

7. Paxinos, G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, S. Watson. Sydney. Academic Press. 1998: 237. (in Engl).
8. Knierim JJ. The hippocampus. Curr Biol. 2015; 25(23): 1116-21. (in Engl). doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049.
9. Hudoerkov R. M. Metody komp'yuternoj morfometrii v nejromorfologii: uchebnoe posobie (bazovyy kurs) (Methods of computer morphometry in neuromorphology: a textbook (basic course)). FGBU «Nauchnyj centr nevrologii» RAMN. Moskva. 2014:53. (In Russ).
10. Zaidel D.W. Quantitative Morphology of Human Hippocampus Early Neuron Development. The Anatomical Record. 1999; 254: 87–91.(in Engl).
11. Malinovskaya N. A., Prokopenko S.V., Komleva YU.K. [et.al]. Molecules-markers of glial activation in neuroinflammation: new opportunities for pharmacotherapy of neurodegeneration. Siberian Medical Review. 2014; 5: 5-13. (In Russ).
12. Geerligs L., Renken R.J., Saliassi E.[et.al].A Brain-Wide Study of Age-Related Changes in Functional Connectivity. Cereb Cortex. 2015; 25(7):1987-99. (in Engl). doi: 10.1093/cercor/bhu012.
13. Zhabotinskii YU.M. Normal'naya i patologicheskaya morfologiya neirona (Normal and pathological morphology of the neuron). Akad. med. nauk SSSR. Leningrad: Meditsina. Leningr. otd-nie. 1965: 323. (In Russ).
14. Maksimova K.Yu., Stefanova N.A., Logvinov S.V. Morphological changes in the hippocampus of rats in accelerated aging. Bulletin of Siberian Medicine. 2014;13(1):56-61. (In Russ.) <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2014-1-56-61>
15. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. BiomedResInt. 2015;2015:549412. (in Engl). doi: 10.1155/2015/549412.

УДК 57.085.23-26

© Коллектив авторов, 2025

Т.И. Биккузин, Р.Р. Язгарова, А.В. Михайлова, Ш.Р. Рахматуллин, Д.И. Халилов

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВАЦИИ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ИЗ ПОЧКИ КРОЛИКА ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Уфа

Кубический эпителий почки является незаменимой и распространенной моделью in vitro для изучения физиологии клеток млекопитающих. Данные клетки играют ключевую роль в фильтрации крови, реабсорбции питательных веществ и выведении отходов, поэтому их поведение напрямую влияет на функции почек. Использование почечных эпителиоцитов в исследованиях позволяет изучать патологические процессы на клеточном уровне, например влияние токсинов, лекарств или генетических мутаций на функции почек.

Цель работы – получить первичную линию эпителиоцитов из почки кролика.

Материал и методы. Первичные клетки выделялись посредством диссоциации ткани в коллагеназе 1-го типа с последующим культивированием в среде, обогащенной факторами роста: человеческий инсулин, трансферрин, дексаметазон и эпидермальный фактор роста. Полученная субкультура клеток верифицировалась иммуноцитохимическим методом. В качестве тканеспецифических маркеров кубического эпителия почки были выбраны: Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase и N-cadherin, в качестве отрицательного контроля – маркер гладкомышечных клеток и фибробластов alpha-SMA. Фермент Na⁺/K⁺-АТФаза играет важную роль в фильтрации крови и выведении токсинов из почек млекопитающих. N-cadherin – белок, который участвует в образовании плотных контактов эпителиальных тканей.

Результаты. Выделенные из ткани клетки активно пролиферировали в специализированной культуральной среде и демонстрировали морфологические характеристики, свойственные для эпителиального фенотипа. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии подтвердили эпителиальное происхождение клеток. В итоге была получена первичная стабильная линия почечного эпителия почки кролика, пригодная для дальнейших экспериментальных работ in vitro.

Ключевые слова: почечный эпителий, первичная линия клеток.

T.I. Bikkuzin, R.R. Yazgarova, A.V. Mikhailova, Sh.R. Rakhmatullin, D.I. Khalilov

A METHOD FOR EPITHELIAL CELLS ISOLATION AND CULTIVATION FROM RABBIT KIDNEY

The cubic epithelium of the kidney is an indispensable and widespread in vitro model for studying the physiology of mammalian cells. These cells play a key role in blood filtration, nutrient reabsorption and waste disposal, so their behavior directly affects kidney function. The use of renal epithelial cells in research makes it possible to study pathological processes at the cellular level, for example, the effect of toxins, drugs or genetic mutations on kidney function.

