

**Противоопухолевая эффективность препарата Biocrush® (Биокраш)
от института IGV, Германия**



ANALYTIK / QUALITÄTSMANAGEMENT
BACKWAREN
BIOTECHNOLOGIE / UMWELT
NACHWACHSENDE ROHSTOFFE / LEBENSMITTELTECHNOLOGIE
TECHNOLOGIETRANSFER

**Проверка противоопухолевой эффективности препарата *Biocrush®*
in vitro,**

выполнено
IGV GmbH
Arthur-Scheunert-Allee 40-41
14558 Нутеталь
Германия

/подпись/

Утверждено: профессор, почетный доктор Отто Пульц

**IGV INSTITUT FÜR GETREIDEVERARBEITUNG
GMBH**

Arthur-Scheuvert-Allee 40/41
14558 Nuthetal OT Bergholz-Rehbrücke

Нутеталь, 1 марта 2007 года

IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Geschäftsführer: Peter Kretschmer
Arthur-Scheunen-Allee 40/41, 14558 Nuthetal OT Bergholz-Rehbrücke
Tel.: 033200 89.0, Fax: 033200 89-220, e-mail: igv-manage Givg-gmbh.de, www.ig-gmbh.de
Bankverbindung: Deutsche Bank AG, Konto Nr. 3000874, BLZ 120 700 00, Berliner Volksbank, Komo Ne. 8271111003, BLZ 100 900 00
eingetragen beim Amtsgericht Potsdam HRB-Nr. 7611, USt-INr. DE 171022945, Vorsitzender des Aufsichtsrates: Ralf Andrä



DEUTSCHES
AKKREDITIERUNGSSYSTEM
PRÜFWESSEN GMBH
DAP-PL-2268.00

DAP

Для определения цитотоксичности **Biocrush®** на раковых клетках использовался тест МТТ. Это колориметрический тест, который основан на восстановлении желтой соли тетразолия 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий-бромид (МТТ) до фиолетовых кристаллов формазана под действием клеточной дегидрогеназы. Поскольку дегидрогеназа активна только в живых клетках, преобразование МТТ является показателем степени жизнеспособности и метаболической активности клеток (Mosmann et al. 1983). Поглощение образовавшегося формазана определяется фотометрически при длине волны - 550 нм и эталонном фильтре - 690 нм.

Четыре клеточные линии (табл. 1) были получены в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Брауншвейг, Германия). Все опухолевые клетки развивались в виде монослоя и культивировались в колбах для клеточных культур Т 25 при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе.

Таблица 1. Обзор протестированных клеточных линий

клеточная линия	происхождение	рост	источник	среда
HELA-83	карцинома шейки матки человека	примыкающий	ATCC-161	Hams F12+10%FCS
EN	карцинома эндометрия человека	примыкающий	ATCC-564	DMEM+20%FCS
EFO-27	аденокарцинома яичников человека	примыкающий	ATCC-191	RPMI 1640+20%FCS+MEM+пуриват
EFM-192A	карцинома молочной железы человека	примыкающий	ATCC-258	RPMI 1640+20%FCS+L-глутамин

EFO-27 и EFM-192A культивировали в среде RPMI 1640, HELA-S3 - в Hams F12, а EN - в DMEM-среде. Во все среды добавляли соответственно 10-20% FCS, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл L-глутамин.

Половину соответствующей среды (таблица 1) меняли каждые 2-3 дня на свежую среду. Перенос клеток проводили незадолго до достижения конfluence (80%-90%), а затем клетки делили еженедельно в соответствии со скоростью их роста 2-3 x в соотношении 1:5 - 1:10. Таким образом, клетки дважды промывали PBS, а затем ферментативно отслаивали с помощью 2,5 мл трипсина/EDTA от поверхности роста. Отслаивание контролировалось с помощью микроскопии. Трипсинизация была инактивирована добавлением 10% FCS-содержащей среды. Клеточную суспензию разливали в стерильные 15 мл пробирки для центрифугирования и центрифугировали в течение 4 минут при 220 x g. Избыток жидкости

осторожно откачивали, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл свежей среды. После этого подсчитывали количество клеток на мл с помощью счетной камеры Neubauer. Клетки были рассеяны до требуемого количества клеток в новые колбы для клеточных культур.

