

НУБІП України
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

УДК 636.09 : 615.375.012-07

НУБІП України

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

ветеринарної медицини

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

Біохімії і фізіології тварин імені
академіка М.Ф. Гулого

Томчук В. А. д.в.н, професор

НУБІП України

Цвіліховський М.І.

(підпис)

(ПШБ)

(підпис)

« » 2021 р

« » 2021 р

НУБІП України

КВАЛІФІКАЦІЙНА МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

08.14 – МР.1895”С” 2020.12.01. 029

на тему: «Лабораторна експресдіагностика імуномодуючих
властивостей біопрепаратів»

НУБІП України

Спеціальність 211 – «Ветеринарна медицина»

Освітня програма «Ветеринарна медицина»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

НУБІП України

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи

Професор, доктор біологічних наук

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Калачнюк Л.Г.

(ПШБ)

Виконала

Студентка 2 курсу магістратури

(підпис)

Калиновська К.О.

(ПШБ студента)

НУБІП України

Консультант з економічних питань

к.вет.н., доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Ситнік В.А.

(ПШБ)

КИЇВ – 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Біохімії і фізіології тварин імені

академіка М.Ф. Гудого

(назва кафедри)

Томчук В. А. д.в.н, професор

(ПІБ, науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

2021 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ МАГІСТЕРСЬКОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Калиновській Катерині Олександрівні

(Прізвище, ім'я та по-батьків)

Спеціальність: 211 «Ветеринарна медицина»

Освітня програма

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Тема магістерської роботи: «Лабораторна експресдіагностика імунomodуючих біопрепаратів»

затверджена наказом ректора НУБіП України від «С» 01.12.2020 р. № 1895

Термін подання завершеної роботи на кафедру _____

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської роботи – Місце виконання роботи

Національний університет біоресурсів і природокористування України під керівництвом доктора біологічних наук, професора, академіка Національної академії наук вищої освіти України Калачнюк Лілії Григорівни.

НУБІП України

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Дослідити наявність чи відсутність токсичних ефектів бетаїну на клітини аортального ендотелію свині.

2. Визначити активність мітохондріальних ензимів в МТТ-тесті під впливом бетаїну.

НУБІП України

3. Визначити кількість поглинання глюкози ендотеліоцитами за дії бетаїну.

4. Визначити активність каталази, ТВК-активних продуктів та SH-груп у клітинах ендотелію за дії бетаїну.

5. Визначити морфологічні характеристики клітин ендотелію свині за дії бетаїну.

НУБІП України

Перелік графічного матеріалу (за потреби)

Дата видачі завдання « ____ » _____ 20__ р.

НУБІП України

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи

Професор, доктор біологічних наук

(підпис)

Калачнюк Л. Г.

(ПІВ)

Завдання прийняв до виконання

НУБІП України

(підпис)

(ПІВ)

НУБІП України

НУБІП України

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ 9

РЕФЕРАТ 7

ВСТУП 8

РОЗДІЛ 1 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 10

1.1 Загальний опис бетаїну та його властивості 10

1.2 Фізіологічні функції бетаїну 14

1.2.1 Бетаїн як осмопротектор 14

1.2.2 Бетаїн як донор метильних груп 16

1.3 Протизапальні властивості бетаїну у розвитку захворювань 17

1.3.1 Метаболізм сірковмісних амінокислот у присутності бетаїну в умовах
оксидативного стресу 17

1.3.2 Інгібування сигнального шляху NF- κ B бетаїном 19

1.3.3 Інгібування активації інфламмасоми NLRP3 бетаїном 21

1.3.4 Регулювання бетаїном енергетичного метаболізму для блокування
хронічного запалення 22

1.3.5 Зниження бетаїном стресу ендоплазматичного ретикулуму та
апоптозу 27

Висновок з огляду літератури 30

РОЗДІЛ 2

НАПРЯМИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 31

2.1 Матеріали та обладнання 31

2.2 Клітинна лінія 32

2.3 Виділення клітин з культури 32

2.4 Рутинний підрахунок клітин у камері Горяєва	33
2.5 МТТ-колориметричний метод оцінки кількості живих клітин за активністю мітохондріальних дегідрогеназ клітин	34
2.6 Визначення адгезивних властивостей культивованих клітин за забарвленням фіолетовим кристалічним	36
2.7 Визначення рівня глюкози у середовищі інкубації клітин	38
2.8 Визначення загального білка у культурі клітин	38
2.9 Визначення вмісту ТВК-активних продуктів (малонового діальдегду) в культурі ендотеліальних клітин	39
2.10 Визначення активності каталази	40
2.11 Оцінка морфологічних характеристик	40
2.12 Статистична обробка отриманих даних	41
РОЗДІЛ 3	
РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	42
3.1 Визначення виживаності ендотеліальних клітин при забарбовуванні трипановим синім за дії бетаїну	42
3.2 Визначення активності мітохондріальних ензимів в МТТ-тесті під впливом бетаїну	44
3.3 Визначення поглинання глюкози ендотеліоцитами за дії бетаїну	46
3.4 Визначення активності каталази, ТВК-активних продуктів та SH-груп в клітинах ендотелію за дії бетаїну	47
3.5 Визначення морфологічних характеристик клітин ендотелію свині за дії бетаїну	49

3.6 Визначення економічної ефективності даних досліджень.....	51
ВИСНОВКИ.....	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	53

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна магістерська робота складається із трьох структурних розділів. У першому розділі викладено огляд тематичної літератури, де викладено та детально описано сполуку бетаїн, його фізіологічні функції: діє як осмопротектор, як донор метильних груп, також розглянуто які саме є протизапальні властивості бетаїну у ході розвитку запалення в організмі. Окрім цього більш детально описано метаболізм сірковмісних амінокислот у присутності бетаїну в умовах оксидативного стресу, й інгібування сигнального шляху NF-κB, і інгібування активації інфламмасоми NLRP3. У другому розділі ми обрали головні матеріали та методи для подальших досліджень, описане обладнання яким користувались, а також детально розглянуті поетапні схеми процедур. А саме: виділення клітин із культури, підрахунок їх у камері Горяєва, визначення адгезивних властивостей культивованих клітин; визначення рівня глюкози у середовищі інкубації клітин; визначення кількості біохімічного показника загального білку – в культурі клітин; визначення активності каталази та визначення ТВК-активних продуктів в культурі клітин; оцінка морфологічних характеристик отриманих культур клітин. У третьому розділі зазначені як математичні розрахунки, так і візуальні результати проведених вищеназваних досліджень, підведені підсумки виконаної роботи, та узагальнення результатів досліджень.

Загальний обсяг роботи - 59 сторінок.

Кількість таблиць – 5. Кількість рисунків – 5.

Кількість використаних літературних джерел – 54.

Ключові слова, що були використані в роботі: бетаїн, активні форми кисню, ROS, осмопротектор, стрес ендоплазматичного ретикулуму, донор метилових груп, метаболізм сірковмісних амінокислот, NF-κB, протизапальні властивості бетаїну.

НУБІП України

ВСТУП

Велика кількість науковців, а також лікарів, за останні десятиріччя все

більше уваги приділяють дослідженню різних хімічних сполук, які можуть не

тільки покращити життя людей, а й допомогти вилікувати багато захворювань.