The aim of our work was to obtain a primary line of epithelial cells from a rabbit kidney.

Materials and methods. Primal cells were isolated through tissue dissociation in collagenase type 1, followed by cultivation in the media enriched with growth factors: human insulin, transferrin, dexamethasone and epidermal growth factor. The obtained cell subculture was verified by the immunocytochemical method. Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase and N-cadherin were selected as tissue-specific markers of the cubic epithelium of the kidney, and alpha-SMA is a marker of smooth muscle cells and fibroblasts, was selected as a negative control. The enzyme Na⁺/K⁺-ATPase plays an important role in blood filtration and elimination of toxins in mammalian kidneys. N-cadherin is a protein that is involved in the formation of dense contacts of epithelial tissues.

Results: the isolated cells actively proliferated in a specialized culture medium and demonstrated morphological characteristics that are typical for epithelial phenotype. The results of immunofluorescence microscopy confirmed the epithelial origin of the cells. As a result, a primary stable line of the rabbit kidney epithelium was obtained, suitable for further experimental work in vitro.

Key words: renal epithelium, primary cell line.

Кубический эпителий играет ключевую роль в физиологии и патологии почек млекопитающих. Почки состоят из множества функциональных единиц, называемых нефронами, которые включают в себя несколько

типов эпителиальных клеток, каждая из которых выполняет специфические задачи в различных сегментах нефрона. В структуре почки можно выделить несколько участков, в которых присутствует эпителиальная ткань:

капсула Шумлянско-Боумена содержит подоциты и плоский эпителий, в то время как проксимальный канал, петлю Генле, дистальный канал и собирательные трубочки – выстилает однорядный кубический эпителий. Кубический эпителий участвует в процессах реабсорбции и секреции, подоциты – в процессе клубочковой фильтрации [8]. Это делает их важными объектами исследования в контексте заболеваний почек, таких как нефропатия, острый и хронический почечный недостаток, а также раковые заболевания.

Почки кроликов являются широко используемой моделью в биомедицинских исследованиях, что объясняется их анатомическим и физиологическим сходством с человеческими почками [2,13]. Изучение структуры и функции кубического эпителия почки кролика является важным шагом для разработки и оценки новых терапевтических подходов, направленных на лечение почечных заболеваний [3].

Для проведения детальных молекулярных и клеточных исследований требуется оптимизация методик выделения эпителиоцитов, обеспечивающих их высокую чистоту и жизнеспособность. Однако, несмотря на значительные успехи в этой области, выделение эпителиоцитов из почек кролика представляет собой сложную задачу, требующую учета множества факторов, таких как выбор методов ферментативного и механического воздействий на клетки, а также условий культивирования.

Существует несколько основных методов выделения клеток из живых тканей [7]:

- Метод диссоциации ткани основан на механическом и ферментативном разрушении почечной ткани с целью выделения отдельных клеток. Один из наиболее часто используемых препаратов для диссоциации ткани является коллагеназа.

- Метод эксплантов представляет собой небольшие фрагменты ткани (экспланты), которые помещаются на культуральный пластик в подходящую питательную среду. После клетки начинают мигрировать с экспланта на адгезивный пластик/стекло.

- Центрифугирование (реже отстаивание) в градиенте плотности для жидких тканей. Эта методика основана на разделении клеток по градиенту плотности. Этот метод позволяет выделить клетки крови в фиколе в растворе.

- Иммуномагнитная сепарация – метод для жидких тканей, основанный на использовании парамагнитных микросфер диаметром 40-60 нм, покрытых слоем антител против поверхностного антигена, специфичного для

клеток. В процессе сепарации маркированные клетки примагничиваются в определенной зоне и отделяются от остальных.

Сортировка клеток осуществляется точной цитометрией для жидких тканей. Этот более современный метод позволяет идентифицировать и выделять с высокой точностью и скоростью нужный фенотип клеток из смеси клеток. Минусом этого метода является его высокая стоимость [6].

Названные выше методики могут применяться как по отдельности, так и в комбинации для увеличения количества и качества полученных клеток. Каждый из этих методов имеет свои особенности, преимущества и недостатки.

В настоящей статье описан наш опыт по выделению эпителиоцитов из почек кролика. Дана оценка качеству полученного клеточного материала.

Целью данной работы является получение первичной линии эпителиоцитов, выделенных из почки кролика.

