

МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО
НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ
БОЛЕСТИ

София 1504, Бул. Янко Сакъзов 26
ДИРЕКТОР: 02/ 944 28
75; director@ncipd.org
ЦЕНТРАЛА: 02/ 944 69 99
ФАКС: 02/ 943 30 75



MINISTRY OF HEALTH
NATIONAL CENTRE
OF INFECTIOUS AND PARASITIC
DISEASES

BULGARIA, 1504 Sofia, 26 Yanko Sakazov
Blvd.
DIRECTOR: +359 2 944 28 75;
director@ncipd.org
TELEPHONE EXCHANGE: +359 2 944 69 99
FAX: +359 2 943 30 75

ФИНАЛЕН ОТЧЕТ

Относно: изпълнение на научна задача по договор между фирма A.V.S.T. TRADING Ltd. и Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ) на тема: “Проучване на цитотоксичния ефект на инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) – активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ върху клетъчни култури. Определяне на максимална нетоксична концентрация (MNC) и цитотоксична концентрация 50% (CD₅₀)“

Изпълнители:

1. доц. Петя Генова-Калу, дв – Зав. НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“, Отдел „Вирусология“, НЦЗПБ
2. доц. Стефка Крумова Иванова, дб – Зав. НРЛ „Морбили, паротит и рубеола“, Отдел „Вирусология“, НЦЗПБ
3. проф. Георги Лалев Дянков, дф – Институт по Оптични Материали и Технологии (ИОМТ), Българска Академия на Науките (БАН)
4. Катя Атанасова Георгиева-Димитрова – лаборант в НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“, Отдел „Вирусология“, НЦЗПБ

I. Актуалност на проблема

Едно от най-големите предизвикателства пред съвременната медико-биологична наука е необходимостта от създаване на нови, високо ефективни и добре поносими лекарствени препарати за лечение на вирусни заболявания. Въпреки значителните успехи на химиотерапията не може да се счита, че на сегашния етап в лечението на вирусни заболявания са постигнати окончателни резултати. Ниска селективност, значителна токсичност, възникването на резистентни мутанти, високия брой смъртни случаи и появата на нови зооантропонозни вируси са основните причини за търсене на нови противовирусни средства.

През последните години се наблюдава ръст на проучванията на антивирусните и имуномодулиращи свойства на биологично активни молекули.

II. Материали и Методи

Вещество

Инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) - активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ предоставени от фирма A.V.S.T. TRADING Ltd..

IPF е разтворен до начална концентрация 50 mg/ml (изходен разтвор). От него *ex tempore* се приготвят серия от разреждания с хранителна среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Germany), съдържаща 2% фетален телешки серум (FBS, Gibco) и 1% антибиотичен разтвор (100 U/ml penicillin и 100 µg/ml streptomycin sulphate (Gibco, USA)) (работни разтвори), които се филтрират през стерилни антибактериални филтри с диаметър на порите 0.45 µm (Sartorius Stedium, Australia).

Клетъчно култивиране

Като моделна система в проведените изпитвания се използва монослойна клетъчна линия от бъбрек на Африканска зелена маймуна (*Cercopithecus aethiops*) (линия Vero), която е любезно предоставена от Банката за Клетъчни Култури на НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“, НЦЗПБ, гр. София. Клетките се култивират в хранителна среда DMEM, с добавени към нея термоинактивиран 10% FBS, 1% натриев пируват (Sigma-Aldrich, Germany) и антибиотици (penicillin (100 U/ml), streptomycin sulphate (100 µg/ml) (растежна среда). Клетъчните култури се инкубират на 37°C при 5% CO₂ и наличие на необходимата влажност на въздуха. Пасирането на Vero клетките се извършва 1:3 – 1:5 с плътност около 2 x 10⁵ клетки/ml, след което се ресуспендират неколккратно и се разливат в матраци за клетъчно култивиране (25 cm²) (Orange Scientific, Belgium). Преди инокулиране на клетките с вирус и/или съответните разреждания от IPF, монослоят се промива трикратно с фосфатно соли буфер (PBS) с рН 7.4 за 1 – 2 min, след което разтворът се отстранява. Всички експерименти са проведени по време на експоненциалната фаза на растежа на клетките.

