Київський національний університет технологій та дизайну

**Мета і завдання.** Мета – дослідження дії препарату рекомбінантного пептиду тимозину бета 4 (*Tβ4*) на перещеплювану культуру клітин нирок зеленої мавпи *Vero*, визначення його ефективної концентрації, що може бути підґрунтям для подальшого дослідження перспективності його застосування при пошкодженні ниркового епітелію. Для досягнення мети вирішено такі завдання: проведено аналіз літературних джерел; експериментально встановлено оптимальну – мінімальну ефективну концентрацію препарату, що підвищує життєздатність культури клітин *Vero*.

**Об'єкт та предмет дослідження.** Об'єкт дослідження – взаємодія рекомбінантного пептиду *Tβ4* з культурою клітин *Vero*. Предмет дослідження – визначення діапазону ефективних концентрацій *Tβ4*, які впливають на життєздатність культур клітин *Vero* за допомогою колориметричних методів та статистичного аналізу отриманих даних.

**Методи та засоби дослідження.** Дослідження виконано на культурі клітин *Vero* (клітини епітелію нирки зеленої африканської мавпи), яку вирощували на середовищі DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham з 7.5 % ембріональної сироватки телят (*Sigma Aldrich, USA*). Використовували препарат тимозин бета 4 (*Tβ-500, USA*). Оптичну густину лунок визначали на приладі Multiskan Ascent (*Thermo labsystem, Finland*).

**Наукова новизна та / або практичне значення отриманих результатів.** Вперше проведено дослідження впливу рекомбінантного пептиду *Tβ4* на життєздатність культури клітин *Vero*. Актуальність дослідження зумовлена необхідністю розробки нових вискоелективних терапевтичних препаратів та розширення сфери їх застосування завдяки здатності стимулювати регенеративні процеси та знімати внутрішньоклітинний оксидативний стрес.

**Результати дослідження.** Тимозин бета 4 – це пептид, що складається з 43 амінокислот та присутній у всіх клітинах ссавців. Вперше *Tβ4* був виділений з екстракту тимусу. Рекомбінантний *Tβ4* в медицині застосовується для прискорення загоєння ран, пов'язаних з різними захворюваннями (пошкодження рогівки, сполучної тканини), а також для відновлення міокарда після інфаркту, лікування ішемічних станів; *Tβ4* також проявляє протизапальну дію [1, 2].

Першим етапом дослідження був збір інформації та планування експерименту. В рамках дослідження до сформованого моношару культури клітин *Vero*, вирощених в 96-лунковому планшеті, вносили послідовні двократні розведення препарату *Tβ4*. Діапазон досліджених концентрацій препарату склав 0.02-2.0 мкг/мл. Контролем були інтактні, нічим не оброблені клітини. Кожній експериментальній точці відповідало не менше 5 значень. Планшет інкубували 24 год при температурі 37°C та 5 % CO<sub>2</sub>. Оцінку життєздатності клітин проводили, застосовуючи послідовно два тести: *MTT*-тест (тест визначення метаболічної активності мітохондріальних дегідрогеназ клітин, тривалість – 4 год) [3] та *CV*-тест (тест визначення загальної кількості адгезованих, прикріплених клітин, шляхом їх окраски фарбником кристалічним фіолетовим) [3]. Оптичну густину лунок у *MTT*-тесті визначали аналізатором відкритого типу Multiskan Ascent за довжини хвилі λ=492 нм, довжина хвилі λ=540 нм була використана для визначення оптичної густини лунок у *CV*-тесті. Отриманий набір значень аналізували із застосуванням методів непараметричної статистики, розраховуючи медіану та 1 і 3 інтерквартильний інтервал. Для оцінки достовірності відмінностей значень експериментальної групи та контролю клітин застосовували непараметричний U-критерій Манна-Уїтні.

