ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-3-492-502
УДК 613.292

Оригинальная статья
http://fptt.ru

Разработка и влияние добавки из лимфоидной ткани птицы на жизнеспособность клеток в культуре

Н. А. Кольберг, Н. В. Тихонова, С. Л. Тихонов*, С. А. Леонтьева

Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию: 29.03.2021
Принята после рецензирования: 30.04.2021
Принята в печать: 15.07.2021

**e-mail: tihonov75@bk.ru*
© Н. А. Кольберг, Н. В. Тихонова, С. Л. Тихонов, С. А. Леонтьева, 2021

Аннотация.
Введение. Биологически активные добавки (БАД) к пище широко используются в питании человека. В качестве сырья для их производства используют различные гидролизаты животного сырья. С учетом распространения иммунологических заболеваний одним из важных направлений развития пищевой биотехнологии является разработка и оценка биологически активных добавок иммуномодулирующего действия, для профилактики заболеваний. Цель исследования – разработка БАД из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров и оценка ее влияния на жизнеспособность клеток в культуре.
Объекты и методы исследования. Биологически активная добавка, полученная ферментативным гидролизом фабрициевой сумки, незрелые стволовые клетки, зрелые дифференцированные клетки – дермальные фибробласты человека, культуры опухолевых клеток линий HeLa и MCF-7 и экстракт фабрициевой сумки.
Результаты и их обсуждение. Разработана технология БАД из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров, включающая промывку сырья проточной водой, куттерование, гомогенизацию, ферментирование протеолитическим ферментом и ультрафильтрацию. При внесении БАД в культуру мезенхимальных стволовых клеток наблюдается незначительное снижение их жизнеспособности при концентрации препарата в 25 и 50 %, что свидетельствует о возможном цитотоксическом влиянии экстракта на мезенхимальные клетки. При внесении экстракта фабрициевой сумки в культуру фибробластов человека не наблюдается достоверного изменения жизнеспособности клеток. Это свидетельствует об отсутствии цитотоксического влияния, а также об отсутствии повышения жизнеспособности клеточной культуры. При внесении БАД в культуру MCF-7 выявлено дозозависимое цитотоксичное влияние БАД на культуру, что приводит к уменьшению их относительной жизнеспособности.
Выводы. Разработанная БАД оказывает цитотоксический эффект на культуры стволовых клеток и не оказывает выраженного влияния на жизнеспособность и не проявляет цитотоксического действия по отношению к дермальным фибробластам человека. Действие БАД оказалось различным в отношении культур клеток. В случае с HeLa БАД стимулирует пролиферативную активность, а в случае с MCF-7 оказывает цитотоксический эффект. БАД имеет перспективы использования в качестве действующего начала для различных биологически активных добавок и лекарственных препаратов иммуномодулирующего действия.

Ключевые слова. Биологически активная добавка, культуры клеток, жизнеспособность клеток, цыплята-бройлеры, фабрициевая сумка, иммуномодулятор, пептиды

Для цитирования: Разработка и влияние добавки из лимфоидной ткани птицы на жизнеспособность клеток в культуре / Н. А. Кольберг [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2021. Т. 51. № 3. С. 492–502. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-3-492-502.

Original article
Available online at http://fptt.ru/eng

Effect of Dietary Supplement from Lymphoid Tissue of Chickens on Cell Viability

Natalia A. Kolberg, Natalia V. Tikhonova, Sergei L. Tikhonov*, Svetlana A. Leontieva

Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia

Received: March 29, 2021
Accepted in revised form: April 30, 2021
Accepted for publication: July 15, 2021

**e-mail: tihonov75@bk.ru*
© N.A. Kolberg, N.V. Tikhonova, S.L. Tikhonov, S.A. Leontieva, 2021

Abstract.
Introduction. Today, dietary supplements are an integral part of human diet. Some of them are made of hydrolysates of animal origin. Biologically active additives of immunomodulatory action can prevent various diseases. The research objective was to develop a dietary supplement from the bursa of Fabricius obtained from broiler chickens and evaluate its effect on cell viability in culture.
Study objects and methods. The study featured biologically active supplement obtained by enzymatic hydrolysis of the bursa of Fabricius, immature stem cells, and adult differentiated cells of human dermal fibroblasts, HeLa and MCF-7 cancer cells, and extract of the bursa of Fabricius.
Results and discussion. The research resulted in a new technology of dietary supplement production from the bursa of Fabricius of broiler chickens. It included washing, cutting, homogenization, proteolytic enzyme fermentation, and ultrafiltration. When introduced into the culture of mesenchymal stem cells, the dietary supplement caused a slight decrease in the cell viability at concentrations of 25 and 50%, which indicated a possible cytotoxic effect of the extract on mesenchymal cells. The extract did not affect the viability of human fibroblast culture and caused no cytotoxic effect. In MCF-7 culture, the extract had a dose-dependent cytotoxic effect, which lowered the relative cell viability.
Conclusion. The new dietary supplement based on the bursa of Fabricius of broiler chickens had a cytotoxic effect on stem cell cultures. However, it did not affect the cell viability and had no cytotoxic effect on human dermal fibroblasts. The effect depended on the cell culture. In the case of HeLa, the supplement stimulated proliferative activity, and in the case of MCF-7, it had a cytotoxic effect. Therefore, the new dietary supplement demonstrated some prospects as an active ingredient for various biologically active additives and immunomodulatory drugs.

Keywords. Dietary supplement, cell cultures, cell viability, broiler chickens, fabricium bag, immunomodulator, peptides

For citation: Kolberg NA, Tikhonova NV, Tikhonov SL, Leontieva SA. Effect of Dietary Supplement from Lymphoid Tissue of Chickens on Cell Viability. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(3):492–502. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-3-492-502.

Введение

На сегодняшний день биологически активные добавки к пище (БАД) широко используются в питании человека в России и еще в большем масштабе за рубежом. Все большую актуальность приобретает использование БАД в рационе лиц, ведущих активный образ жизни, и спортсменов для восстановления после интенсивных тренировок [1].