Тож, однією із терапій яку нині розвивають є метаболічна. Зацікавлення цим методом служить розкриття різноманітних механізмів порушень метаболізму

в живих організмах та завдяки обмеженим спектром можливостей традиційної

фармакотерапії, й існуючих обмежень у використанні препаратів, та зниження

їх дієвості. Під час застосування метаболічної терапії використовують такі

ліки, які сприяють нормалізації обмінних процесів в організмі тварин та людей. До них відносять – анаболіки, антигіпоксанти й антиоксиданти, білки

й амінокислоти, вітаміни та вітаміноподібні препарати, гіпоглікемічні,

гіполіпідемічні, детоксикаційні засоби; коректори метаболізму кісткової й

хрящової тканини, макро- й мікроелементи, регідратанти, регулятори водно-електролітного балансу й кислотно-лужного стану, а також препарати, які

безпосередньо мають вплив на обмін сечової кислоти; ще сюди відносять

засоби для ентерального й парентерального харчування, засоби, що

перешкоджають утворенню та сприяють розчиненню конкрементів, ферменти

й антиферменти. Насамперед, метаболічні препарати гарно зарекомендували

себе – вони мають м'який клінічний ефект й практичну відсутність побічного

впливу на організм. Одними з успішно дослідженими є бетаїн й аргінін.

Поряд з тим вивчення властивостей та біохімічних показників за впливу

біопрепаратів на метаболічні процеси лабораторною експресдіагностикою є

актуальним через їх швидкість та якість (точність вибору характерних змін).

Звідси метою роботи є проведення лабораторної експресдіагностики одного з

імуномодулюючих біопрепаратів - бетаїну.

НУБІП України

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

BHMT – бетаїн-гомоцистеїн метилтрансфераза

DMG – диметилгліцин

НУБІП України

MC – метіонін синтаза

SAM – S-аденозилметіонін

MAT – метіонін-аденозилтрансферази

НУБІП України

ROS – активні форми кисню

SOD – супероксиддисмутаза

CDO – цистеїн диоксигеназа

НУБІП України

MTT-тест – колометричний тест

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальний опис бетаїну та його властивості

Бетаїн являє собою триметилглiцин, що є речовиною, яка широко розповсюджена в організмі тварин, рослин та всередині мікроорганізмів. Фізіологічно функціонує як важливий осмопротектор та донор метильних груп. Накопичені дані свідчать про те, що бетаїн володіє протизапальними функціями під час перебігу багаточисленних захворювань. Також, покращує метаболізм сірчаних амінокислот проти окислюваного стресу, пригнічуючи у той час активність ядерного фактору- κB й активацію NLRP3 інфламмасоми, регулює енергетичний обмін, пом'якшує стрес ендоплазматичного ретикулула й апоптоз.

Бетаїн — це стабільна та нетоксична природна речовина, виглядає як гліцин із трьома додатковими метильними групами, та називають триметилглiцином. Окрім того, він має цвіттеріонну четвертинну аммонієву форму $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ \text{CH}_2\text{COO}^-]$ (Рисунок 1). У XIX віці бетаїн був уперше досліджений у рослині *Beta avulgaris*, а потім ще в пшеничних висівках, шпинаті, мікроорганізмах та у безхребетних у воді. До основних його джерел у природі належать: висівки і зародки пшениці, шпинат, буряк, насіння соняшнику, криль, макарони, деякі приправи — паприка, карі, імбир, куркума, орегано. Міститься бетаїн і в деяких лікарських травах та ягодах, наприклад в ехінацеї пурпуровій, корені лопуха та ягодах Годжі. В організмі людини деяка кількість бетаїну утворюється природним шляхом за окислення холіну (вітаміну B4) в печінці та нирках. Найбільший вміст бетаїну і його транспортера з плазми визначається в печінці. У препаратах речовина найчастіше використовується у вигляді гідрохлориду бетаїну або цитрату, його відносять і до метаболіків (гіполіпідемічних засобів), і до гепатопротекторів, і до групи травних ферментних засобів. Бетаїн бере

участь у багатьох біохімічних процесах в організмі і має багатобічне фізіологічне значення. Головна функція бетаїну — зниження рівня гомоцистеїну — потенційно токсичного агента.

Окрім того, є дані про його нормалізуючий вплив на діяльність травної системи, активізацію ліпідного обміну в печінці, підвищення продукції жовчі і поліпшення її відтоку; гідрохлоридна сіль бетаїну може використовуватись за ахлоридрії, підвищувати апетит і поліпшувати засвоєння заліза, кальцію, вітамінів. Бетаїн є активатором у синтезі фосфоліпідів клітинних мембран і донором метильних груп у перетворенні метіоніну з гомоцистеїну та завдяки залученню до цих двох реакцій впливає на проміжний метаболізм. Дієтичне використання бетаїну грає вирішальну роль у вмісті бетаїну в організмі. Окрім цього, може синтезуватись із холіну в організмі. Дослідження показують, що високі концентрації присутні у новонароджених людей, тварин і свідчать про ефективність цього синтетичного механізму.

Зовсім нещодавно бетаїн був виявлений в яєчниках миші, де його кількість збільшується після запліднення. Можливо, він діє як осмоліт, а передімплантаційні ембріони накопичують бетаїн через Na-залежний амінокислотний транспортер. Окрім того, виявлення високої концентрації бетаїну свідчить про його важливість у реакціях метилювання на стадіях розвитку. Це підтверджується спостереженнями, що гальмування цих процесів під час ембріогенезу призводить до дефектів розвитку [22].

Щодо біологічного значення, то з одного боку бетаїн являється важливим донором метильних груп у трансметилюванні — процесі, який каталізується бетаїн-гомоцистеїн метилтрансферазою (BHMT). Під час реакції гомоцистеїн каталізується із утворенням метіоніну безпосередньо у печінці та нирках. Із іншого боку, бетаїн являється важливим

осмопротектором, головним чинником у нирках, печінці й у мозку, а велика кількість може накопичуватись у клітинах без порушень їх функцій; важливим фактором є те, що цю роль захищають клітини, білки та ферменти в умовах осмотичного стресу.