Пасиране на клетъчна култура

Разсяването на клетките се извършва с помощта на разтвор, съдържащ 0,05% трипсин (Trypsin) и 0,0025% етилендиаминтетраоетна киселина (EDTA) (Sigma-Aldrich, Germany), предварително темпериран на 37°C. Клетките се третират около 3 – 10 min с този разтвор, докато започнат да се окръглят и дисоциират. В последствие разтворът на трипсин-версен се заменя с малък обем растежна хранителна среда, прилага се тест с трипаново синьо за отдеференциране на живите от мъртвите клетки, преброяват се с помощта на хемоцитометър, разреждат се до определен обем с гъстота 2 x 10⁵ клетки/mL и се ресуспендират в матраци за клетъчно култивиране. Клетките се култивират на 37°C при 5% CO₂ и наличие на необходимата влажност на въздуха.

Тест за оцветяване на мъртви клетки с трипаново синьо

Аликвоти от клетъчна суспензия се смесват с равен обем 0.4% разтвор на багрилото трипаново синьо, наблюдават се под инверторен светлинен микроскоп и с помощта на хемоцитометър, се преброяват живите (неоцветени, с бистра цитоплазма) и мъртвите (оцветени в тъмносиньо) клетки.

Замразяване и размразяване на клетки

Замразяването и размразяването на клетки е осъществено по общоприетите методи, както е описано от Pegg D., 2007. За замразяване са използвани клетки, намиращи се в логаритмична фаза на растеж. Те са еднократно промивани с хранителна среда DMEM (5 – 10 min, 800 – 1500 rpm/min, 4°C). Полученото депо от клетки се ресуспендира в хранителна среда и FBS (90%) и клетъчната суспензия се охлажда на лед (2 - 4°C), след което към нея при непрекъснато разбъркване се добавя DMSO до крайна концентрация 10%. Клетките се разпределят в предварително охладени ампули (0,5 – 1 mL/клетъчна суспензия/ампула) и поставят в стиропорена кутия във фризер на -80°C. След изтичане на минимум 24 h ампулите се прехвърлят в течен азот (-196°C). Клетките се замразяват в концентрация не по-малка от 1×10^6 клетки/mL, а най-често - 5×10^6 клетки/ампула.

При размразяването на клетките, ампулите се поставят бързо в съд със затоплена до 37 - 40°C вода и след размразяването им се прехвърлят веднага в хранителна среда, съдържаща 10% FBS. С цел предотвратяване на токсичното влияние на DMSO хранителната среда се заменяна с нова, веднага след прилепването на клетките към подложката (не по-късно от 20 h след засяването им).

Определяне на клетъчната жизнениост

За оценка на относителната клетъчна преживяемост и пролиферация са използвани три метода: 1) микроскопско наблюдение на морфологичните изменения в монослоя на третираните клетки; 2) колориметричен МТТ анализ и 3) изследване на кинетиката на пролиферативната активност на третираните клетки чрез метода на повърхнинен плазмонен резонанс (SPR анализ).

1) Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой

Клетъчният монослой се наблюдава на всеки 24 h под инверторен светлинен микроскоп за типична цитопатология, характеризираща токсичен ефект в третираните клетки. Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на Vero клетките е синхронизиран с МТТ анализа на клетъчната преживяемост.

2) МТТ анализ

МТТ ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] багрилото е водно-разтворима тетразолиева сол, придаваща жълтеникав цвят на разтвора. Поставено в хранителната среда на клетките, МТТ преминава в клетъчния цитозол, достига до митохондриите, където митохондриалните дехидрогенази откъсват тетразолиевия пръстен и превръщат разтворимата жълта сол в неразтворим във вода син формазанов продукт. Способността на клетките да редуцират МТТ е показател за митохондриалната цялост и активност, което се интерпретира като мярка за жизнениост и/или числеността на жизнеспособните клетки. Мъртвите клетки не участват в това превръщане, поради нефункциониране на митохондриите им. Количеството на трансформирания МТТ до неразтворими формазанови кристали е пропорционално на броя на живите клетки. За измерване на количеството формазан, клетките се обработват с разтвор, който ги лизира и едновременно с това разтваря сините формазанови

кристали. Количеството на последните се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната $\lambda = 540 \text{ nm}$.