В качестве сырья для производства БАД используют различные гидролизаты растительного и животного сырья. БАД на основе водных экстрактов из сыра Коопех с белковыми ультрафильтрационными фракциями менее 2 кДа обладает антимикробной активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* и *Salmonella enterica*, а с фракциями более 2 кДа, в которых доминируют пептиды с молекулярными массами 3896,91, 3937,42, 3926,57, 3702,51 и 3692,87 Да, имеют антиоксидантную активность [2].

Гидролизат перьевого белка, полученный с помощью антарктической кератинолитической бактерии *Pedobacter* sp. 3.14.7, обладает высокой антиоксидантной активностью. Этот штамм бактерии разлагает сырое перо в белковый гидролизат при условиях 30 г пера/литр воды, pH 6,0 и температуре 20 °C. Разработанный ферментативный гидролизат предполагается использовать в качестве дополнительного источника белка и антиоксиданта [3].

Л. В. Федуловой и Э. Б. Кашиновой разработана биологически активная добавка в форме экстрактов поджелудочной железы, слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки свиней [4]. Такие экстракты имеют различную молекулярную массу от 50 до 2 кДа. Исследованиями *in vitro* доказано, что внесение БАД в количестве 100 нг/мл в питательную среду для эксплантатов желудка и кишечника 10-дневных куриных эмбрионов стимулирует их рост. При этом наибольшей активностью обладает низкомолекулярная фракция пептидов с молекулярной массой менее 5 кДа. Отмечено достоверное повышение индекса площади (ИП) эксплантатов тканей желудка и кишечника на 60 и 50 % относительно контроля с образованием монослоя эпителиоцитов, характеризующиеся высокой пролиферативной активностью.

K. Raja с соавторами разработан экстракт сырой кожи морского сома *Tachysurus dussumieri* и исследована его противоопухолевая эффективность на клеточной линии рака толстой кишки человека методом МТТ-анализа. Концентрацию ингибирования (IC_{50}) получали по 600 мкг/мл через 24 ч [5]. Фрагментация ДНК и результаты проточной цитометрии показали, что экстракт кожи морского сома индуцирует конденсацию хроматина, апоптотическую гибель клеток, а также нарушает клеточный цикл в фазе G_0/G_1 на линии клеток рака толстой кишки (рис. 1).

БАД, полученная ферментативным гидролизом мышечного белка *Oratosquilla woodmasoni* с использованием термолизина и пепсина с последующей ультрафильтрацией на мембранной

Рисунок 1. Схема получения и влияние экстракта кожи морского сома на клеточную линию рака толстой кишки человека

Figure 1. Sea catfish skin extract: production and effect on human colon cancer cells

установке, очисткой с помощью гель-фильтрационной хроматографии (GFC) и быстрой белковой жидкостной хроматографии (FPLC), состоит из 5 аминокислотных последовательностей (Asn-Gly-Val-Ala-Ala) с молекулярной массой 431 Да через LC-MS/MS TH1-A1 (рис. 2). Исследованиями доказано, что БАД-пептид не оказывает токсического действия на клетки MCF-7 и имеет высокую антиоксидантную активность при pH от 2 до 10. Пептид может быть лучшей альтернативой нутрицевтической и функциональной пище после дополнительных исследований [6].

F. Rivero-Pino и др. получены БАД биоактивные пептиды, выделенные из белка насекомых с помощью ультразвука [7]. Кратковременное действие ультразвуковых волн на сырье увеличивало последующее высвобождение биоактивных пептидов, но более длительное время ультразвуковой обработки ограничивало их производство. Гидролиз субтилизина не позволил высвободить ингибирующие α-глюкозидазу пептиды. Но он необходим для расщепления белка, до того как трипсин высвободит эти пептиды. Эти высокоактивные гидролизаты в

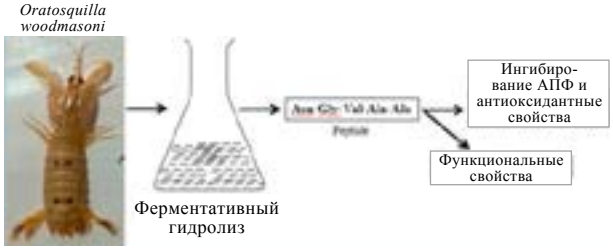

Рисунок 2. БАД, полученная ферментативным гидролизом мышечного белка *Oratosquilla woodmasoni*

Figure 2. Biologically active supplement obtained by enzymatic hydrolysis of *Oratosquilla woodmasoni* muscle protein

форме БАД, которые могут быть использованы в качестве ингредиента, регулирующего гликемический индекс в рецептуре пищевых продуктов.

Сегодня особую актуальность в биотехнологии приобретают методы оценки эффективности новых БАД животного происхождения *in vitro* («в пробирке»). Эксперименты проводятся вне живого организма с использованием культур живых клеток или бесклеточных моделях, применяющиеся в различных областях: молекулярной биологии, биохимии, фармакологии, медицине, генетике и др. За последние годы методы *in vitro* находят все большее применение в различных областях. Возможность использования клеточных культур в экспериментах в настоящее время широко используется с целью прогнозирования токсических и терапевтических эффектов биологически активных веществ животного происхождения. Это связано с возможностью оценить взаимодействие изучаемых веществ с клеткой в «чистом виде», выявлять изменения клеточных и субклеточных структур, которые в условиях целостного организма могут маскироваться или видоизменяться компенсаторными и регуляторными механизмами единой системы [8].

M. Taroncher и др. проведено исследование с целью определения цитотоксичности Токсин Т-2 (трихотецен типа А, продуцируемый видами *Fusarium*) на клетках гепатокарциномы человека (HepG2); оценки наличия адаптивного ответа клеток HepG2 при воздействии низких концентраций Т-2; идентификации метаболитов Т-2 с помощью LC-Q-TOF MS; нарушение Т-2 пролиферации клеток в клетках HepG2 [9]. IC_{50} полученные значения варьировались от 61,9 ± 2,4 Нм до 70,7 ± 7,4 Нм. Адаптивной реакции не наблюдалось. Не было никаких доказательств экстра- или внутриклеточного накопления Т-2 после 24 ч воздействия, как это определено LC-Q-TOF. Однако некоторые метаболиты Т-2, такие как токсин HT-2, неосоланиол и триол Т-2, показали важное (> 75 %) внутриклеточное накопление. Распределение клеток было значительно увеличено в фазе SubG0/G1 (в 11,8 раза выше) и уменьшено (на 12 %) в фазе G2/M при 60 нМ Т-2 по сравнению с контролем. Одновременно в клетках HepG2, подвергнутых воздействию Т-2, наблюдался повышенный некроз (238 %) и апоптоз/некроз (до 35,5 %). Исследования авторов доказывают, что Т-2 приводит к потере жизнеспособности клеток без адаптивного ответа и что образующиеся метаболиты играют важную роль в цитотоксичности Т-2, увеличивая повреждение клеток HepG2.