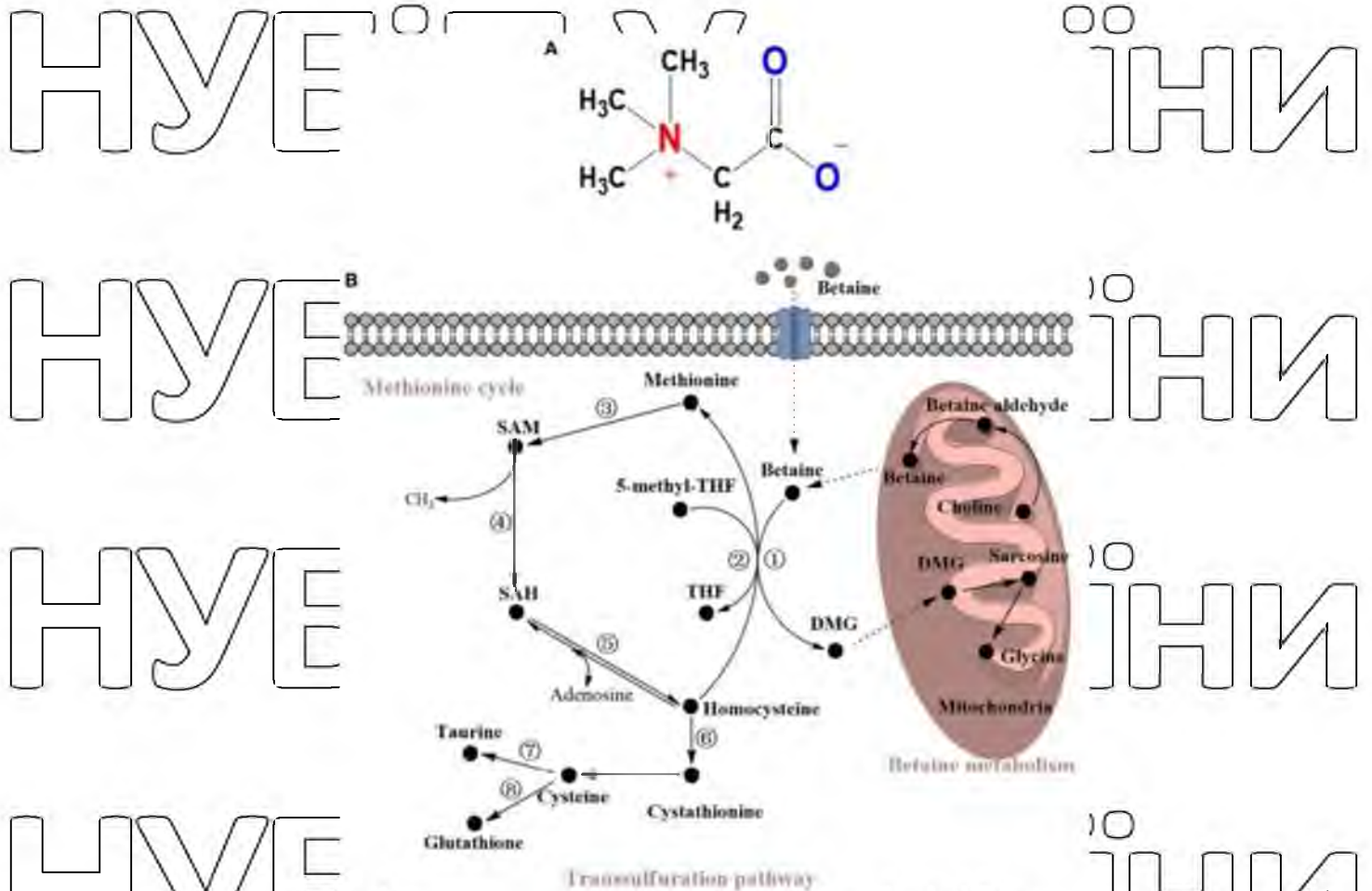


Рисунок 1

(A) Молекулярна структура бетаїну.

(B) Метаболізм бетаїну й родинних сірчаних аміноксилот (SAAs). Бетаїн являє собою субстрат холіну й може бути перетворений в ДМГ шляхом диметилування щоб у кінцевому результаті стати гліцином. Більшість цих реакцій відбувається у мітохондріях. Після реакції диметилування гомоцистеїн перетворюється у метіонін, який змінюється на 5-метил-ТНФ, що каталізує метилування з утворенням ТНФ. Після цього метіонін послідовно перетворюється в SAM і, нарешті, в гомоцистеїн, утворюючи метіоніновий цикл. Гомоцистеїн також може пройти шлях транссульфурації з утворенням

цистатіоніну, цистеїну, таурину чи глутатіону. Ферменти, що вище вказані в описі, представлені та позначені в циклі індивідуальними номерами.

Нещодавно декілька досліджень були присвячені різним природним поєднанням, які довели ефективність у боротьбі проти багатьох захворювань.

Наприклад, Генг і науковці виявили, що водні екстракти *Lucium chinensis* містять високу концентрацію бетаїну, та використовувались у традиційній медицині у південно-східній Азії для лікування захворювань печінки [16]. Такі дані свідчать про те, що функції бетаїну та його природних з'єднань стали

актуальною темою внаслідок його протизапальних властивостей на перебіг захворювань таких як діабет, а також неалкогольних й алкогольних жирових дистрофічних змін печінки (NAFLD/AFLD) [28]. У даній роботі ми узагальнюємо роль бетаїну в його фізіологічних функціях, протизапальних механізмах й захворювань у людей.

1.1 Фізіологічні функції бетаїну

Як показують багаточисленні дослідження, клітини, що містяться у всіх живих організмах від бактерій до хребетних, використовують бетаїн у якості осмопротектора; він гарно засвоюється через дванадцятипалу кишку тонкого кишечника у тварин [32, 33]. У свою чергу, бетаїн може вільно фільтруватись нирками й реабсорбуватись у циркуляцію, тому загалом він виводиться із організму завдяки поту, а не з сечею. Накопичення бетаїну залежить від транспортерів й розподіляється головним чином у нирках, печінці та мозку.

Хоча бетаїн використовується у різноманітних тканинах у якості осмопротектора, його головною роллю є донорство метильних груп у метаболізмі печінки.

1.1.1 Бетаїн як осмопротектор

На відміну від неорганічних солей, осмопротектори являються добре розчинними невеликими органічними поєднаннями, які накопичуються у

великих кількостях у клітинах, не порушуючи їх функцій. Тобто ці поєднання захищають від осмотичного стресу. Гіперосмос може викликати відтік води й послідовне зменшення об'єму клітин, тому ці ефекти можуть бути загрозою для виживання клітин організму. Таким чином, щоб збалансувати гіперосмос

і захистити клітини від висихання, вони накопичують різні види осмопротекторів, включаючи бетаїн, сорбіт і таурин, що є обов'язковим

На відміну від інших осмолітів та неорганічних видів солей, таких як сечовина та Na^+ , в свою чергу бетаїн зменшує властивість молекул води розчиняти білки, тим самим стабілізуючи нативні білкові структури. Крім того, бетаїн має можливість збільшувати цитоплазматичний об'єм і вміст вільної рідини/води у клітинах для попередження усадки в гіперосмотичних умовах й інгібувати різноманіття білків, що пов'язані з апоптозом, який викликаний гіперосмотичним впливом. Завдяки цим перевагам – додаткова

кількість бетаїну може бути використаною для протидії тиску, коли тканини гіпертонічні. Наприклад, у нирках – гіпертонус підвищує рівень бетаїн - γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) транспортної системи (GAT4/BGT1) у базолатеральній плазматичній мембрані, щоб отримати більшу кількість

бетаїну. Однак, у нормальних фізіологічних умовах рівень BGT1 досить низький, і цей транспортер присутній головним чином у цитоплазмі клітин

Маїна-Дарбі нирок собак (MDCK) [20].

1.1.1 Бетаїн як донор метилових груп

Бетаїн являє собою не тільки метаболіт холіну, але й донором метильних груп, що бере участь у метилюванні. Такий процес як метилювання ДНК чи білку, є важливими біохімічним процесом в організмі тварин. У свою чергу, доступність донорів метильних груп впливає на метилювання. Було досліджено, що бетаїн, метіонін та холін є представниками найбільш важливих донорів метильних груп, які присутні в харчуванні [53]. Тим не менш, головна

НУВІП УКРАЇНИ

роль метіоніну – субстрат для синтезу білка, а холін в основному бере участь у формуванні клітинної мембрани й нейротрансмітерів. Реакція трансметиловання бетаїну є частиною однувглецевого метаболізму через метіонінового циклу, який відбувається у мітохондріях клітин печінок і нирок.

НУВІП УКРАЇНИ

У цій реакції ВМТ каталізує приєднання метильної групи від бетаїну до гомоцистеїну з утворенням метіоніну, який у кінці перетворюється на диметилглїцин (ДМГ).