Процедура

Для проверки действия **Biocrush®** 5000 клеток на лунку были распределены в 96-луночном планшете в объеме 200 мкл. Через 24 часа среда была удалена и заменена на 200 мкл свежей среды с 1 % FCS, которая дополнительно содержала тестируемое вещество.

После 72 ч инкубации к клеткам с тестируемым веществом добавляли по 20 мкл МТТ-раствора (5 мг/мл) и клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C и при 5%-CO₂ в инкубаторе. Затем клетки дезинтегрировали 100 мкл МТТ-лизирующего буфера на лунку и образовавшимся кристаллам формазана давали время раствориться в течение ночи. Затем определяли экстинкцию каждой лунки при 550-690 нм с помощью титровального планшетного фотометра.

В качестве 0-контроля использовались необработанные клетки, которые определялись как нетоксичный уровень. SDS (додецилсульфат натрия) как известное цитотоксическое эталонное вещество использовалось для сравнения в концентрациях 6,3, 12,5, 25, 50 и 100 мкг/мл. **Biocrush®** использовался соответственно в 5 различных концентрациях. Погашение необработанных клеток было установлено на 100 %, остальные значения отнесены к процентам. Показаны средние значения из n = 8 параллелей со стандартным отклонением. Уровень значимости относится к сравнению с контролем.

Результаты

Тест показал, что препарат **Biocrush®** оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Эффект зависит от концентрации и усиливается с увеличением концентрации. В концентрации от 1 до 1000 мг/мл цитотоксический эффект на различные опухолевые клетки различается.

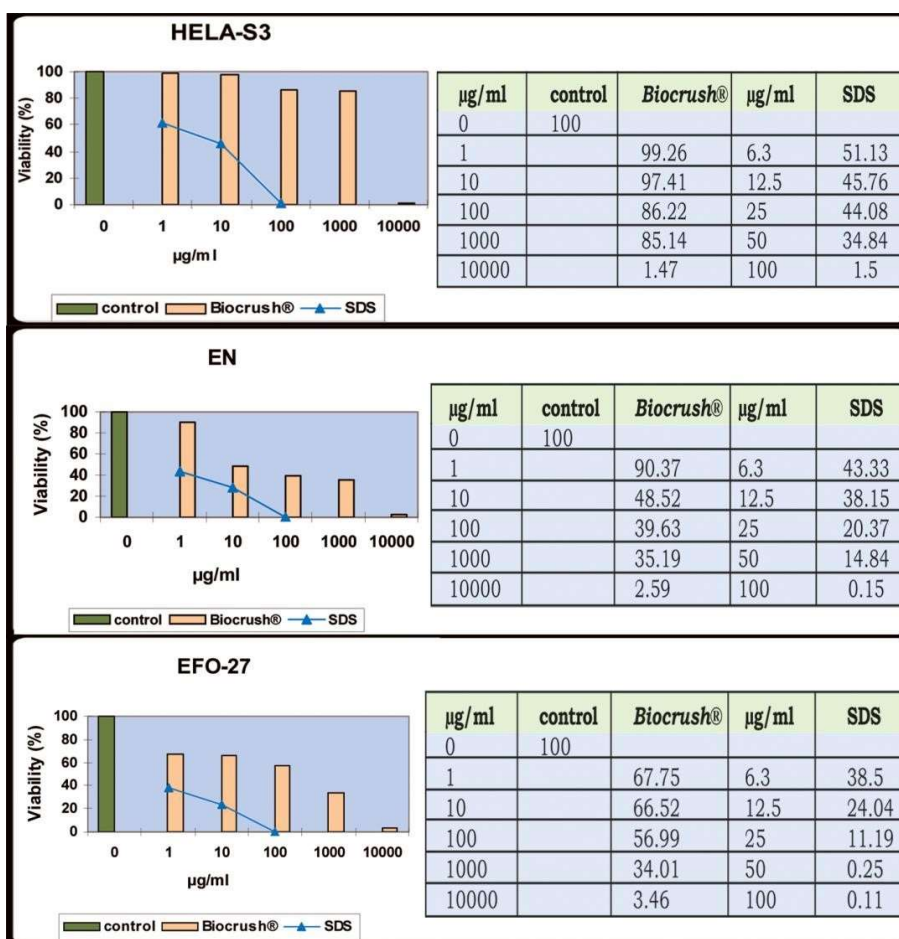
Для раковых клеток шейки матки HELA-S3 цитотоксический эффект **Biocrush®** в концентрации от 1 до 10 мг/мл был ничтожно мал. При концентрации от 100 до 10000 мг/мл максимальное ингибирование раковых клеток составило ок. 15%.