Материал и методы

Все этапы экспериментального исследования проводились на базе ФГБОУ ВО «Башкирского государственного медицинского университета» МЗ РФ (г. Уфа, Россия) в период с августа по октябрь 2024 года. Первичные линии эпителиоцитов были выделены из почек двух самцов кроликов породы шиншилла весом $3,0 \pm 0,75$ кг в возрасте 8-12 месяцев, полученных из питомника лабораторных животных ИП Тулупов А.А., в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными. Кролики содержались в индивидуальных клетках с доступом к пище и воде.

Выделенные кроличьи почки помещали на три часа в охлажденную транспортную среду, состоящую из DPBS (фосфатный-солевой буферный раствор Дульбекко без Ca^{2+} и Mg^{2+} , ПанЭко, Россия) с добавлением 0,025 мкг/мл амфотарицина В и 30 мкг/мл гентамицина (Gentamicin-Amphotericin B Solution 1000x, Himedia, Индия).

Выделение клеток почек. Механическим микропинцетом от почек кролика отделяли капсулу почки. Кортикальное и мозговое вещества были разделены скальпелем на мелкие кусочки (2-3 мм). Затем кусочки были помещены в 0,025% раствор коллагеназы (из *Clostridium histolyticum*, ПанЭко, Россия) на шейкере в течение 10 минут при 36,0 °С. После чего взвесь кусочков в растворе центрифугировали при 100x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в охлажденном

растворе Эрла (Биолот, Россия) с добавлением 0,2% бычьего альбумина (ДиаМ, Россия) и фильтровали через нейлоновую мембрану с порами 40 мкм. Неотфильтрованную тканевую массу снова помещали в 0,025% раствор коллагеназы и повторяли цикл еще два раза. Отфильтрованную через мембрану суспензию клеток центрифугировали при 100x g в течение 5 минут, удалив надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в среде, и затем высевали на культуральный пластик (Corning, Costar США), предварительно покрытый подложкой.

Первый метод культивирования первичной линии эпителиоцитов. При приготовлении подложки культуральный пластик покрывали раствором коллагена быка 1-го типа (Имтек, Россия) 1 мкг/мл и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После осаждения коллагена надосадочный раствор удаляли, добавляли бычью сыворотку (Fetal Bovine Serum, Capricorn, Германия) на 12 часов при 37°C. После пропитки коллагена сывороткой ее удаляли и помещали клетки в бессывороточную среду.

Состав бессывороточной почечной среды: DMEM/F-12 без глутамин (ПанЭко Россия), Human Recombinant Insulin (Himedia, Индия) 5 мкг/мл, Human Recombinant Transferrin (Himedia, Индия) 5 мкг/мл, Натрия Селенит (ПанЭко Россия) 5 нг/мл, 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (Sigma, США) 4 мкг/мл, Recombinant Human EGF (Gibco, США) 4 мкг/мл, Dexamethasone-Water Soluble (Sigma, США) $5 \cdot 10^{-8}$ М, пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия) 1%.

В последующем клетки культивировали в течение 2-х недель при 37,0 °C., меняли среду каждые три дня. После достижения монослоя субкультуру клеток снимали раствором 0,25% трипсином-ЭДТА (ПанЭко, Россия) и пересеивали в соотношение 1:3.

Второй метод культивирования первичной линии эпителиоцитов. Приготовление подложки: культуральный пластик покрывали раствором коллагена быка 1-го типа (Имтек, Россия) 1 мкг/мл, инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Клетки культивировали в почечной среде в течение 2-х недель.

Состав почечной среды: ДМЕМ с низким содержанием глюкозы 1 г/л (Биолот, Россия), 2% Fetal Bovine Serum (Capricorn, Германия), 1% пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия), 5 мкг/мл Human Recombinant Insulin (Himedia, Индия), 5 мкг/мл Human Recombinant Transferrin (Himedia, Индия), $5 \cdot 10^{-8}$ М Dexamethasone-Water Soluble (Sigma, США), 10

нг/мл Recombinant Human EGF (Gibco, США) и 2 mM L-glutamin (Servicebio, Китай).