НУВІП УКРАЇНИ

ДМГ має дві доступні метильні групи й можливо, деградує до саркозину, а у результаті перетворюється у глїцин. Аналогічно, метіонін синтаза (МС) є вітаміном В₁₂ – залежний фермент, може також каталізувати утворення метіоніну з гомоцистеїну з донором метильної групи з N⁵-метилтетрагідрофолату. Ці реакції важливі для тварин, оскільки вони зберігають метіонін, детоксифікують гомоцистеїн, який є причиною серцево-

НУВІП УКРАЇНИ

судинних захворювань й утворюють S-аденозилметіонін (SAM) – це кофермент, який бере участь у реакціях переносу метильних груп. SAM утворюється із метіоніну за допомогою метіонін-аденозилтрансферази (MAT),

НУВІП УКРАЇНИ

а SAM – є основним метильним агентом. Після деметилування SAM перетворюється у S-аденозилгомоцистеїн (SAH). Співвідношення SAM : SAH впливає на різноманітні SAM-залежні метилтрансфрази, включаючи протеїн-Лізоаспарат метилтрансферух (PIMT), протеїн-аргїнін метилтрансферазу (PRMT) й ізопренїлцистеїнкарбоксіметилтрансферазу (ICMT). Ці ферменти пов'язані з процесом відновлення білків, ліпідним метаболізмом, білковими взаємодіями й активністю ГТфрази – це велика родина ферментів гідролаз, які пов'язують і гідролізують гуанозинтрифосфат (GTP).

НУВІП УКРАЇНИ

Одна молекула SAH внаслідок гідролізується під дією SAH-гідролазою з утворенням однієї молекули гомоцистеїну й однією молекулою аденозину.

НУВІП УКРАЇНИ

Ця реакція є оборотною, й напрямлення реакції залежить від того чи видалені ці продукти. Всі ці реакції разом формують метіоніновий цикл. Окрім цього, за допомогою цистатіонін-β-синтази, вітаміну В₆-залежного ферменту,

НУВІП УКРАЇНИ

Гомоцистеїн може перетворитись у цистатіонін на шляху до транссульфурації. За таких умов, катаболізм гомоцистеїну призводить до збільшення утворення глутатіону (GSH), таурину й інших метаболітів. Було доведено, що дієтична добавка бетаїну впливає на різні сірковмісні амінокислоти (SAAs). Наприклад, таке додавання ефективно збільшує доступний метіонін й SAM. Таким чином, бетаїн діє як метиловий донор і відіграє важливу роль у метаболізмі SAA, а більш детально цей метаболічний шлях відображений на рисунку 15.

1.2 Протизапальні властивості бетаїну у розвитку захворювань

Запалення, як імунна реакція, є важливим й головним у процесі захисту організму, та у відновленні й заживленні ран. Однак, надмірне, або тривале запалення може бути патогенезом різноманітних захворювань. У зв'язку з цим використання природних поєднань для лікування захворювань може стати хорошою стратегією, контролюючи інтенсивність запальної реакції.

Наприклад, багато досліджень показують, що ГАМК має протизапальну дію. [40] Виходячи з цього, описані наступні дії бетаїну нижче.

1.3.1 Метаболізм сірковмісних амінокислот у присутності бетаїну в умовах оксидативного стресу

Активні форми кисню (ROS) – є побічними продуктами біологічних реакцій, які генерують енергію; зокрема вони перетворюються у мітохондріях, де в основному відбувається окислювальний метаболізм. За нормальних умов організм має дві системи детоксикації, які можуть очистити організм від ROS і вільних радикалів: антиоксидантних ферментів і антиоксидантних агентів. Каталаза, супероксиддисмутаза (SOD), мелатонін і GSH являються прикладами різних детоксикаційних агентів. Однак, надлишковий рівень ROS представляє загрозу для клітин, оскільки вони змінюють стабільність нуклеїнових кислот, білків й ліпідної мембрани; окрім того, високі рівні ROS викликаються патологічні процеси, включаючи запалення.

S-вмісні амінокислоти (гомоцистеїн, метіонін, SAM, SAH і цистеїн) беруть участь у метаболічних процесах, включаючи синтез GSH, синтезі білків і реакціях трансметильовання. Хоча гомоцистеїн сприяє синтезу GSH, багато

різних досліджень показали, що гіпергомоцистеїнемія в кінцевому результаті викликає окисдаивний стрес й апоптоз [7, 9]. Лікування бетаїном може

безпосередньо впливати на концентрацію гомоцистеїну завдяки стимулюванню перетворення гомоцистеїну до метіоніну, для регуляції концентрації SAA. Наприклад, ROS і вільні радикали, викликані етанолом,

можуть пригнічувати метіонін синтазу, щоб інгібувати реметильовання й

викликати гіпергомоцистеїнемію. Щоб компенсувати зниження активності МС, бетаїн був використаний у якості альтернативного донору метилу, який покращує активність ВНМТ для утворення метіоніну й SAM, а у результаті для

видалення гомоцистеїну в печінці щурів лінії Вістар, який спеціально для дослідження годували етанолом.

Потрібно позначити, що в мишей C57B6 спостерігалось зниження або відсутність змін в експресії ВНМТ, а не компенсаторне збільшення, яке

очікували науковці. Тому, оскільки бетаїн перетворює гомоцистеїн у метіонін,

концентрація метіоніну тісно пов'язана з концентрацією бетаїну. У свою

чергу, метіонін відіграє важливу роль в антиоксидації. Наприклад, метіонін може знижувати оксидативний стрес внаслідок хелатування й може використовуватись гепатоцитами для синтезування GSH. Окрім цього, ця

реакція необхідна для утворення SAM й видалення гомоцистеїну. Дослідження

показали, що SAM являє собою прямий антиоксидант у організмі живих істот і саме він може модулювати GSH метаболізм. Більш того, виходячи з оберненої реакції, в результаті якої SAH перетворюється у гомоцистеїн й аденозин,

концентрація гомоцистеїну буде знижуватись і надалі. SAH являється

потужним інгібітором SAM-залежних метилтрансфераз, які метилують нуклеїнові кислоти, білки та інші складні хімічні сполуки.

Науковець Квон і його колеги виявили, що бетаїн може значно

збільшувати співвідношення SAM : SAH й активність MAT. Вчений Кхарбанда та його співробітники виявили, що бетаїн має властивість запобігати розвитку синтази оксиду азоту 2 (NOS2); експресії синтази оксиду азоту 2 (NOS2) [35]. Цей

процес ініціюється запаленням, і співвідношення SAM : SAH збільшується для підтримання метилювання промотору NOS2. Окрім того, гомоцистеїн може також бути перетворений у цистеїн за допомогою незворотньою транссульфурацією. І після цього, цистеїн утворює або таурин через цистеїн діоксигеназу (CDO) або GSH через γ -глутамілцистеїн синтетазу. Науковець

Кхарбанда дослідив, що лікування бетаїном пригнічує активність CDO, й знижує рівень таурину, а в той же час, збільшує виробництво GSH для нейтралізації оксидативного стресу у мишей із наступними захворюваннями NAFLD/AFLD [33, 34].

В окремих дослідженнях було показано, що антиоксидатні ферменти, такі як SOD2 і глутатіон S-трансфераза (GST), були видозмінені після лікування бетаїном [10, 11]. Але, більшість результатів доводять відсутність значних змін. Таким чином, у майбутньому необхідно провести додаткові дослідження, щоб підтвердити чи дійсно змінились ці антиоксидантні ферменти після лікування бетаїном.