Для использования биотехнологических методов при исследовании жизнеспособности культур клеток необходимо разработать биопроцессы, обеспечивающие соответствующие условия для роста стволовых клеток от низких начальных количеств до желательных значений. L. Shafiei Kaleybar с

соавторами был разработан и смоделирован простой и эффективный концептуальный биопроцесс на основе перемешиваемого резервуарного биореактора, содержащего внутреннюю трубку с секвенирующей системой порционной аэрации для прогнозирования производительности массового производства суспендированных стволовых клеток [10]. Исходя из конструктивных параметров биопроцесса, а также характеристик клеток и конечной плотности клеток, общий объем биореактора, необходимый как для жидкой, так и для газовой фаз, был выбран 400 мл, включая внутреннюю трубку диаметром и высотой 2 и 10 см соответственно. Система аэрации рассматривалась в зависимости от нормы расхода O_2 и нормы выработки CO_2 в качестве суточной замены общей газовой фазы (при положительном давлении 1 %). Обмен среды также рассматривался как замена половины жидкой фазы новой средой каждые три дня. После записи соответствующих балансов массы биопроцесс моделировался, а производительность системы прогнозировалась на 10-дневный период культивирования. Разработанная биореакторная система предсказала, что окончательное количество клеток может быть достигнуто в течение 10-дневного культивирования из небольшой биопсии без проблем, вызванных нехваткой или критическим накоплением каких-либо материалов. Концептуальное моделирование биопроцесса и прогнозирование производительности показали большой потенциал для изучения системы культивирования для производства суспендированных стволовых клеток.

Аутофагия – важный катаболический путь, играющий важную роль в физиологической функции печени. Результаты исследований [11] свидетельствуют о том, что воздействие 3-хлор-1,2-пропандиол (3-MCPD токсикант, образующийся при термической обработке некоторых пищевых продуктов) вызывает токсичность в печени, но механизм остается неизвестным. Также в данной работе авторы исследовали влияние 3-MCPD на аутофагический поток и проследили молекулярный механизм в клетках HepG2 [11]. Полученные данные показали, что воздействие 3-МКПД способствует накоплению аутофагосом в клетках HepG2. 3-MCPD может индуцировать блокировку аутофагического потока в клетках HepG2. Возможный механизм был обусловлен разрушением лизосомальной функции.

A. M. Abdel-Aty и др. проведено исследование методами биотехнологии цитотоксической активности БАД из латексных экстрактов растений *Ficus carica* (FCE), *Ficus sycomorus* (FSE) и *Euphorbia tirucalli* (ETE) [12]. Доказано, что БАД из латексных экстрактов ETE, FCE и FSE оказала мощное цитотоксическое действие совместно с доксорубицином, распространенным противоопухолевым препаратом, против острых миелоидных лейкозов HL-60, линий раковых клеток молочной железы MCF-7 и печени HepG2 соответственно. Кроме того, все тестируемые экстракты не оказывали токсического воздействия на нормальные меланоциты человеческой клеточной линии HFB4 в концентрациях до 100 мкг/мл.

В работе [13] изучалась противоопухолевая эффективность БАД из трех тритерпеноидов, полученных из этилацетатного экстракта *Cassia fistula* L., против линии клеток рака толстой кишки человека (HT-29). Тритерпеноиды оказались нетоксичными для нормальных клеток VERO, но цитотоксичными для раковых клеток. Анализ RT-ПЦР показал, что тритерпеноиды продуцировали повышенную регуляцию экспрессии p53 и пониженную экспрессию ERK2. Скорость инвазии и метастазирования значительно снижалась при их воздействии. Кроме того, антиоксидантная активность проявлялась в разрушении раковых клеток. Результаты исследований показали стабильные взаимодействия между тритерпеноидами и мишенями рака (p53 и ERK2). Полученные данные свидетельствуют о том, что тритерпеноиды проявляют высокий антипролиферативный эффект в клетках HT-29 и перспективны в качестве альтернативной терапии онкологических заболеваний.

В результате исследований M. M. Farid и др. разработана БАД из растительного экстракта *Kermia aegyptiaca* [14]. Полученная БАД была исследована методами биотехнологии против двух линий опухолевых клеток человека: молочной железы (MCF-7) и толстой кишки (HCT-116). Установлен высокий процент цитотоксичности БАД при концентрации 100 мкг/мл с 91,1 и 37,9 против MCF-7 и HCT-116 соответственно.

Авторами [15] разработана БАД из гриба *Aspergillus oryzae* и доказана ее активность *in vitro* в отношении выбранной клеточной линии рака легких.

В работе A. Juan-García с соавторами доказано цитопротекторное действие БАД из экстракта чеснока *Allium sativum* L. на клетки гепатокарциномы HepG2. БАД оценивали против боверицина (BEA) и двух зеараленонов [16]. Метаболиты (α-зеараленол (α-ZEL) и β-зеараленол (β-ZEL)) индуцировали цитотоксичность на клетках HepG2 методом MTT (3-4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид) в течение 24 и 48 ч. При обработке клеток HepG2 БАД их жизнеспособность клеток была выше на 40–50 %.

Доказано, что БАД на основе рофлумиласта усиливает цитотоксические и апоптотические эффекты в клеточной линии PC3 [17].

Результаты исследований M. S. Rahaman и др. с помощью Вестерн-блот-анализа показали, что предварительная обработка куркумином и D-пинитом и их комбинированная обработка мышьяком ингибировали индуцированную мышьяком гибель клеток путем активации белков про-выживания,

хотя экспрессия этих белков отрицательно регулировалась мышьяком [18]. Кроме того, эффект комбинированного лечения куркумином и D-пинитом был сильнее, чем при индивидуальном лечении.