Иммуноцитохимический анализ. В лунку для культивирования помещали стекла, обрабатывали дно подложкой. Сеяли клетки, дождалась их прикрепления, далее среду удаляли и трижды промывали раствором DPBS. Фиксировали клетки с помощью охлажденного 95% этанола в течение 15 минут при 4°C. Три раза промывали клетки DPBS. Далее клетки блокировали добавлением раствора DPBS с содержанием 5% бычьего альбумина (ДиаМ, Россия) и 0,3% Triton X-100 (Sigma, Китай) в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем к зафиксированным клеткам добавили первичные антитела: (ATPase (abcam, США), N-cadherin (Affinity, КНР), alpha-SMA (Affinity, КНР)) – при 4°C в течение ночи. Перед этим подготовили аликвоты: первичное антитело и Novocastra IHC Di – Luent. На следующее утро клетки трижды промыли раствором DPBS, подготовили аликвоты из вторичного антитела и добавили к клеткам, Fluor488-(Goat)-Anti-Rb IgG (Affinity, КНР), Fluor488-(Goat)-Anti-Ms IgG (Affinity, КНР) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре в темном месте. Ядра окрашивались 4'-6- диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Invitrogen, США). Клетки микроскопировали и фотографировали с помощью флуоресцентного цифрового микроскопа CELENA®X LED (США).

Результаты и обсуждение

В своем исследовании мы применили методику диссоциации ткани и состав культуральной среды, опираясь на работы M.Taub [10] и N. Sánchez-Romero, et al. [1].

Полученная культура отличалась гетерогенностью клеток. Через трое суток на культуральном пластике появились фибробластоподобные и эпителиоподобные клетки. В течение последующей недели культивация проводилась в бессывороточной среде (рис. 1. А, Б, В) и в почечной среде (рис. 1. Г, Д, Е), соотношение эпителиоподобных клеток увеличивалось по сравнению с количеством фибробластоподобных клеток. Однако визуально в почечной среде фибробластов было больше, чем в бессывороточной среде, что в последующем было подтверждено иммуноцитохимическим окрашиванием маркером Alpha-SMA (рис. 2). По истечении двух недель культивации клетки верифицировались посредством иммуноцитохимического метода.

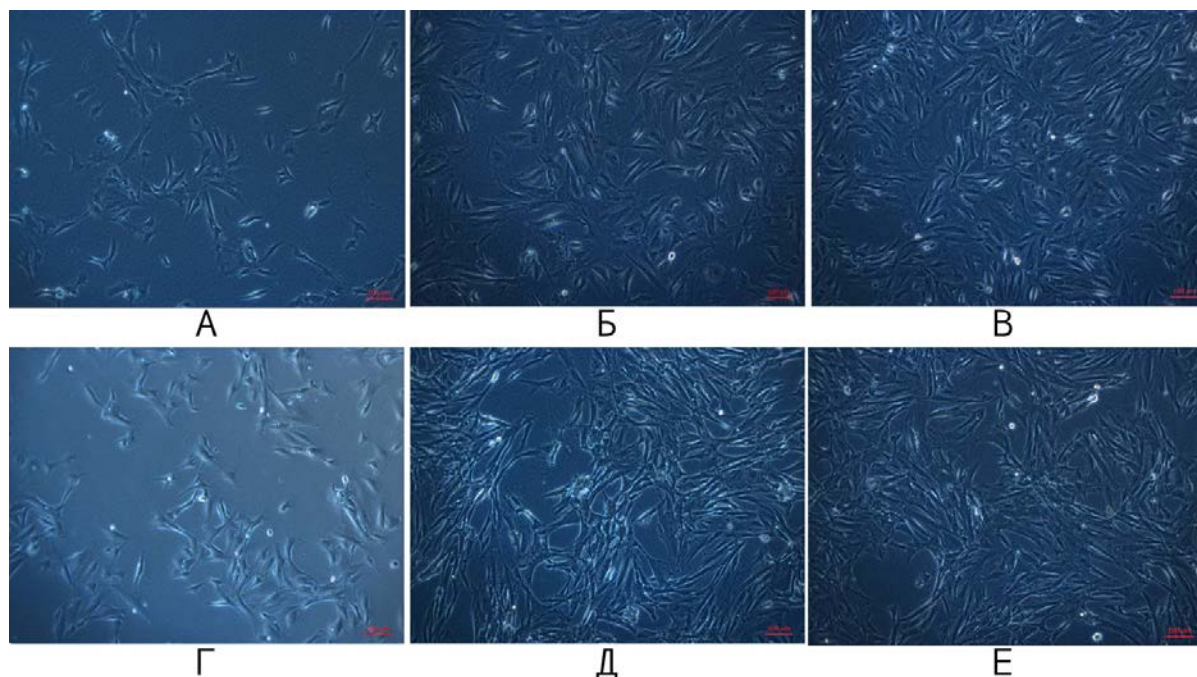


Рис. 1. Клетки почки кролика в бессывороточной среде и в среде с 2% содержанием сыворотки. А,Б,В – бессывороточная среда, подложка 1-го типа из коллагена быка пропитанного бычьей сывороткой; Г,Д,Е – почечная среда, подложка из коллагена; А,Г – третий день культивирования; Б,Д – шестой день культивирования; В,Е – девятый день культивирования. Масштабная линейка 100 мкм