Враховуючи вищеперераховані дослідження, можна зробити висновок, що антиоксидантний механізм дії бетаїну може відбуватись внаслідок прискорення метаболізму SAA. Ці зміни після лікування бетаїном пов'язані з окисненням функції первинних SAA і представлені в Таблиці №1.

НУБІП України

Таблиця №1

Взаємозв'язки хімічних процесів в організмі, вплив окислювальних

функцій перших сірководмісних амінокислот після лікування бетаїном

Суміш	Зміни	Функція
Метіонін	Посилення/збільшення	Синтез GSH; зниження окисдативного стресу
S-аденозилметіонін	Посилення/збільшення	Збільшення вмісту у клітині GSH; антиоксидантна дія
S-аденозилгомоцистеїн	Інгібування/зменшення	Інгібітор метилтрансферази; індукує оксидативний стрес
Гомоцистеїн	Інгібування/зменшення	Індукує оксидативний стрес; синтез GSH
Цистеїн	Посилення/збільшення	Синтез GSH; знижує оксидативний стрес
GSH	Посилення/збільшення	Антиоксидант

1.3.2 Інгібування сигнального шляху NF- κ B бетаїном

Шлях транскрипції ядерного фактору- κ B (NF- κ B) контролює велику кількість генів, які беруть участь у запаленні; гени містять прозапальні цитокіни: фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α), інтерлейкін 1 бета (IL-1 β) й інтерлейкін 23 (IL-23). Як наслідок, доведено, що більшість запальних захворювань пов'язані з хронічною активацією NF- κ B.

Отже, шлях NF- κ B став дуже важливим кандидатом у лікуванні запалення. Науковці виявили, що бетаїн може пригнічувати активність NF- κ B, а також структурних генів [18].

Наприклад, в одному із перших досліджень, проведених на культурах клітин старих нирок, лікування бетаїном пригнічувало активність NF- κ B й експресію різних пов'язаних із ним genaми, включаючи TNF- α , молекулу

адгезії судинних клітин – молекула-1 (VCAM-1), внутрішньоклітинної молекули клітинної адгезії-1 (ICAM-1), індукована синтаза оксиду азота (iNOS) і циклооксигеназа-2 (COX-2). В інших дослідженнях вчені виявили, що

бетаїн інгібує NF-κB шляхом пригнічення двох важливих активаторів:

мітоген-активованого протеїну кіназа (MAPKs) і кіназа/IκB кінази, яка індукує ядерний фактор (NIK/IKK). NIK/IKK може послабити інгібування IκB й

ініціювати транскрипційну активацію NF-κB. MAPK складаються із c-Jun NH2-термінальної кінази (JNK), протеїну 38 (p38) й внутрішньоклітинної

сигнал-регульованої кінази (ERK1/2) й приймають участь у запаленні та

реакції на протизапальні цитокіни експресії. Механізм дії бетаїну заснований

шляхом підтримки рівню тіолів, включаючи GSH, для пригнічення продукції ROS й активності NF-κB. Окрім цього, бетаїн також інгібує деякі сигнальні

молекули, які викликають активацію NF-κB. Класично, Toll-подібні рецептори

(TLR) беруть участь у важливій сигнальній події, яке у кінці призводить до

активації NF-κB. У дослідженні *in vitro* лікування бетаїном попередило ліпополісахарид (LPS, специфічний активатор TLR-4), що викликає активацію

NF-κB у клітинах макрофагів мишей RAW 264.7.

В іншому дослідженні було показано, що лікування бетаїном знижує можливу нейротравму гіпоталамуса внаслідок інгібування сигнального шляху

TLR-4/NF-κB для відновлення астрогліозу й запалення, викликаних фруктозою. Цедослідження передбачає, що бетаїн може інгібувати експресію

гістонових деацетилаз 3, які можуть активувати NF-κB внаслідок зв'язування з

IκBα. Інше дослідження показало, що лікування бетаїном може понижувати рівні експресії TLR-4 для обмеження запального процесу [54].

Окрім того, бетаїн може знижувати виробництво ендогенних ушкоджень молекулярних структур (патерни) (DAMP) для інгібування шляху NF-κB. У

висновках можна відмітити, що бетаїн має протизапальну дію, завдяки інгібуванню сигнального шляху NF-κB.

1.3.3 Інгібування активації інфламмасоми NLRP3 бетаїном

Leucine-rich family, а також NLRP3 інфламмасома – це великий цитозольний білковий комплекс, який містить нуклеотид-зв'язаний домен, Leucine-rich вмістимий повтор (NLR) член родини NLRP3, важливу адаптивну молекулу ASC й зрілу каспазу-1. Коли TLR розпізнають DAMPs, чи патоген-асоційовані молекулярні паттерни, NF- κ B стає активований, що сприяє експресії мРНК попередників інтерлейкінів, що мають у складі про-IL-18 й про-IL-1 β , а також NLRP3. Повністю зібрана інфламмасома NLRP3 активує каспазу-1 для опосередкування продукування зрілих IL-1 β і IL-18, які беруть участь в ініціюванні запалення. Важливо вчасно послабити запальні реакції шляхом інгібування активності NLRP3 інфламмасоми.

Попередні дослідження довели, що бетаїн може безпосередньо збільшувати рівень експресії гемоксигенази-1 у гепатоцитах, цей ефект може пригнічувати NLRP3 інфламмасому для захисту від LPS-індукованого й D-галактозамін-індукованого запалення у печінці [38]. Нещодавні дослідження показали, що лікування бетаїном може значно інгібувати пов'язані з NLRP3 інфламмасомними білками, такі як NLRP3 й дозріла каспаза-1, й певні рівні протизапальних цитокінів, включаючи IL-1 β , у дозозалежній формі у моделях NAFLD викликаних фруктозою [14].

Аналогічна ситуація була виявлена у мишей db/db, які оброблені бетаїном; і цей результат показує, що сам механізм пов'язаний із тимусовим фактором транскрипції FOXO-1 – що інгібується тиреодоксин-взаємодіючого білка (TXNIP), який може впливати на продукцію ROS для запуску NLRP3 інфламмасомних складових. Родина FOXO містить шість членів, що включає: FOXO-1 й FOXO-6, які зустрічаються у ссавців. Головна роль цих факторів FOXO заснований на регуляції клітинного росту, клітинній смерті, проліферації, диференціювання й оксидативної стресової відповіді [46].

Активований FOXO-1 підвищує активність TXNIP, який являється ендogenousним інгібітором ROS-рятуючого білку тиоредоксину, що призводить до утворення великої кількості ROS. Окрім того, активований PKB/Akt може фосфорилувати активну форму FOXO-1, щоб викликати її вихід із ядра у цитоплазму; це зміна призводить до інактивації FOXO-1. У даному дослідженні лікування бетаїном збільшило рівні PKB/Akt-опосередкованого фосфорилування FOXO-1. Однак Катирвел та його співробітники відмітили, що бетаїн не активує безпосередньо PKB/Akt, і його механізм може бути результатом посилення інсулінового рецептору субстрата 1 (IRS-1) фосфорилування [30]. Таким чином, ми можемо передбачати, що бетаїн може посилити активність IRS-1 для активації PKB/Akt; а після – активований PKB/Akt інгібує активацію FOXO-1, що у свою чергу обмежує TXNIP для пригнічення компонентів NLRP3 інфламмосом, щоб усунути його протизапальний ефект. Більш того, в одному з досліджень було знайдено, що бетаїн-опосередковане інгібування активації NLRP3 інфламмосоми відіграє більш важливу роль, ніж NF- κ B у відповідь на запалення нирок. Загалом, протизапальні ефекти бетаїну дуже тісно пов'язані з його інгібуванням NLRP3 активації інфламмосоми.