След преброяването на клетките, последните се ресуспендират в растежна хранителна среда, суплементирана с 2% FBS. Следва разсяване на клетъчната суспензия, с концентрация 5×10^4 клетки/ямка в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium) (по 0.2 mL/ямка). Поради данни, получени експериментално, че в крайните редове и колони се наблюдава намаляване на обема при по-дълготрайно култивиране, в тях не се посяват клетки. Там се накапва само хранителна среда без FBS. Когато клетъчният монослой достигне между 70 – 80% конfluентност (обикновено след 24 h), надстоящата течност се отдекантира и се прибавя по 0.1 mL поддържаща хранителна среда и по 0.1 mL от предварително приготвените разреждания от IPF в концентрационен диапазон 0.0001 – 20 mg/mL. С всяко едно разреждане от IPF са накапани минимум по 3 ямки. В няколко ямки е накапана само хранителна среда без вещество (по 0.2 mL), която да служи за клетъчна контрола. Тъй като използваният обем вещество (с дадена концентрация) при накапване в ямката е разреден два пъти, реалната концентрацията на всяко добавено разреждане е два пъти по-ниска от предварително приготвената. Така обработените плаки се инкубират на 37°C в продължение на 72 h. В края на третия ден във всяка ямка (с изключение на крайните редове и колони) се накапва по 0.02 mL работен разтвор на MTT (с изходна концентрация 0.05 mg/mL), след което плаките са инкубират на 37°C в продължение на 3 h. Хранителната среда с разтвореното в нея MTT след инкубацията се отстранява, след което се добавя 0.2 mL от лизиращия разтвор, съдържащ етанол : DMSO (v:v). Така обработената плаката се отчита спектрофотометрично при $\lambda = 540 \text{ nm}$ с помощта на ELISA reader (Bio-Tek Instruments, Germany). Клетъчната преживяемост се определя като % на живите клетки в ямките, третирани с различни концентрации от изследваната субстанция, в сравнение с контролните нетретирани клетки.

За целта се използва следната формула:

$$\% \text{ клетъчна преживяемост} = \text{OD}_{\text{третираните клетки}} / \text{OD}_{\text{клетъчна контрола}} \times 100$$

Стойностите на максимална нетоксична концентрация (MNC) и цитотоксична концентрация 50% (CD_{50}) на тестваната субстанция спрямо Vero клетъчна линия са изчислени въз основа на построената крива „доза (концентрация) – клетъчна преживяемост с помощта на GraphPad Prism софтуер (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

- Цитотоксична концентрация 50% (CD_{50}) се дефинира като концентрацията на изследваното вещество, при която 50% от клетките умират в резултат на токсичното действие на субстанцията.

- Максимална нетоксична концентрация (MNC) се дефинира като най-високата концентрацията на изследваната субстанция, която не предизвиква увреждане или смърт на третираните клетки. Двете величини в експериментите са изразени в mg/mL.

3) Определяне на кинетиката на пролиферативната активност на третирани с IPF клетки чрез SPR анализ при различно време на експозиция

Измерванията са правени през 2 часа до 48-я час на развитие на вирусната инфекция, като последните часове съвпадат с началните цитопатични клетъчни промени. По правило, увеличението/намаляването на ППР сигнала е следствие на увеличаване/ намаляване на ефективния показател на пречупване на монослоя клетки в резултат на морфологичните изменения в клетките, предизвикани в процеса на вирусна репликация. Етапите на репликационния цикъл - адсорбция, проникване на вируса в клетката, промени в клетъчния метаболизъм, както и сглобяването и освобождаването на дъщерното потомство, причиняват такива изменения и съответно генерират ППР сигнал.

Статистическа обработка на получените резултати

Получените данни са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност (SEM) от поне два отделни експеримента, всеки проведен в от три до пет повторения. Статистически значимите разлики в преживяемостта/пролиферацията между нетретирани контроли и третирани с различни концентрации проби бяха определяни посредством еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA и последващ тест на Dunnett. Статистически значими различия между нетретирани контроли и третирани проби са определяни посредством t-теста, като стойностите при $p < 0.05$ се определят като статистически значими.