Иммуноцитохимический анализ показал, что выведенные клетки имеют специфические маркеры: Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase и N-Cadherin, ассоциированные с кубическим эпителием почек (рис. 2, 3). Он показал разницу в почечной среде и в бессывороточной среде окрашиванием alpha-SMA (рис. 3), который может считаться маркером фибробластов мезенхимального происхождения [11]. Na⁺/K⁺-АТФаза – фермент, который активно участвует в поддержании электрохимического градиента на клеточной мембране и играет важную роль в фильтрации крови и

выведении токсинов из почек млекопитающих [4]. N-cadherin, будучи клеточным адгезионным белком семейства кадгеринов, играет важную роль в формировании межклеточных контактов эпителиальных тканей [5,9]. Alpha-SMA – это белок, который не экспрессируется в эпителиальных клетках, поскольку содержится преимущественно в гладкомышечных клетках и фибробластах [11,12]. Исходя из вышеизложенных результатов микроскопии и иммунофлуоресцентного анализа, можно заключить, что полученные клетки являются эпителиоцитами почки.

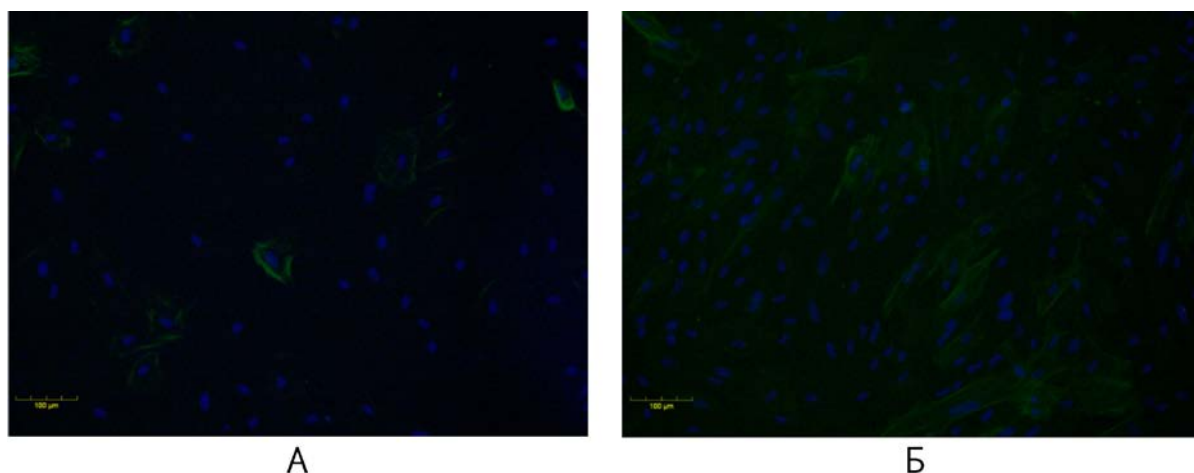
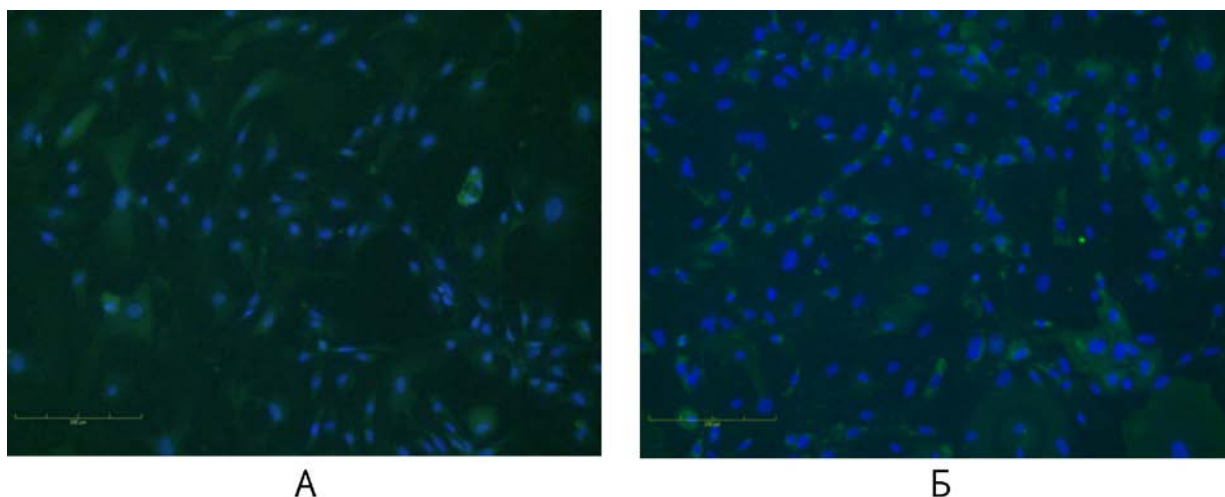