1.3.4 Регулювання бетаїном енергетичного метаболізму для блокування хронічного запалення

Порушення енергетичного обміну можуть призвести до різномісних хронічних захворювань, а у тому числі ожиріння та діабету, які зазвичай супроводжуються системним запаленням низького рівня. Таким чином, відновлення нормального метаболізму являється важливим кроком, що може призвести до зменшення запалення. Як повідомляють різні науковці, бетаїн виявляє вплив як на ліпідний, так і на метаболізм глюкози [52].

Що стосується ліпідного обміну, надмірне накопичення жиру, що виникає у результаті дисбалансу ліпідів, що транспортують синтезу й окислення ліпідів, вважається причиною багатьох захворювань. Багато результатів досліджень показують, що фактори (дієта з високим вмістом жирів, вплив антибіотиків й вживання етанолу) можуть призвести до розвитку ожиріння, інтоксикації антибіотиків, а також отруєння етанолом.

Лікування бетаїном може відновити дисбаланс між синтезом й окисненням, знижуючи накопичення жиру. Сонг та його колеги виявили, що підвищена активність печінкової AMP-активованої протеїнкінази (AMPK) може бути механічно залучена у процес зниження накопичення жиру в організмі [49]. AMPK слугує як основний клітинний датчик енергії, так і як життєво важливим регулятором метаболічного гомостазу в організмі. Багато генів, наприклад такий як стероидний регуляторний елемент-зв'язуючий білок

1c (SREBP-1c), а також ацетил-CoA карбоксилаза (ACC) й синтаза жирних кислот (FAS). Активований AMPK може інгібувати синтез жирних кислот й сприяти окисненню жирних кислот через регуляцію експресії цих генів. Бетаїн може збільшити фосфорилування AMPK й потім пригнічувати активність ACC, а також SREBP-1c й FAS експресію. Цей результат підтверджує результати іншого дослідження у якому AMPK може безпосередньо фосфорилувати SREBP-1c й SREBP-2 на Ser372 для інгібування їх активності задля зниження ліпогенезу й накопичення ліпідів у мишей з інсулінорезистентністю, що викликана дієтою [36]. Окрім цього, активований

AMPK сприяє поглинанню глюкози, завдяки покращенню транслокації транспортеру глюкози типу 4 (GLUT-4); тож ці дані свідчать про сприятливий вплив на інсулінорезистентність. Зміна співвідношення АМР: АТФ у клітинах за нормальних умов сприяє активації AMPK.

Однак активація печінкового AMPK може відбуватись незалежно від співвідношення АМР: АТФ через адипонектин. Цікаво, що в іншому дослідженні науковець Сонг і його команда науковців дослідили, що бетаїн

може відновити аномальні рівні адипокінів при NAFLD, і саме він [бетаїн] підвищував рівень адипонектину й знижував рівень лептину й резистину у жирових клітинах, задля послаблення дисрегуляції ліпідного обміну.

Аналогічні ефекти бетаїну підтверджуються іншим дослідженням *in vitro* у адипоцитах людини [44]. Ці результати припускають, що підвищення рівню адипонектину може посприяти фосфорилуванню AMPK. Також, оскільки ці адипокіни відіграють роль у запаленні, то цей нормалізуючий процес являє собою протизапальним. Окрім активації AMPK, лікування бетаїном може потенційно впливати на інші фактори, що пов'язані з ліпідним обміном.

Мишлі дослідження показали, що бетаїн може зменшити накопичення тригліцеридів у аполіпопротеїні В (apoB)-дефіцитних мишей внаслідок зменшення метилювання пероксисомного проліфератор-активованого рецептору альфа (PPAR α). В іншому дослідженні бетаїн обмежив транскрипцію PPAR γ , завдяки інгібуванню зв'язування FOXO-1 із промотором PPAR γ , щоб зменшити накопичення жиру [17].

У нещодавньому дослідженні не тільки PPAR α , але й печінковий X-рецептор печінки α (LXR α) мав підвищений рівень, саме тоді, коли бетаїн відновлював інгібування окиснення жирних кислот. Хоча, механізмом того, як бетаїн активує LXR α , залишається незрозумілим, він може бути пов'язаний із ферментом PRMT-3, що також зв'язаний із SAM, який може безпосередньо підвищує активність LXR α . Окрім цього, що в дослідженні нефротоксичності, викликаною цисплатином, сам бетаїн інгібував перекисне окислення ліпідів внаслідок придушення ниркової активації тиобарбітурової кислоти-реактивної речовини, яка в основному запускається у нирках, тому ця речовина в основному ініціюється окисидативним стресом. Додатково до змін синтезу й окислення жирів, бетаїн може покращувати транспорт ліпідів. У одному із досліджень було виявлено, що бетаїн підтримує співвідношення SAM : SAH у печінці для підвищення синтезу фосфатидилхоліну й нормалізації продукції ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПНЩ) внаслідок стимулювання

активності PRMT [33, 34]. В іншому дослідженні було виявлено, що бетаїн стимулює експресію гену apoB, для утворення більшої кількості VLDL [21].

Що стосується метаболізму глюкози, то дослідження показали, що резистентність для інсуліну пов'язана напряму із запаленням. У свою чергу

Морган та його колеги знайшли, що добавки бетаїну можуть напряму вплинути на інсуліновий шлях й облегшити перебіг NAFLD [30]. Аналогічний прояв було виявлено в іншому дослідженні діабету II-го типу. В цих

дослідженнях використання бетаїну призвело до зниження рівню ser473-фосфорильованого PKB/Akt, але збільшував фосфорилування IRS-1 і рівень thr308-фосфорильованого PKB/Akt. Отже, PKB/Akt урегульовує системний й клітинний метаболізм, в основному опосередковану проліферацію, диференціацію й виживання клітин, й необхідно для сигналізації інсуліну.

Потім, thr308-фосфорильований PKB/Akt може обмежувати активність FOXO-

1 й глікогенсинтазної кінрази-3 α . Перша речовина може знижувати рівень експресії фосфоенолпіруваткарбоксікінази для зниження печінкового глікогенезу, тоді як друга може прискорювати синтез глікогену. Для того,

щоб перевірити та дослідити, чи зможе бетаїн ініціювати PKM/Akt, автори дослідження використали інгібітор PI3K, вортманін й виявили, що складно знайти активований PKB/Akt; тож ці результати дозволяють передбачити, що саме бетаїн може безпосередньо посилювати фосфорилування IRS-1, але не напряму активувати PKB/Akt.

Сам механізм того, як бетаїн посилює фосфорилування IRS-1 для посилення резистентності до інсуліну залишається невизначеним. Однак, науковець Івасакі та його команда нещодавно сповістили, що PRMT-1 може метилувати гетерогений ядерний рибонуклеопротеїн (hnRNPQ) й може бути залучений у сигналізацію інсуліна [23, 24, 25]. В основі механізму лежить те,

що PRMT-1 може каталізувати приєднання метильної групи від SAM до hnRNPQ; цей процес призводить до інтерналізації довгострокової активації інсулінового рецептору. Цікаво те, що концентрація SAM пов'язані з бетаїном.