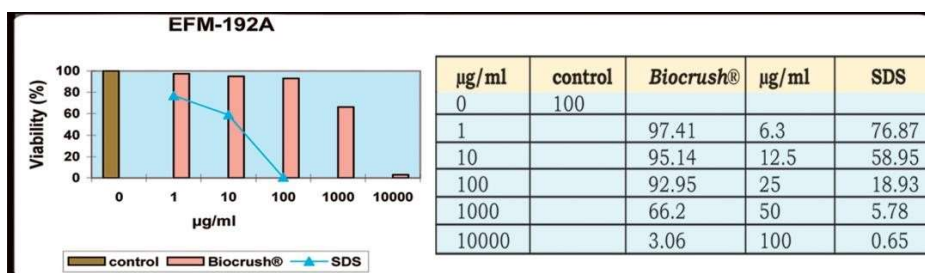
Для клеток рака молочной железы EFM-192A **Biocrush®** в концентрациях 1, 10 и 100 мг/мл также наблюдался лишь небольшой эффект, т.е. ингибирование было на уровне ок. 3, 5 и 8%. При концентрации 1000 мг/мл наблюдалось явное ингибирование раковых клеток на уровне ок. 34%.

Хороший эффект ингибирования наблюдался в случае клеток рака эндометрия EN и клеток аденокарциномы яичников EFO-27. В испытанных концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мг/мл наблюдалось ингибирование клеток EN на уровне ок. 10, 51, 60 и 65 %, а для клеток EFO-27 - ок. 33, 34, 44 и 66 %.

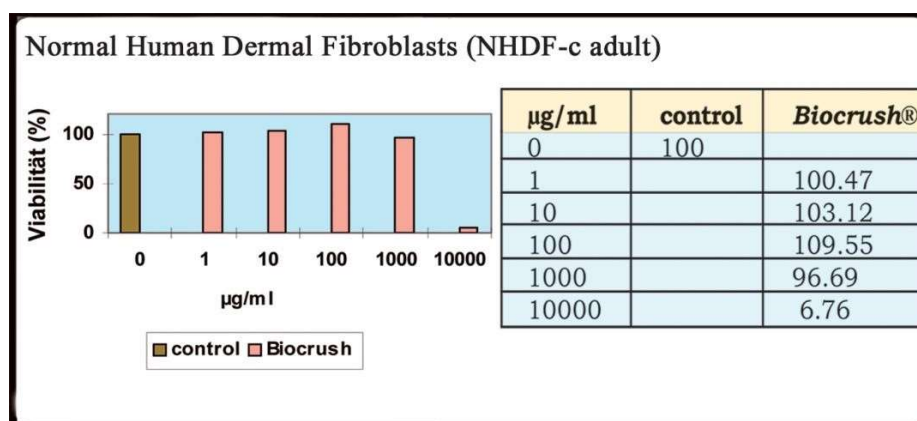
При максимальной испытанной концентрации 10000 мг **Biocrush®**/мл эффект ингибирования для всех раковых клеток составил > 95%. Для сравнения влияния **Biocrush®** на раковые клетки дополнительно были протестированы дермальные фибробласты человека NHDF-c adult. Влияние **Biocrush®** незначительно при концентрации от 1 до 1000 мг/мл, т.е. токсического воздействия на фибробласты человека не наблюдалось.

Цитотоксическое действие **Biocrush®** на четыре линии опухолевых клеток





Тестирование метаболической активности Biocrush® на фибробластах человека



DMEM : среда Игла в модификации Дульбекко

EDTA : Этилдиаминтетрауксусная кислота

FCS : Эмбриональная телячья сыворотка

MEM : Раствор аминокислот

MTT : - 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид

PBS : Фосфатно-буферный физраствор

RPMI 1640 : Средство было разработано в Мемориальном институте Розуэлл Парк

Ham's F12 : Модифицированная среда Хэма с фактором Хагемана (фактор коагуляции XII)