Рис. 2. Иммуноцитохимическое окрашивание полученных эпителиоцитов почки кролика: А – бессывороточная среда, подложка из коллагена 1-го типа, пропитанного бычьей сывороткой; Б – почечная среда, подложка из коллагена; А, Б – alpha-SMA (зеленый), DAPI (синий). Флуоресцентный цифровой микроскоп CELENA®X LED (США)



А

Б

Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание полученных эпителиоцитов почки кролика: А, Б – почечная среда, подложка из коллагена; А – N-cadherin (зеленый), DAPI (синий); Б – ATPase (зеленый), DAPI (синий). Флуоресцентный цифровой микроскоп CELENA®X LED (США)

Выводы

В результате проведенного исследования мы успешно выделили первичную линию эпителиальных клеток из почки кролика. В будущем предложенный протокол может быть усовершенствован рядом дополнений: методикой усиления пролиферативной актив-

ности почечных эпителиоцитов, подбором маркеров верификации подтипов почечного эпителия (падоциты, эпителиоциты проксимальных и дистальных канальцев). Полученные с помощью данной методики клеточные линии, планируется использовать для цитотоксических тестов лекарственных веществ.

Сведения об авторах статьи:

Биккузин Тимур Ильдусович – PhD, зав. молодежной научной лабораторией «Биоинженерные тест-системы для персонализированной медицины» ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: timur@bikkuzin.ru.

Язгарова Розалия Рафилевна – лаборант-исследователь молодежной научной лаборатории «Биоинженерные тест-системы для персонализированной медицины» ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: rozaliuyazgarova@gmail.com.

Михайлова Анна Владимировна – м.н.с. молодежной научной лаборатории «Биоинженерные тест-системы для персонализированной медицины» ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: mikhailova.annav@mail.ru.

Рахматуллин Шамиль Рашитович – инженер лаборатории аддитивных технологий ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: omikronus@gmail.com.