Таким чином, ці дані дозволили припустити, що бетаїн може покращити доступний SAM для утворення великої кількості метилювання hnRNP0 через PRMT-1 й, таким чином, активації PKB/Akt. Окрім сигнального шляху IRS-PKB/Akt, науковець Чен і його колеги виявили, що лікування бетаїном може знизити рівні білка X-box-пов'язаного білка-1, білка, що пов'язаний із стресом ендоплазматичного ретикулума, то вірогідно, це посилює p38-MAPK й мішені рапаміцину ссавців, що в кінцевому результаті, зменшить печінковий глюконеогенез й інсулінорезистентність [17].

У результаті, ми прийшли до висновку, що бетаїн має вплив на протизапальну дію через відновлення енергетичного метаболізму. Ці основні метаболічні шляхи й ключові фактори, опосередковане лікування бетаїном за хронічного запалення вказані у Таблиці №2.

Таблиця №2

Основні метаболічні шляхи й гену/білки, на які впливає лікування бетаїном за запальних захворювань

Результати	Головний метаболічний шлях	Ген/білок	Функція гену/білку
Ліпідний метаболізм ↑	AMPK шлях ↑	ACC ↑	Синтез жирних кислот
		FAS ↑	Синтез жирних кислот
		SREBP-1c ↑	Синтез жирних кислот
	Інші	PPARα ↑	Окислення жирних кислот
		PPARγ ↑	Окислення жирних кислот
		LXRα ↑	Окислення жирних кислот
		TGARS ↓	Пероксидація ліпідів
Метаболізм глюкози ↑	IRS-1/Akt шлях ↑	Apo B ↑	Транспортування холестеролу
		IRS-1 ↑	Чутливість до інсуліну
		FOXO-1 ↓	Глюконеогенезис
	Інші	GSK3α ↓	Інгібування синтезу глікогену
		XBP-1 ↓	Глюконеогенезис
		GLUT-4 ↑	Транспорт глюкози

1.3.5 Зниження бетаїном стресу ендоплазматичного ретикулу та апоптозу

Стрес ендоплазматичного ретикулу (ER) викликається аномальною збіркою білків у вигляді неправильних й розгорнутих білків у просвіті ER.

Різноманітні білки, такі як С/ЕВР і гомологічний протеїн (СНОР), а також глюкозорегулюючий протеїн 78 (GRP 78), усі разом пов'язані й беруть участь в ER-стресі, й являються його маркерами. Масивний стрес ER є небажаними й призводить до клітинного апоптозу. Саме апоптоз є одним із видів клітинної

смерті й приймає участь у патогенезі запальних захворюваннях. Хоча апоптоз має екстернальний й інтернальний шляхи, кінцевий процес завершується білками родини каспаз, а саме каспаза-3.

Як уже згадувалось вище, бетаїн може безпосередньо впливати на гомоцистеїн й повідомлялось, що гіпергомоцистеїн може викликати неправильне формування білків, що в кінцевому результаті призводить до стресу ER. Згідно дослідженню науковця Ченга, бетаїн може стабілізувати рівень гомоцистеїну й інгібувати рівні GRP78 й СНОР, а також попередити клітинну смерть [48]. Аналогічним чином, в іншому досліді бетаїн інгібував як

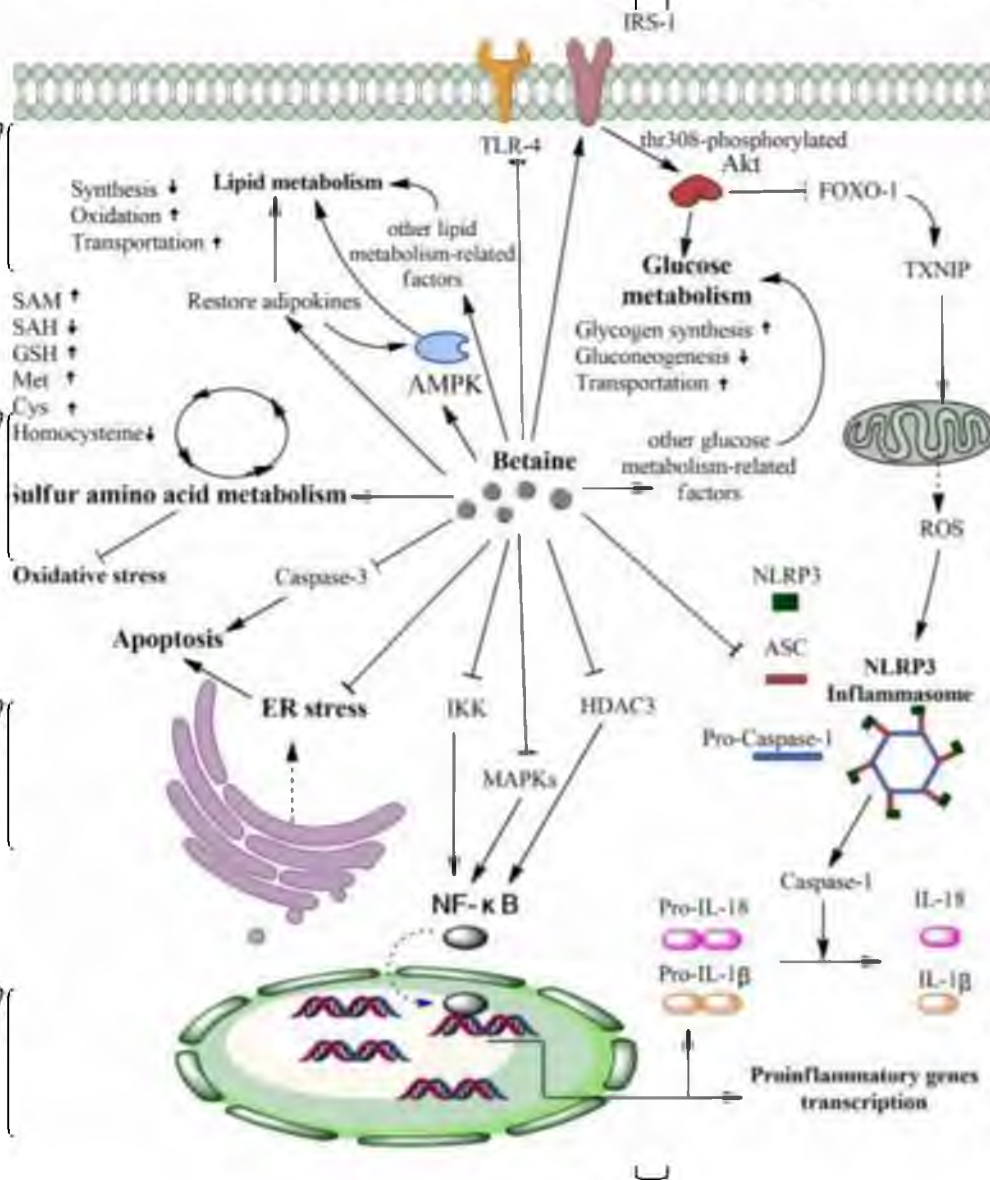
GRP78, так і СНОР, що призводило до зниження активації JNK. Цікаво, що JNK може нап'яму фосфорилувати декілька частин IRS-1, включаючи серії-307. Ці модифікації попереджують стимулюючу дію інсуліну й тирозинове фосфорилування IRS-1, що призводить до інсулінорезистентності. Однак,

окрім стресу ER, бетаїн також інгібує апоптоз. У нещодавньому дослідженні синовіальних фібробластів за рематоїдного артриту, науковець Гаур та його колеги визначили, що транскрипційний фактор-3 (ATF-3), є молекулою, пов'язана з апоптозом, знижується під дією бетаїна [15].