III. Резултати

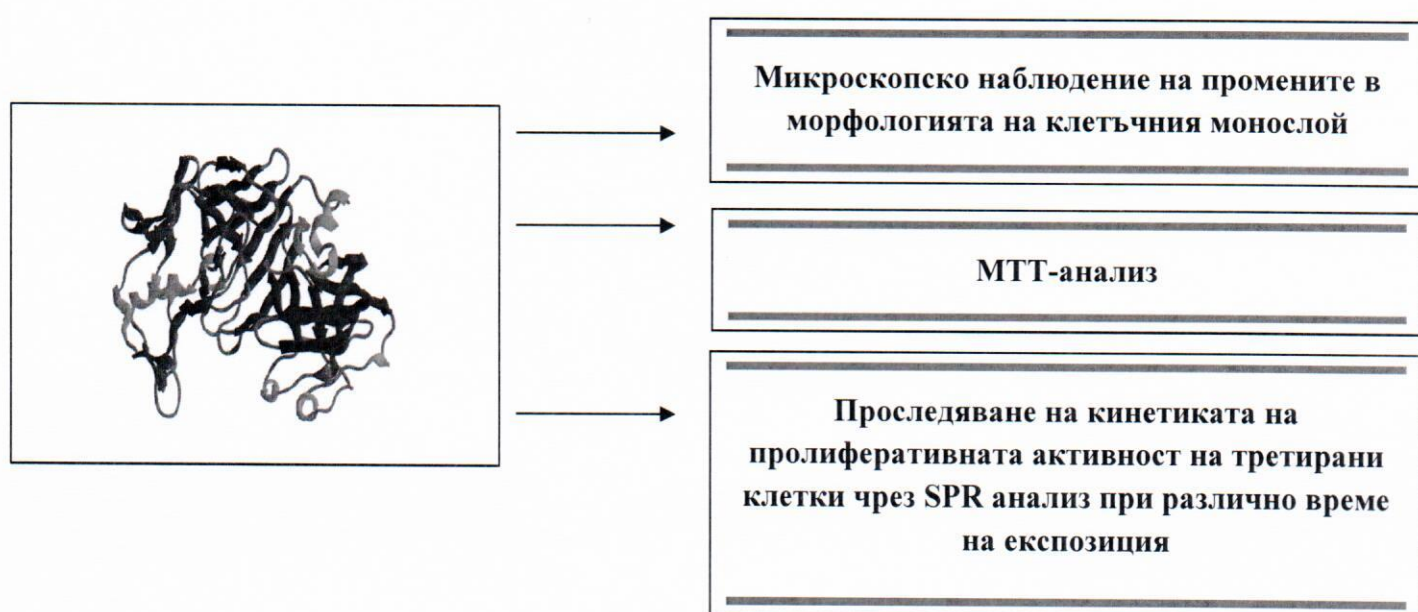
1. Влияние на инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки

Първият важен етап от антивирусните експерименти включва определяне на цитотоксичността на изпитваната субстанция върху култивирани в лабораторни условия клетки от линия Vero. При скрининговите анализи за оценка на относителната клетъчна преживяемост и пролиферация са използвани паралелно три метода: 1) микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой; 2) МТТ анализ и 3) проследяване на кинетиката на пролиферативната активност на третирани клетки чрез SPR анализ (Фигура 1). Преживяемостта е отчетена при различно време на експозиция след третиране с инактивиран пепсинов фрагмент (IPF), тъй като през различен времеви интервал може да се наблюдава съществена пролиферация на клетките, да се оцени директния токсичен ефект на изследваната субстанция, водещ до клетъчна смърт, както и да се проследят морфологичните промени, настъпили в клетките в резултат на третирането.

МТТ анализът на клетъчната преживяемост и пролиферация се проведе в широк концентрационен диапазон на изследвания пепсинов фрагмент IPF. Границите, в които варираха приложените концентрации са подбрани въз основа на предварителни експерименти, включващи по-големи концентрационни интервали, с цел точно установяване стойностите на CD_{50} и MNC. Изпитваната субстанция IPF е приложена в концентрационен диапазон 0.0001 – 20 mg/mL, във времеви интервал 2 – 96 h. Нетретирани Vero клетки, чиято преживяемост бе приета за 100%, са използвани като

отрицателна контрола. От използвания МТТ-тест са получени дозо-зависими криви на въздействието върху жизнеността на клетъчния монослой на приложения IPF. Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на клетките е синхронизиран с МТТ анализа на клетъчната преживяемост и е оценена кинетиката на пролиферативната активност на третираните клетки чрез SPR анализ при различно време на експозиция.