Халилов Данил Ильмирович – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: halilovdani12001@yandex.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. A simple method for the isolation and detailed characterization of primary human proximal tubule cells for renal replacement therapy / N. Sánchez-Romero [et al.] // Int J Artif Organs. – 2020. – Vol. 43. – №1. – P. 45-57. doi: 10.1177/0391398819866458.
2. Anatomical relationship between the collecting system and the intrarenal arteries in the rabbit: contribution for an experimental model / A. Shalgum [et al.] // Anat Histol Embryol. – 2012. – Vol. 41. – №2. – P.130-138. doi: 10.1111/j.1439-0264.2011.01112.x.
3. Barron, E.T. Primary cultures of rat and rabbit renal proximal epithelium as models for nephrotoxicity investigations / E.T. Barron, A. O'Brien, M.P. Ryan // Toxicol Lett. – 1990. – Vol. 53 – №1. – P. 161-165. doi: 10.1016/0378-4274(90)90115-3.
4. Clausen, M.V. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease / M.V. Clausen, F. Hilbers, H. Poulsen // Front. Physiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 1-16. doi: 10.3389/fphys.2017.00371
5. Distinct Mesenchymal Alterations in N-Cadherin and E-Cadherin Positive Primary Renal Epithelial Cells / C. Keller [et al.] // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7. – №8. – P. 1-15. doi.: 10.1371/journal.pone.0043584.
6. Flow cytometric isolation of primary murine type II alveolar epithelial cells for functional and molecular studies / M. Gereke [et al.] // Journal of visualized experiments: JoVE. – 2012. – №. 70. – P. 1-7. doi: 10.3791/4322
7. Freshney R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications / R. I. Freshney – John Wiley & Sons, 2018 – 186 p.
8. Guyton A.C., Hall J.E. Textbook of Medical Physiology. 14th ed. Philadelphia / A.C. Guyton, J.E. Hall - PA: Saunders: Elsevier, 2021. – 321 p.
9. N-cadherin is depleted from proximal tubules in experimental and human acute kidney injury / J. Nürnberger [et al.] // Histochem Cell Biol. – 2010. – Vol. 133. – №.6. – P. 641-649. doi: 10.1007/s00418-010-0702-1.
10. Taub, M. Primary kidney proximal tubule cells / M. Taub // Methods Mol Biol. – 2005. – Vol. 290. – P. 231-247. doi: https://doi.org/10.1385/1-59259-838-2:231
11. The expression of cytoskeletal proteins (α -SMA, vimentin, desmin) in kidney tissue: A comparison of fetal, normal kidneys, and glomerulonephritis / G. Gonlusen [et al.] // Int Urol Nephrol. – 2001. – Vol. 33. – №2. – P. 299-305. doi: 10.1023/A:1015226426000
12. The interstitial expression of alpha-smooth muscle actin in glomerulonephritis is associated with renal function / Z. S. Novakovic [et al.] // Med Sci Monit. – 2012. – Vol. 18. – №.4. – P. 236-240. doi.: 10.12659/MSM.882623
13. The wide utility of rabbits as models of human diseases / P. J. Esteves [et al.] // Exp Mol Med. – 2018. – Vol. 50. – № 5. – P.1-10. doi: 10.1038/s12276-018-0094-1.
14. Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin / C. J. Detrisac [et al.] // Kidney Int. – 1984. – Vol. 25. – №.2. – P. 383-90. doi: 10.1038/ki.1984.28. PMID: 6727133.

REFERENCES

1. Sánchez-Romero N, Martínez-Gimeno L, Caetano-Pinto P, Saez B, Sánchez-Zalabardo JM, Masereeuw R, Giménez I. A simple method for the isolation and detailed characterization of primary human proximal tubule cells for renal replacement therapy. *Int J Artif Organs*. 2020;43(1): 45-57. doi: 10.1177/0391398819866458. (In Eng)
2. Shalgum A, Marques-Sampaio BPS., Dafalla A, Pereira-Sampaio MA. Anatomical relationship between the collecting system and the intrarenal arteries in the rabbit: contribution for an experimental model. *Anat Histol Embryol*. 2012; 41 (2): 130-138. doi: 10.1111/j.1439-0264.2011.01112.x. (In Eng)
3. Barron ET, O'Brien A, Ryan MP. Primary cultures of rat and rabbit renal proximal epithelium as models for nephrotoxicity investigations. *Toxicol Lett*. 1990;53(1):161-165. doi: 10.1016/0378-4274(90)90115-3. (In Eng)
4. Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front. Physiol*. 2017;8:1-16. doi: 10.3389/fphys.2017.00371. (In Eng)
5. Keller C, Kroening S, Zuehlke J, Kunath F, Krueger B, Goppelt-Strube M. Distinct Mesenchymal Alterations in N-Cadherin and E-Cadherin Positive Primary Renal Epithelial Cells. *PLOS ONE*. 2012;7(8):1-15. doi.: 10.1371/journal.pone.0043584. (In Eng)
6. Gereke M, Autengruber A, Gröbe L, Jeron A, Bruder D, Stegemann-Koniszewski S. Flow cytometric isolation of primary murine type II alveolar epithelial cells for functional and molecular studies. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012;70: 1-7. doi: 10.3791/4322 (In Eng)
7. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons, 2018. (In Eng)
8. Guyton AC, Hall JE Textbook of Medical Physiology. 14th ed. Philadelphia. PA: Saunders: Elsevier, 2021. (In Eng)
9. Nürnberger J, Feldkamp T, Kavapurackal R, Saez AO, Becker J, Hörbelt M, Kribben A. N-cadherin is depleted from proximal tubules in experimental and human acute kidney injury. *Histochem Cell Biol*. 2010;133(6):641-649. doi: 10.1007/s00418-010-0702-1. (In Eng)
10. Taub M. Primary kidney proximal tubule cells. *Methods Mol Biol*. 2005; 290: 231–247. doi: https://doi.org/10.1385/1-59259-838-2:231. (In Eng)
11. Gonlusen G, Ergin M, Paydaş S, Tunali N. The expression of cytoskeletal proteins (α -SMA, vimentin, desmin) in kidney tissue: A comparison of fetal, normal kidneys, and glomerulonephritis. *Int Urol Nephrol*. 2001; 33(2):299-305. doi: 10.1023/A:1015226426000. (In Eng)
12. Novakovic ZS, Durdov MG, Puljak L, Saraga M, Ljutic D, Filipovic T, Pastar Z, Bendic A, Vukojevic K. The interstitial expression of alpha-smooth muscle actin in glomerulonephritis is associated with renal function. *Med Sci Monit*. 2012; 18 (4):236-240. doi.: 10.12659/MSM.882623 (In Eng)
13. Esteves PJ, Abrantes J, Baldauf H, BenMohamed L, Chen Y. [et al.]. The wide utility of rabbits as models of human diseases. *Exp Mol Med*. 2018; 50(5): 1–10. doi: 10.1038/s12276-018-0094-1. (In Eng)
14. Detrisac CJ, Sens MA, Garvin AJ, Spicer SS, Sens DA. Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin. *Kidney Int*. 1984 Feb;25(2):383-90. doi: 10.1038/ki.1984.28. PMID: 6727133. (In Eng)