Эпидемиологические данные способствуют включению БАД на основе флавонов в рацион питания из-за их ингибирующего действия на некоторые виды рака, особенно у женщин. Среди природных растительных флавоноидов апигенин 7-O-глюкозид (AGL) обладает противовоспалительной, антиоксидантной и противораковой активностью. Однако механизм его действия на рак шейки матки, четвертый по величине рак у женщин, до сих пор не выяснен. M.-M. Liu и др. установили влияние AGL на клетки рака шейки матки человека и изучили его молекулярный механизм против рака шейки матки [19]. Результаты показали, что AGL ингибирует пролиферацию клеток HeLa (IC_{50} составлял 47,26 мкм через 48 ч), индуцируя апоптоз. В то же время в клетках HeLa, обработанных AGL, путь PTEN/PI3K/AKT ингибировался концентрационно-зависимым образом. Миграция клеток также была затруднена через матриксную металлопротеиназу 2 и 9 соответственно.

Следует отметить, что БАД, имеющие в своем составе пептиды, иммуномодулирующего действия оказывают влияние не только на иммуноциты, опухолевые клетки, но и на все клетки организма. Поэтому целью исследования стала разработка БАД из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров и оценка ее влияния на жизнеспособность клеток в культуре.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являются биологически активная добавка, полученная ферментативным гидролизом фабрициевой сумки, а также клетки.

Эксперименты проводили на нескольких типах клеточных культур:

– на культуре незрелых стволовых клеток;
– на культуре зрелых дифференцированных клеток – дермальные фибробласты человека;
– на культуре опухолевых клеток линий HeLa и MCF-7.

Данные группы клеток отличаются по степени зрелости, возможности дифференцировки, функциональным способностям, пролиферативной активности и чуствительности к внешним факторам.

Культура мезенхимальных клеток (МСК) выделена из берцовой кости крысы. МСК представляют собой нормальные фибробластоподобные веретеновидные клетки, характеризующиеся высокой пластичностью и способностью дифференцироваться в другие типы клеток (рис. 3). Выделение мезенхимальных клеток проводили с отделением эпифизов берцовой кости в стерильных условиях и последующим вымыванием костного мозга из костномозгового канала. Полученные клетки осаждали путем центрифугирования и культивировали в пластиковых флаконах на питательной среде.

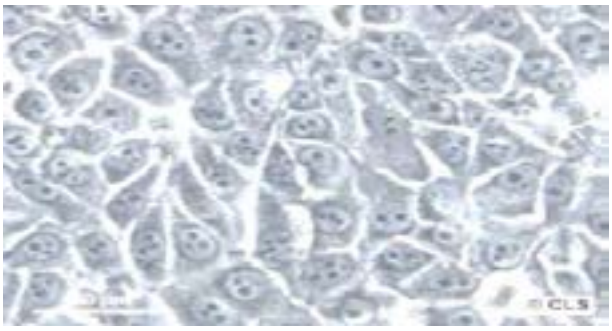

Рисунок 3. Клеточная культура мезенхимальных стволовых клеток крысы (окраска по Романовскому-Гимзе; ув. ×400)

Figure 3. Cell culture of rat mesenchymal stem cells (Romanovsky-Giemsa stain; magnification ×400)

Культура фибробластов человека получена из материала биопсии кожи в Институте медицинских клеточных технологий (Екатеринбург, Россия). Фибробласты представляют собой нормальные клетки соединительной ткани (рис. 4). Данный тип клеток удобен для проведения исследования, поскольку при длительном пассировании сохраняется кариотип клеток и их нормальные свойства. Это позволяет видеть точные и неискаженные результаты. Выделение фибробластов проводили из биопатов кожи путем ферментативной обработки и последующего инкубирования в питательной среде с соблюдением всех необходимых условий (температура, состав газа).

Клеточная культура карциномы шейки матки человека HeLa получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург (рис. 5). Это культура опухолевых

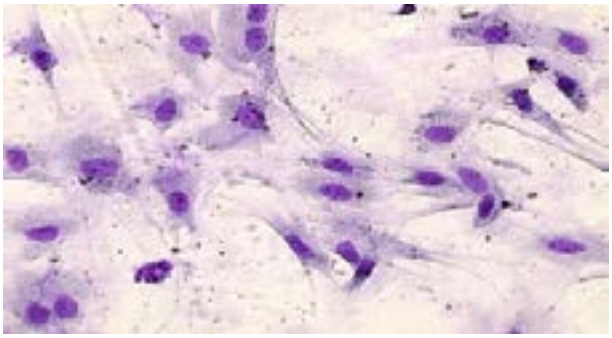

Рисунок 4. Культура дермальных фибробластов человека (окраска по Романовскому-Гимзе, ув. ×400)

Figure 4. Human dermal fibroblasts cells (Romanovsky-Giemsa stain, magnification ×400)

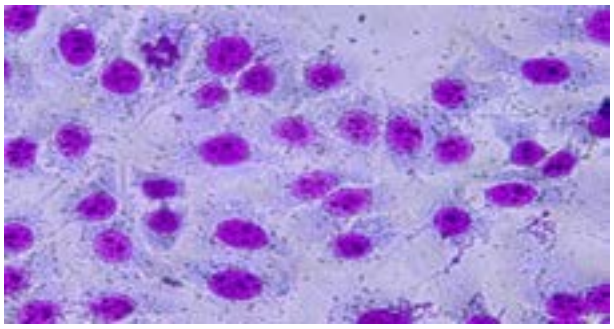

Рисунок 5. Культура карциномы шейки матки человека HeLa (окраска по Романовскому-Гимзе; ув. ×400)

Figure 5. Human cervical carcinoma cells of HeLa line (Romanovsky-Giemsa stain; magnification ×400)

клеток, способная неопределенно долго расти *in vitro* за счет наличия фермента теломеразы. Использование препарата на данном типе клеток позволяет определить его цитостатический эффект.

Клеточная культура аденокарциномы молочной железы MCF-7 также получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН [6]. Простота использования клеточных линий позволяет проводить доклинические исследования лекарственных средств с целью расширения фундаментальных знаний о природе опухолевых клеток.