Фигура 1. Схематично представяне на последователните етапи за реализиране на експериментите



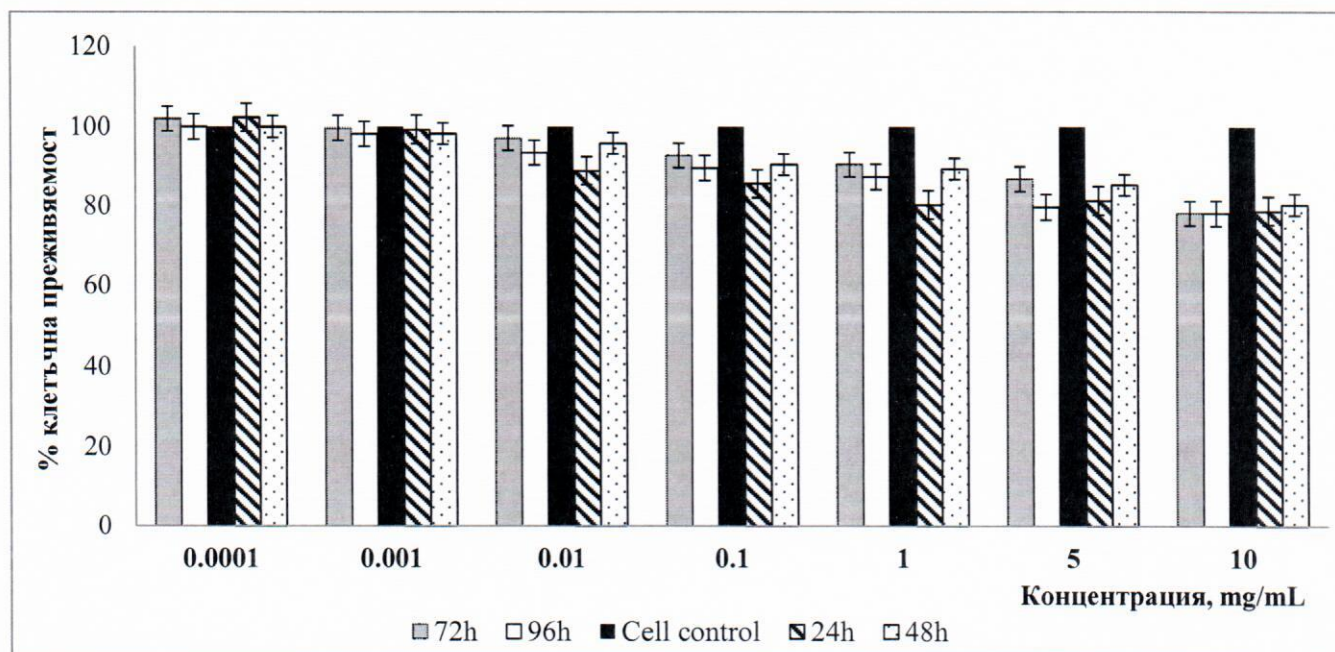
Получените резултати показват, че като цяло преживяемостта на третираните монослойни клетки от линия Vero не намалява драстично под въздействие на изпитвания инактивиран пепсинов фрагмент (IPF). При най-ниските изследвани инкубационни концентрации (0.0001 – 0.1 mg/mL) се наблюдава сравнително слабо инхибиране на преживяемостта (90.34 – 99.52 %), докато при последващите нарастващи концентрации (от 5 mg/mL до 20 mg/mL) стойността на клетъчната преживяемост се понижава и достига стойност близка до 78%, която по ISO 10993 за изследване на цитотоксичност на медицински изделия в клетъчни култури се приема за нетоксична (“нетоксична концентрация е тази, при която преживяемостта на клетките не спада под 75%”). Със статистическа значимост са разликите в преживяемостта между нетретирана контрола и третирана проба при приложени дози от 0.0001 mg/mL ($p < 0.001$) и от 1 mg/mL ($p < 0.05$) (Фигура 2).

При сравняване на експерименталните данни за клетъчната преживяемост става ясно, че широко използваните като положителни контроли в антивирусните експерименти противовирусни препарати: ацикловир (ACV), ремдесивир (REM),

оселтамивир фосфат (Tamiflu) и хидрохлорокин (HQV) са по-токсични около 35 пъти в сравнение с IPF (Фигура 2) (данните не са представени в този доклад).

В заключение, тествания IPF не проявява токсичност върху клетки от линия Vero след 96 h на третиране, приложен в концентрации от 0.0001 mg/mL до 5 mg/mL.

Фигура 2. Влияние на IPF върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Vero, отчетено чрез MTT анализ след време на експозиция (от 24 h до 96 h).