**Сучасні матеріали і технології виробництва виробів  
широкого вжитку та спеціального призначення**

*Біотехнологія*

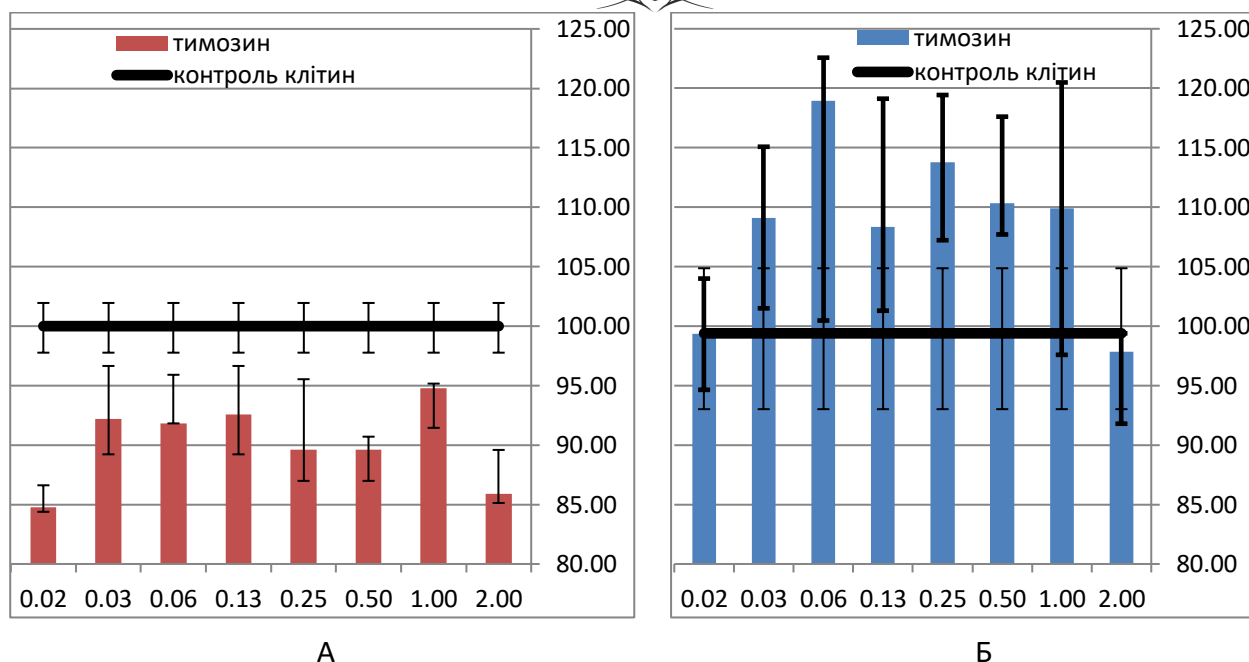


Рисунок 1 – Вплив 24 год контакту препарату рекомбінантного тимозину бета 4 на життєздатність культури клітин нирок зеленої мавпи Vero.

*Примітка.* По осі абсцис – концентрація препарату тимозин бета 4 (мкг/мл), по осі ординат – відсоток метаболічної активності клітин (MTT-тест, діаграма А) та загальної кількості клітин (CV-тест, діаграма Б), розрахованих відносно показників контрольних клітин, прийнятих за 100 %.

Аналіз даних MTT-тесту показав, що 24 год контакт препарату рекомбінантного T $\beta$  4 з перещеплюваними клітинами Vero супроводжувався достовірним зниженням метаболізму ( $P < 0.05$ ), хоча показники зниження метаболічної активності мітохондрій не перевищували 15 %. Такий рівень змін метаболічної активності клітин можна розглядати як відповідь на препарат в межах фізіологічної норми. Оцінка загальної кількості клітин (CV-тест) після контакту з препаратом T $\beta$  4 виявила її збільшення у діапазоні концентрацій 0.3-1.0 мкг/мл. Максимальна досліджена концентрація T $\beta$  4 – 2 мкг/мл – не впливала на загальну кількість клітин, що може бути побічним свідченням її незначної токсичної дії. Показано, що в концентраціях 0.25-0.5 мкг/мл препарат T $\beta$  4 за умови його 24 год. контакту з клітинами Vero достовірно ( $P < 0.05$ ) збільшував їх загальну кількість на 10-15 %. Загалом, отримані результати впливу препарату T $\beta$  4 на життєздатність клітин Vero свідчать, що його застосування оптимізує процеси їх росту: на фоні фізіологічного зниження на 10% метаболічної активності виявлено достовірне ( $P < 0.05$ ) зростання на 10-15 % загальної кількості клітин.

**Ключові слова:** Тимозин бета 4, рекомбінантний пептид, культура клітин нирок зеленої мавпи Vero, MTT-тест, CV-тест, життєздатність.

**Висновки.** Отримані результати свідчать, що 24 год контакт клітин Vero з препаратом T $\beta$  4 в діапазоні концентрацій 0.25-0.5 мкг/мл супроводжується достовірним ( $P < 0.05$ ) збільшенням загальної кількості клітин на фоні незначного (в межах фізіологічної норми) зниження метаболічної активації мітохондрій. Виявлений факт потребує більш детального вивчення, оскільки може допомогти поглибити наші знання про механізм дії тимозину бета 4.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Thymosin beta 4: A novel corneal wound healing and anti-inflammatory agent / Sosne G., Qiu P., Kurpakus-Wheater M. // *Clinical Ophthalmology*. – 2007. – 1(3). – P. 201–207.
2. Thymosin  $\beta$ 4-mediated protective effects in the heart / Hinkel R., Klett K., Bähr A., Kupatt C. // *Expert Opinion On Biological Therapy*. – 2018. – 18(sup1). – P. 121–129.
3. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions / Sliwka L., Wiktorska K., Suchocki P., et al. // *PLoS One*. – 2016. – 11(5). – P. 502–507.