Все подготовительные этапы работы, связанные с инкубированием клеток и приготовлением растворов, проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 LORICA. Культивировали клетки в питательной среде DMEM (Биоолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина в дозе 50 мкг/мл до образования монослоя. Культивирование проводили в CO_2 инкубаторе Sanoy (Panasonic) MCO-18AC при температуре 37 °C в атмосфере с 5 % CO_2.

Микроскопический контроль среды проводили с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon). В зависимости от достижения клетками монослоя меняли культуральную среду каждые 3 дня.

Пересев клеточной культуры проводили один раз в 3–4 дня путем дезагагригирования клеточного монослоя с использованием трипсина.

Исследование разработанной БАД проводили на культурах клеток в следующих концентрациях 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 25, 40 и 50 %. Каждую концентрацию вносили в культуру клеток в количестве 6-ти повторений. Минимальное количество БАД, которое можно внести в культуру, – 1 мкл. БАД в данном количестве вносили на 100 мкл, что позволило получить концентрацию равную 0,5 %. При разведении в 5 раз концентрация равна 10 %. Также БАД вносили в количестве 1 мкл на 100 мкл для получения концентрации 0,1 %. Разведение в 10 раз с аналогичным внесением в лунки дало концентрацию 0,05 %.

Исследования влияния БАД начинали с подготовки клеточных культур. Для этого клетки переводили из монослоя в суспензию. Подготовленную суспензию клеток в 10 мл питательной среды помещали в 96-луночные планшеты в количестве 100 мкл суспензии на одну лунку. Культивирование проводилось в течение 24-х ч. После чего в лунки добавляли исследуемый препарат в разных объемах. Через 48 ч после введения препарата проводилась оценка жизнеспособности клеток в клеточной культуре. Полученные данные сопоставляли с контролем и анализировали статистическим способом. Для оценки жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. В каждую лунку планшета, в котором предварительно были культивированы клетки и внесен препарат, добавляли МТТ-краситель (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5- дифенил–тетразолиум бромид) по 20 мкл. Затем планшет ставили в термостат на 2 ч. МТТ-краситель под действием живых клеток превращается в пурпурно-синие клеточные кристаллы МТТ-формазана, количество которого эквивалентно количеству живых клеток. После инкубации культуральную среду и краситель осторожно сливали и в каждую лунку вносили по 100 мкл DMSO для растворения образовавшихся кристаллов формазана. После 5–7 мин детектировали фиолетовое окрашивание с помощью спектрофотометрического сканера Tecan Infinite M200 PRO при длине волны 570 нм.

На основе полученных данных определяли индекс цитотоксичности для каждой концентрации испытуемого экстракта. Затем определяли индекс пролиферации для каждой концентрации исследуемого экстракта.

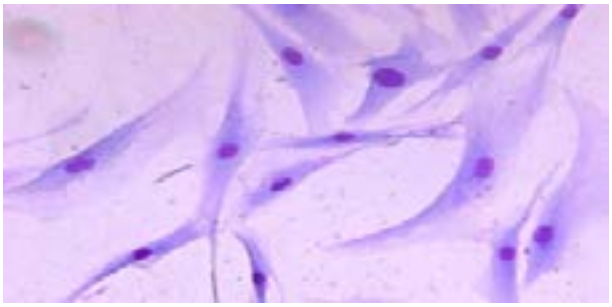

Рисунок 6. Культура аденокарциномы молочной железы MCF-7 (окраска по Романовскому-Гимзе; ув. ×400)

Figure 6. MCF-7 breast adenocarcinoma cells (Romanovsky-Giemsa stain; magnification ×400)

Степень гидролиза белка определяли по разнице между общем и аминым азотом. Аминный азот – по ГОСТ Р 55479-2013; общий азот и белок – методом Кьельдаля. Анализ молекулярно-массового распределения белково-пептидных фракций в составе биологически активной добавки проводили методом эксклюзионной жидкостной хроматографии среднего давления на ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II.

Статистическую обработку результатов проводили, используя компьютерную программу «Microsoft Excel». Вычисляли среднее и стандартное отклонение. Результаты экспериментов представлены в виде диаграммы как среднее значение ± ошибка среднего.

Для оценки значимости различий между группой контроля и группой с использованием экстракта применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки $P \leq 0{,}05$ различия между средними значениями считались достоверными.

Результаты и их обсуждение

Разработана технология производства БАД из лимфоидной ткани птицы (фабрициевая сумка цыплят-бройлеров), состоящая из промывки проточной водой сырья, куттерования, гомогенизации, ферментирования, ультрафильтрации и упаковки.

Целесообразно рассмотреть более подробно технологию БАД. Для производства БАД отбирают фабрициевую сумку после убоя цыплят-бройлеров в возрасте 35 дней. Затем сырье помещают в емкость и промывают проточной водой в течение 10 мин при температуре воды 16–18 °С.

Следующим этапом производства БАД является куттерование сырья в течение 3 мин при частоте вращения ножей 2400 об/мин с последующей гомогенизацией. Сырье загружают в емкость гомогенизатора, оборудованного рубашкой, наполненной дистиллированной водой и имеющей встроенный нагревательный элемент, гомогенизируют при скорости вращения насадки L5M компании Сильверсон (MB) 6000 об/мин при температуре 4 °С.

Указанную температуру задавали с помощью насоса и компрессора холодильной установки, имеющихся в гомогенизаторе. Затем полученную массу нагревали до температуры оптимума активности фермента папаина (40 °С), вносили фермент Papain (КФ 3.4.22.2), растворенный в фосфатно-буферном растворе с pH 6,0 из расчета 0,15 % к основному сырью (фабрициева сумка), и выдерживали в течение 8 ч. Оценку степени гидролиза белка проводили по аминному азоту. В таблице 1 представлена зависимость степени гидролиза белка фабрициевой сумки от времени ферментации.

Установлено, что гидролиз белка происходит в первые часы ферментации сырья папаином. Через 4 ч ферментации степень гидролиза составила 27,4 %, через 8 ч – 31,3 %. Следовательно, целесообразно ферментировать фабрициеву сумку в течение 4 ч.