Понижаването на броя адхерентни живи клетки, както и окръглянето и намаляването на размера на клетките следват тенденцията, установена при MTT анализа (Таблица 1).

Визуализирането на измененията в морфологията на клетъчния монослой след третиране е достъпен и надежден подход при първоначалното проучване на цитотоксичността на различни субстанции.

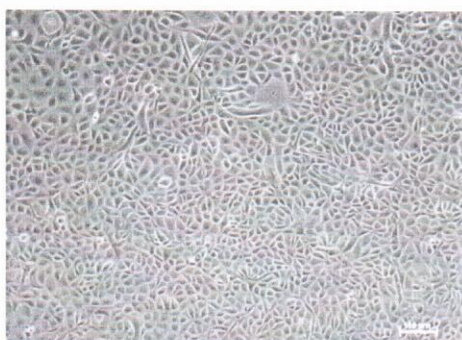
Във връзка с това, паралелно с провеждането на MTT анализа, под инверторен светлинен микроскоп са проследени промените в морфологията на клетките, изложени на действието на тествания IPF и противовирусният препарат ACV. Нетретираните контролни клетки и третираните с IPF клетки в концентрационен диапазон 0.0001 - 10 mg/mL, запазват своята морфология и структура (Фигура 3).

При третираните с инактивиран пепсинов фрагмент IPF Vero клетки се наблюдава слабо концентрационно-зависимо понижение на пролиферацията, като редукцията е от 98.54% при концентрация 0.0001 mg/mL до 78.28% при най-високата доза от 10 mg/mL.

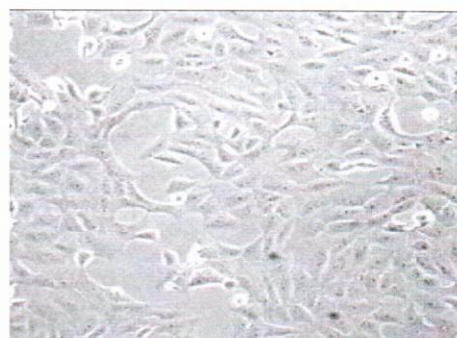
Таблица 1. Влияние на IPF върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Vero, отчетено чрез различни методи след различно време на експозиция с тестваната субстанция (24 h – 96 h)

Време на експозиция	Метод	MNC (mg/mL)	CD ₅₀ (mg/mL)
24 h	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.1 ± 0.1	15 ± 0.05
	MTT тест	0.1 ± 0.12	15 ± 0.22
48 h	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.1 ± 0.05	10 ± 0.5
	MTT тест	0.1 ± 0.3	10 ± 0.03
72 h	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.1 ± 0.22	10 ± 0.01
	MTT тест	0.1 ± 0.5	12.5 ± 0.05
96 h	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.1 ± 0.02	10 ± 0.5
	MTT тест	0.1 ± 0.15	10 ± 0.03

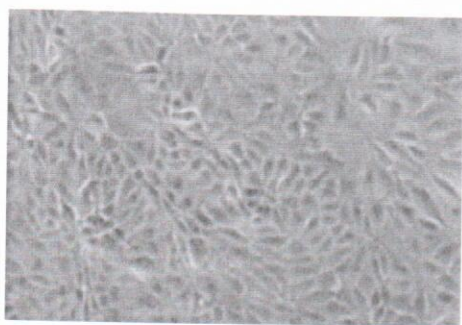
Фигура 3. Цитотоксичен ефект на IPF върху клетки от линия Vero след различно време на експозиция (24 h – 96 h) (Снимка А – Г).