УДК 615.322:582.991.1:577.15

© Р.И. Лукашов, Н.С. Гурина, 2025

Р.И. Лукашов, Н.С. Гурина
ФЕРМЕНТАЦИЯ ТРАВЫ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ
КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЭКСТРАКЦИИ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ
Учреждение образования «Белорусский государственный
медицинский университет», г. Минск

Цель исследования. Установить влияние естественной, температурной и холодовой ферментации на содержание гидроксикоричных кислот в траве эхинацеи пурпурной.

Материал и методы. Объект исследования – свежая трава эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea herba* L., *Asteraceae*) промышленных серий и заготовленная от культивируемых форм.

Изучали влияние на содержание гидроксикоричных кислот (ГКК) и активность полифенолоксидазы следующих видов ферментации: температурная, холодовая, естественная, а также термической и ультразвуковой обработки и естественной сушки.

Содержание ГКК определяли спектрофотометрическим методом с реактивом Арнова, активность полифенолоксидазы – спектрофотометрическим методом по А.Н. Бояркину.

Результаты. Ферментация при 40°C в течение 2 ч значительно повышала содержание гидроксикоричных кислот на 64,8%, после ферментации при 60°C количество гидроксикоричных кислот и активность полифенолоксидазы были значительно ниже. Естественная ферментация увеличивала содержание ГКК на 26,5 %, что соответствовало минимальной активности фермента. Температурная обработка свежего сырья повышала содержание ГКК в 2,3 раза с одновременным резким падением активности полифенолоксидазы. Термическая инактивация фермента во всех изученных способах предварительной обработки сырья снижала содержание гидроксикоричных кислот. Температурная и холодовая ферментации высушенной травы снижала или не влияла на содержание веществ.

Выводы. Среди всех изученных способов предварительной обработки свежей травы эхинацеи пурпурной наибольшее содержание гидроксикоричных кислот установлено в термически обработанном сырье, сопровождалось резким падением активности полифенолоксидазы в нем.

Ключевые слова: температурная ферментация, холодовая ферментация, естественная ферментация, термическая обработка, трава эхинацеи пурпурной, гидроксикоричные кислоты, повышение экстракции.

R.I. Lukashov, N.S. Gurina
FERMENTATION OF PURPLE CONEFLOWER HERB
AS A METHOD TO INCREASE THE HYDROXYCINNAMIC ACIDS EXTRACTION

Purpose. To establish the influence of natural, temperature and cold fermentation on the content of hydroxycinnamic acids in purple coneflower herb.

Material and methods. The object of the study is fresh purple coneflower herb of industrial series and harvested from cultivated forms.

The effect of the following types of fermentation on the content of hydroxycinnamic acids and the activity of polyphenol oxidase was studied: temperature, cold, natural, as well as thermal and ultrasonic pre-treatment, natural drying. The content of hydroxycinnamic acids was determined by the spectrophotometric method with Arnov's reagent, the activity of polyphenol oxidase – by the spectrophotometric method according to A.N. Boyarkin.