Таблица 1. Зависимость степени гидролиза белка фабрициевой сумки от времени ферментации

Table 1. Effect of fermentation time on the protein hydrolysis degree of the bursa of Fabricius

Время гидролиза, ч	Степень гидролиза белка, %
0	0
1	11,3
2	16,5
3	19,8
4	27,4
5	29,1
6	30,2
7	30,7
8	31,3

Затем ферментированное сырье пропускали через ультрафильтрационную лабораторную установку.

Все металлические детали установки, контактирующие с сырьем, выполнены из нержавеющей стали 12Х18Н10Т. Основным рабочим элементом установки является ультрафильтрационная ячейка, которая представляет собой цилиндр длиной 900 мм с керамическими мембранами КУФЭ длиной 800 мм с размером пор 10 кДа, изготовленные из диоксида титана анатазной модификации с напыленным селективным слоем α-оксида алюминия.

Ультрафильтрацию сырья проводили при следующих технологических параметрах: $u \geq 1{,}5$ м/с; P = 0,3 МПа; t = 20 ± 5 °С.

По внешнему виду полученная БАД из фабрициевой сумки представляет собой непрозрачную

Рисунок 7. Образцы полученной БАД из фабрициевой сумки

Figure 7. Samples of the dietary supplement obtained from the bursa of Fabricius of broiler chickens

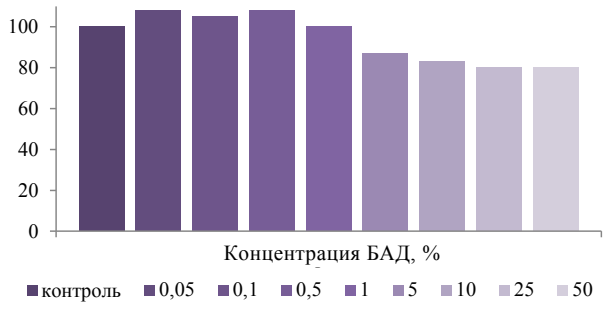

Рисунок 8. Влияние БАД на жизнеспособность культуры мезенхимальных стволовых клеток

Figure 8. Effect of the dietary supplement on the viability of mesenchymal stem cells

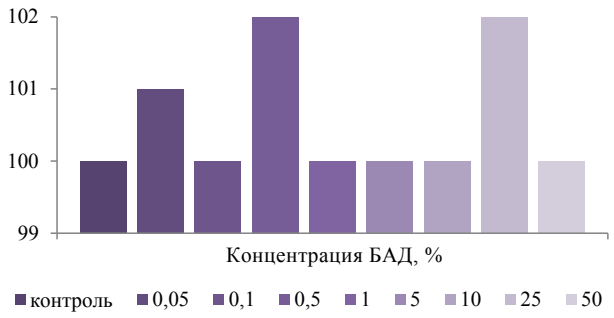

Рисунок 9. Влияние БАД на жизнеспособность культуры фибробластов человека

Figure 9. Effect of the dietary supplement on the viability of human fibroblast cells

водную суспензию кремового цвета со слабым специфическим запахом (рис. 7).

При исследовании химического состава полученной БАД установлено, что содержание белка в ней было на уровне 18,3 % при наибольшем количестве белков (74,5 %) с молекулярной массой менее 4 кДа.

Таким образом, разработана технология БАД из фабрициевой сумки, включающая промывку фабрициевой сумки цыплят-бройлеров проточной водой, куттерование, гомогенизацию, ферментирование и ультрафильтрацию.

Проведена оценка влияния разработанной БАД на жизнеспособность стволовых клеток.

При внесении БАД в культуру мезенхимальных стволовых клеток наблюдается незначительное снижение жизнеспособности клеток при концентрации препарата в 25 и 50 %. Это свидетельствует о возможном цитотоксическом влиянии экстракта на мезенхимальные клетки, поскольку понижение жизнеспособности, по сравнению с контролем, составило 20 % (рис. 8).

Установлено, что для концентрации препарата в 25 % индекс цитотоксичности равен 20,30 ± 2,49 %, а для концентрации в 50 % индекс цитотоксичности составил 19,40 ± 2,45 %. Между влиянием эффективных концентраций достоверных различий не обнаружено.

При внесении БАД в культуру фибробластов человека не наблюдается достоверного изменения жизнеспособности клеток. Это свидетельствует об отсутствии цитотоксического влияния, а также об отсутствии повышения жизнеспособности клеточной культуры (рис. 9).

При внесении иммуномодулирующего препарата БАД в культуру HeLa наблюдается увеличение жизнеспособность клеток при концентрации препарата в 20, 10 и 5 %. В сравнении с контролем жизнеспособность клеток повысилась на 48 % при концентрации препарата в 20 % и на 44 % при концентрациях 10 и 5 % соответственно. Однако при концентрациях в 40 и 1 % нет достоверности отличий от контроля (рис. 10).

Поскольку БАД стимулирует пролиферацию опухолевых клеток, то для концентраций с эффективным действием на культуру посчитан индекс пролиферации по приведенной в методике формуле. Для концентрации в 5 % индекс пролиферации равен 45,50 ± 9,24 %; для концентрации 10 % он равен 45,94 ± 9,11 % и для концентрации 25 % индекс пролиферации составил 49,24 ± 5,58 %. Достоверных различий между эффективными концентрациями (5, 10 и 25 % не выявлено).

Таким образом, иммуномодулирующая БАД усиливает пролиферативную активность исследуемых линий клеточных культур и увеличивает их жизнеспособность. Такой эффект может быть связан с высоким содержанием белков в препарате. Для исследуемых культур клеток БАД служила ростовым фактором или митогеном, стимулирующим клетки