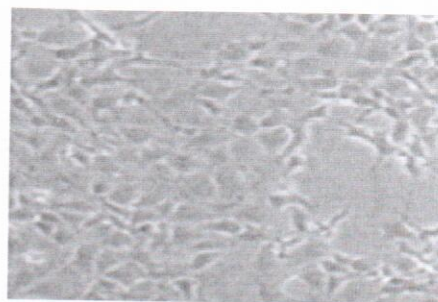
А. Нетретирани Vero клетки



Б. Третирани с IPF (1 mg/mL) Vero клетки на 24 h



В. Третираны с IPF в MNC (0.1 mg/mL)
Vero клетки на 48 h



Г. Третираны с IPF в MNC (1 mg/mL)
Vero клетки на 96 h

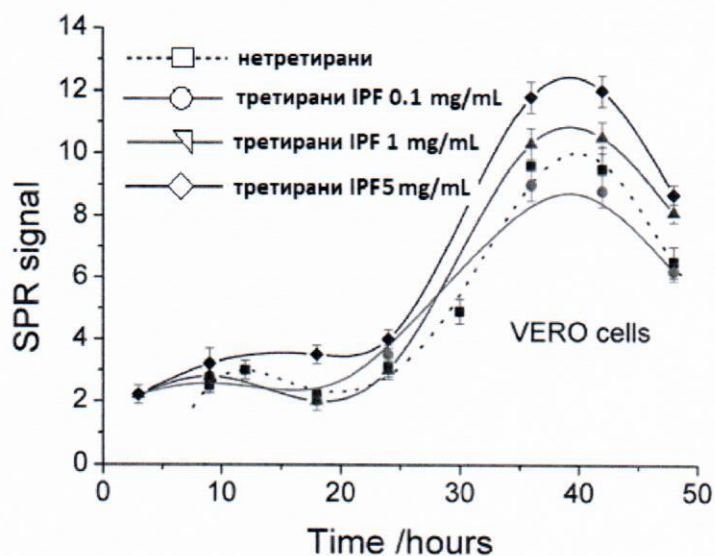
3) *Определяне на кинетиката на пролиферативната активност на третираны с IPF клетки чрез SPR анализ при различно време на експозиция*

Контролните SPR условия се определят за чипа с нетретиран монослой от клетки (клетъчна контрола). Една част от чиповете се третират с IPF с концентрации 0.1 mg/mL, 1 mg/mL и 5 mg/mL, определени чрез МТТ анализ и отговарящи на МНК и близки до нея. Резултатите от SPR анализа са показани на Фигура 4. Кривите показват кинетиката на пролиферативната активност на третираны с IPF клетки (в МНК и близки до нея) и нетретираны (клетъчна контрола) при различно време на експозиция.

Експоненциалното нарастване на сигнала в интервала 24 h – 40 h от третираните и контролните клетки е свързано с повишаване на плътността върху чипа, а оттам и с и по-голяма клетъчна преживяемост. Този процес е най-интензивен около 24 h и 40 h, което съвпада с времето на активно делене на клетките и удвояване на броя им. Вследствие на това се наблюдава увеличаване на клетъчната плътност и компактизиране на хроматиновата структура в ядрата им, което води, от своя страна до увеличаване на показателя на пречупване (в интервала 24 h – 40 h). Прави впечатление, че клетъчната жизненост при третираните с инактивиран пепсинов фрагмент IPF в концентрация 0.1 mg/mL (МНК) и близки до нея (1 mg/mL и 5 mg/mL) следват същата тенденция на увеличение на сигнала както при клетъчната контрола, което доказва липсата на токсичност на приложеното вещество.

Интервалът 2 - 20 час не е свързан с дефинитивни промени в плътността на клетките, поради което изменението на SPR сигнала не е съществено. След 48 h няма увеличаване на SPR сигнала, тъй като клетъчната плътност върху чипа намалява с течение на времето.

Фигура 4. Сравнение на нетретирани и третирани с IPF клетки в различни концентрации и при различно време на експозиция чрез SPR анализ



IV. Заключение

Тестваният инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) - активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ не проявява токсичност върху клетки от линия Vero в различни интервали на експозиция (24 h – 96 h), приложен в концентрации от 0.0001 mg/mL до 5 mg/mL.

V. Използвана литература

1. De Clercq E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Res.*, 2005, 67: 56 – 75.
2. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 704 –720.
3. Bean B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clin Microbiol Res.*, 1992, 5(2): 146 – 182.
4. De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov.*, 2002, 1: 13 – 25.
5. Littler E, Oberg B. Achievements and challenges in antiviral drug discovery. *Antiviral Chem & Chemother.*, 2005, 16: 155 – 168.
6. Ricardo R, Phelan K. Trypsinizing and subculturing mammalian cells. *J Vis Exp*, 2008, 16: 755 – 759.
7. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.*, 2001, Appendix 3: Appendix 3B.

8. Pegg D. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.*, 2007, 368: 39 –57.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, 1983, 65(1-2): 55 - 63.

13.10.2021 г.
Гр. София

Обобщил:.....
(доц. Петя Генова-Калу, д-р)

Одобрил:.....
(проф. д-р Ива Христова, д-р, м-р)