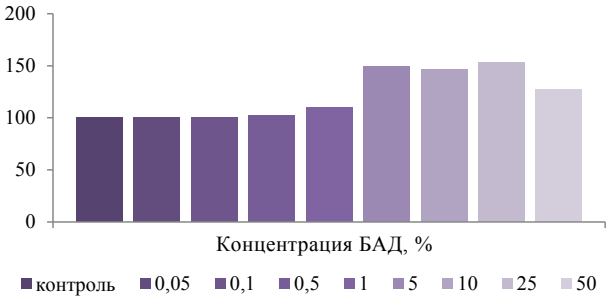

Рисунок 10. Воздействие БАД на жизнеспособность культуры клеток HeLa

Figure 10. Effect of the dietary supplement on the viability of HeLa cells

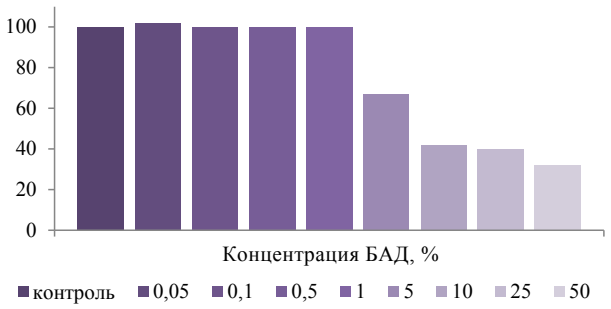

Рисунок 11. Воздействие БАД на жизнеспособность культуры клеток MCF

Figure 11. Effect of the dietary supplement on the viability of MCF cells

к делению. Пептиды препарата взаимодействуют со специфическими рецепторами мембраны клетки, инициируя клеточные сигнальные пути, приводящие к делению. Одной из причин митотического деления клеток могло стать включение MAP-киназного каскада в ответ на внеклеточный стимул. Активированная MAP-киназная система регулирует процессы митоза, дифференцировки и выживания клеток. Определенные группы MAP-киназ регулируются экзогенными сигналами (белками), что позволяет говорить о достоверности данного предположения.

При внесении БАД в культуру MCF-7 выявлено дозозависимое цитотоксичное влияние экстракта на культуру, что приводит к уменьшению относительной жизнеспособности (рис. 11).

Для концентрации 10 % индекс цитотоксичности равен 57,02 ± 3,95 %; для концентрации в 25 % это значение равно 59,95 ± 4,94 %; для концентрации в 50 % индекс цитотоксичности равен 69,74 ± 2,0 %. Для концентраций, оказывающих выраженный цитотоксический эффект, выявлены достоверные различия между концентрациями 10 и 40 %. Это указывает на дозозависимое влияние БАД.

Таким образом, исследуемая БАД проявила цитотоксическое действие на культуру клеток MCF-7. Поскольку пептиды БАД обладают физиологической активностью, то воздействие на опухолевые клетки индуцировалось ферментами апоптоза, что вызывает гибель клеток MCF. Рецепторы опухолевых клеток передают внеклеточный сигнал, что приводит к запуску протеолиза. Механизм апоптоза индуцируется комплексом белков, совместное действие которых ведет к множеству внутриклеточных изменений, приводящих к гибели клетки, что отмечается в наших исследованиях.

БАД проявила цитотоксические свойства и в отношении культуры клеток аденокарциномы молочной железы, и в отношении культуры мезенхимальных стволовых клеток. Сравнение показателей цитотоксичности позволяет сделать вывод о том, что наиболее выраженный цитотоксический эффект проявляется в отношении клеток MCF-7. Он заключается в уменьшении количества опухолевых клеток, что согласуется с исследованиям [13]. В нем установлено, что вещества иммуномодулирующего действия влияют не только на клетки иммунной системы, но и на непосредственно злокачественные клетки либо опосредованно через незлокачественные клетки, поддерживающие опухолевое образование.

Выводы

Разработана технология БАД из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров, включающая промывку сырья проточной водой, куттерование, гомогенизацию, ферментирование протеолитическим ферментом и ультрафильтрацию. Проанализировано влияние БАД на жизнеспособность и пролиферативную активность культуры стволовых клеток. БАД оказывает цитотоксический эффект на данный тип клеточной культуры. Изучено влияние БАД на жизнеспособность и пролиферативную активность культуры дифференцированных соматических клеток. Экстракт не оказывает выраженного влияния на жизнеспособность и не проявляет цитотоксического действия по отношению к дермальным фибробластам человека. Исследовано влияние БАД на жизнеспособность и пролиферативную активность опухолевых клеток. Действие БАД оказалось различным в отношении культур клеток. В случае с HeLa БАД стимулирует пролиферативную активность, а в случае с MCF-7 оказывает цитотоксический эффект.

Следовательно, БАД-ферментативный гидролизат фабрициевой сумки цыплят-бройлеров имеет перспективы использования в качестве действующего начала в составе различных биологически активных добавок к пище или отдельно в качестве специализированного пищевого продукта иммуномодулирующего действия, в частности БАД функциональной направленности.

Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследованиях и оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All the authors contributed equally involved in the research and design of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. International society of sports nutrition position stand: Nutrient timing / C. M. Kerksick [et al.] // Journal of the International Society of Sports Nutrition. 2017. Vol. 14. № 1. https://doi.org/10.1186/s12970-017-0189-4.

2. Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products / S. A. Banihashemi [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798.

3. Revalorization of chicken feather waste into a high antioxidant activity feather protein hydrolysate using a novel psychrotolerant bacterium / B. Bezus [et al.] // Biocatalysis and Agricultural. 2021. Vol. 32. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101925.

4. Федулова Л. В., Кашинова Э. Б. Исследование *in vitro* биологически активных веществ животного происхождения // Все о мясе. 2016. № 4. С. 30–33.

5. Anti-proliferative and apoptotic effects of by-product (skin extract) from marine catfish *Tachysurus dussumieri* / K. Raja [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101816.

6. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste / I. Joshi [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101770.

7. Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides / F. Rivero-Pino [et al.] // Food and Bioproducts Processing. 2020. Vol. 123. P. 217–224. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.003.

8. Использование моноклональных антител для терапии аутоиммунных заболеваний / Е. М. Мерзляк [и др.] // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2018. № 6. С. 164–169. https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.094.

9. Taroncher M., Rodriguez-Carrasco Y., Ruiz M.-J. T-2 toxin and its metabolites: Characterization, cytotoxic mechanisms and adaptive cellular response in human hepatocarcinoma (HepG2) cells // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 145. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111654.

10. Shafiei Kaleybar L., Khoshfetrat A. B., Nozad Charoudeh H. Modeling and performance prediction of a conceptual bioprocess for mass production of suspended stem cells // Food and Bioproducts Processing. 2020. Vol. 122. P. 254–268. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.012.

11. 3-Chloro-1, 2-propanediol inhibits autophagic flux by impairment of lysosomal function in HepG2 cells / J. Lu [et al.] // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 144. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111575.

12. Ficus carica, Ficus sycomorus and Euphorbia tirucalli latex extracts: Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic properties / A. M. Abdel-Aty [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019. Vol. 20. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101199.

13. Triterpenoids from *Cassia fistula* L. regulate p53 & ERK2 genes to induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells / R. M. Kumar [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019. Vol. 21. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101286.

14. Isoscutellarein 8, 4′-Dimethyl ether glycosides as cytotoxic agents and chemotaxonomic markers in *Kickxia aegyptiaca* / M. M. Farid [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019. Vol. 22. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101431.

15. Mycosynthesis of anticancer drug taxol by *Aspergillus oryzae*, an endophyte of *Tarenna asiatica*, characterization, and its activity against a human lung cancer cell line / G. Suresh [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 24. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101525.

16. Cytoprotection assessment against mycotoxins on HepG2 cells by extracts from *Allium sativum* L / A. Juan-García [et al.] // Food and Chemical Toxicology. 2021. Vol. 151. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112129.

17. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF-κB-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling / B. A. Abdel-Wahab [et al.] // Food and Chemical Toxicology. 2021. Vol. 151. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112133.

18. Effects of curcumin, D-pinitol alone or in combination in cytotoxicity induced by arsenic in PC12 cells / M. S. Rahaman [et al.] // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 144. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111577.

19. Apigenin 7-O-glucoside promotes cell apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway and inhibits cell migration in cervical cancer HeLa cells / M.-M. Liu [et al.] // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 146. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111843.

20. Кушлинский Н. Е., Немцова М. В. Молекулярные механизмы опухолевого роста // Медицинские новости. 2014. № 9. С. 29–37.

References

1. Kerksick CM, Arent S, Schoenfeld BJ, Stout JR, Campbell B, Wilborn CD, et al. International society of sports nutrition position stand: Nutrient timing. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 2017;14(1). https://doi.org/10.1186/s12970-017-0189-4.

2. Banihashemi SA, Nikoo M, Ghasempour Z, Ehsani A. Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020;29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798.

3. Bezus B, Ruscasso F, Garmendia G, Vero S, Cavello I, Cavalitto S. Revalorization of chicken feather waste into a high antioxidant activity feather protein hydrolysate using a novel psychrotolerant bacterium. Biocatalysis and Agricultural. 2021;32. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101925.

4. Fedulova LV, Kashinova EB. *In vitro* study of the biologically active substances of animal origin. Vsyo o Myase. 2016;(4):30–33. (In Russ.).

5. Raja K, Martin LC, Bose L, Sahayanathan GJ, Padmanaban D, Chinnasamy A. Anti-proliferative and apoptotic effects of by-product (skin extract) from marine catfish *Tachysurus dussumieri*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020;29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101816.

6. Joshi I, Janagaraj K, Noorani KPM, Nazeer RA. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020;29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101770.

7. Rivero-Pino F, Espejo-Carpio FJ, Perez-Galvez R, Guadix A, Guadix EM. Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. Food and Bioproducts Processing. 2020;123:217–224. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.003.

8. Merzlyak EM, Syrko DS, Musatkina EA, Israelson MA. The use of monoclonal antibodies in autoimmunity treatment. Bulletin of Russian State Medical University. 2018;(6):164–169. (In Russ.). https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.094.

9. Taroncher M, Rodriguez-Carrasco Y, Ruiz M-J. T-2 toxin and its metabolites: Characterization, cytotoxic mechanisms and adaptive cellular response in human hepatocarcinoma (HepG2) cells. Food and Chemical Toxicology. 2020;145. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111654.

10. Shafiei Kaleybar L, Khoshfetrat AB, Nozad Charoudeh H. Modeling and performance prediction of a conceptual bioprocess for mass production of suspended stem cells. Food and Bioproducts Processing. 2020;122:254–268. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.012.

11. Lu J, Lu J, Chen Y, Feng Z, Liu S, Guan S. 3-Chloro-1, 2-propanediol inhibits autophagic flux by impairment of lysosomal function in HepG2 cells. Food and Chemical Toxicology. 2020;144. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111575.

12. Abdel-Aty AM, Hamed MB, Salama WH, Ali MM, Fahmy AS, Mohamed SA. Ficus carica, Ficus sycomorus and Euphorbia tirucalli latex extracts: Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic properties. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019;20. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101199.

13. Kumar RM, Jeyapriyadharshini S, Roy AA, Antony L, Indu S, Manikkam R. Triterpenoids from *Cassia fistula* L. regulate p53 & ERK2 genes to induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019;21. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101286.

14. Farid MM, Marzouk MM, El-Shabrawy M, Salem MA, Mounier MM, Hussein SR. Isoscutellarein 8, 4′-Dimethyl ether glycosides as cytotoxic agents and chemotaxonomic markers in *Kickxia aegyptiaca*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019;22. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101431.

15. Suresh G, Kokila D, Suresh TC, Kumaran S, Velmurugan P, Vedhanayakisri KA, et al. Mycosynthesis of anticancer drug taxol by *Aspergillus oryzae*, an endophyte of *Tarenna asiatica*, characterization, and its activity against a human lung cancer cell line. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020;24. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101525.

16. Juan-García A, Agahi F, Drakonaki M, Tedeschi P, Font G, Juan C. Cytoprotection assessment against mycotoxins on HepG2 cells by extracts from *Allium sativum* L. Food and Chemical Toxicology. 2021;151. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112129.

17. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF-κB-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling. Food and Chemical Toxicology. 2021;151. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112133.

18. Rahaman MS, Yamasaki S, Binte Hossain KF, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M. Effects of curcumin, D-pinitol alone or in combination in cytotoxicity induced by arsenic in PC12 cells. Food and Chemical Toxicology. 2020;144. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111577.

19. Liu M-M, Ma R-H, Ni Z-J, Thakur K, Cespedes-Acuna C, Jiang L, et al. Apigenin 7-O-glucoside promotes cell apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway and inhibits cell migration in cervical cancer HeLa cells. Food and Chemical Toxicology. 2020;146. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111843.

20. Kushlinsky NE, Nemtsova MV. Molecular mechanisms of tumor growth. Meditsinskie novosti, 2014;(9):29–37. (In Russ.).