Також, бетаїн може інгібувати білки родини каспаз. У дослідженні *in vitro* додавали аденозин до гепатоцитів збільшувало цитохромний рівень САГ й

активність каспази-3, при чому обидва ці фактори також інгібуються завдяки дії бетаїну. Інгібування каспази-3 бетаїном також спостерігали за індукції цисплатину, та виникаючої внаслідок цього нефротоксичності. Окрім цього

бетаїн значно знижував активність каспази-8, каспази-9 й активність каспази 3/7 в епітеліальних клітинах рогівки людини й MDCK в умовах послаблення стресу ER й апоптозу під впливом бетаїну має важливе значення для його протизапальної дії



Рисунк №2

Головні протизапальні механізми бетаїну.

По-перше, бетаїн може змінювати концентрацію різних сірковмісних амінокислот (SAA), захищаючи метаболізм з SAA від окисдативного стресу.

По-друге, бетаїн може інгібувати діяльність IKK, MAPKs, HDAC3 и Toll-подібного рецептору-4 (TLR-4) для зниження регуляції шляху ядерного фактору-

кВ (NF-кВ) й транскрипції протизапальних генів. По-третє, бетаїн може знижувати рівень експресії компонентів запалення NLRP3 (про-каспаза-1, ASC

й NLRP3) й інгібувати FOXO-1 індуковану NLRP3 інфламмасому завдяки посиленню IRS/Akt шляху. В четвертих, бетаїн значно збільшує активований

AMPK, відновлюють адипокіни, котрі можуть активувати AMPK, й активує інші фактори, пов'язані з ліпідним обміном, для регулювання ліпідного обміну. По-

п'яте, з одного боку, бетаїн збільшує фосфорильований IRS, який фосфорилує Akt на треоніні 308, для покращення метаболізму глюкози. З іншого боку, бетаїн

може впливати на інші фактори, що пов'язані з покращенням метаболізму глюкози. В-шостих, бетаїн може інгібувати каспазу-3 для зниження апоптозу й

відновлення стресу ендоплазматичного ретикулума (ER).

Akt – протеїнкіназа B; AMPK-AMP – активована протеїнкіназа; FOXO-1 – тимусовий фермент O1; TXNIP – тиоредоксин-взаємодіючий білок; ROS –

активні форми кисню; IKK – ядерний фактор-індукована кіназа/IкВ-кіназа;

MAPKs – мітоген активуючий протеїнкіназу; HDAC3 – деацетилаза гістонів 3;

SAM, S-аденозил-L-метіонін; SAH, S-аденозил-L-гомоцистеїн; GSH- глутатіон;

Met – метіонін; Cys – цистеїн.

Висновки з огляду літератури

Бетаїн бере участь у багатьох біохімічних процесах в організмі і має багатобічне фізіологічне значення. Головна функція бетаїну — зниження рівня гомоцистеїну — потенційно токсичного агента. Окрім того, є дані про його нормалізуючий вплив на діяльність травної системи, активізацію ліпідного обміну в печінці, підвищення продукції жовчі і поліпшення її відтоку; гідрохлоридна сіль бетаїну може використовуватись за ахлоргідрії, підвищувати апетит і поліпшувати засвоєння заліза, кальцію, вітамінів. Бетаїн є активатором у синтезі фосfolіпідів клітинних мембран і донором метильних груп у перетворенні метіоніну в гомоцистеїну та завдяки залученню до цих двох реакцій впливає на проміжний метаболізм.

Бетаїн може використовуватися як захисний засіб проти гепатотоксичних речовин, таких як етанол і чотирихлористий вуглець. Введення бетаїну підвищило печінкові рівні S-аденозилметіоніну в контрольній групі тварин, а також у тих, що приймали етанол, і майже повністю попередило виникнення печінкового стеатогенатозу, викликаного етанолом. Забезпечуючи метильні групи для опосередкованого ферментом бетаїн-гомоцистеїн-метилтрансферазою утворення метіоніну і S-аденозилметіоніну в разі інгібування метіонін-синтази, а також у захисті від пастки метилфолієвої кислоти, бетаїн може стати перспективним терапевтичним агентом і можливою альтернативою для коштовних S-аденозилметіонінів під час лікування захворювання печінки та інших розладів.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

Дослідження були проведені в лабораторії культури клітин, ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для проведення досліджень було використано наступне обладнання: шкаф-ламінар (LS, ламінарні системи), CO₂-інкубатор (Medcenter Einrichtungen GmbH MMM-Group), магнітна мішалка для виділення первинної культури колоноцитів, термостат з температурними режимами 37°C та 56°C, інвертований мікроскоп Axio Vert-40 з програмним забезпеченням Axio Vision (Carl Zeiss), світловий мікроскоп (Carl Zeiss), шейкери, електронні ваги та пластиковий посуд: флакони, мультилункові планшети (Nunclon, Данія). Візуалізацію отриманих результатів проводили на спектрофотометричному мультилунковому сканері (Labsystems Multiscan MS) при довжині хвилі 540-570 нм. Фотографування препаратів клітин проводили з використанням цифрової фотокамери Digital Still Camera з об'єктивом Carl Zeiss Vario-Sonar (100-, 200-, 320-кратне збільшення).

2.2. Клітинна лінія

Дослідження проводили на клітинній лінії ендотелію аорти свині PAE.

Клітини культивували у середовищі DMEM («Sigma», США) з додаванням 10 % FBS («Sigma», США), 2 мМ L-глутаміну, 40 мкг/мл гентаміцину при температурі 37°C у вологій атмосфері (100%) з 5 % CO₂. Для культивування клітин використовували стерильні 96-лункові планшети, 6-лункові планшети, 25 см² флакони, 10 та 6 см чашки Петрі («Nunclon», Данія).

2.3. Виділення клітин з культури

Відбирали середовище із клітинами з флакону для інкубування в центрифужні пробірки. Центрифугували 10 хвилин за 1500 об/хв. Осад розчиняли в 1мл фізіологічного розчину. Клітини підраховували в камері Горяєва.

Надосадову рідину (середовище інкубації) відбирали у мікропробірки для подальшого визначення рівня глюкози, каталазної активності ТБК активних продуктів

2.4. Рутинний підрахунок клітин у камері Горяєва

Кількість клітин підраховували за допомогою прямого методу рутинного підрахунку в камері Горяєва та одночасно визначити життєздатність клітин методом включення барвника (трипановий синій). Живі клітини непроникні для барвника, а мертві проникні, тому зафарбовуються. Камери складаються із товстого предметного скла з нанесеними вигравіруваними на них сітками. По обидві сторони від площадки з сіткою розміщені полоси, вищі на 0.1 мм від площадки із сіткою, які призначені для притирання покривного скельця до появи кілець Ньютона. Після притирання скла утворюється камера закрита з бокових сторін та щілинами, які використовуються для заповнення камери зависом клітин. Принцип поділу камери Горяєва полягає в наступному. Вона складається із 225 великих квадратів із стороною, рівною 1/20 мм. Кожен із великих квадратів поділений на 16 маленьких квадратів із стороною, рівною 1/400 мм. Технічні характеристики камери Горяєва: зазор 0,1 мм; сторона малого квадрату $0,05 \pm 0,001$ мм, площа $-0,0025$ мм², об'єм $-0,00025$ мм³ (мкл); сторона великого квадрату $0,2 \pm 0,0015$ мм, площа $-0,04$ мм², об'єм $-0,004$ мм³ (мкл); сторона сітки $3 \pm 0,005$ мм, площа сітки -9 мм², об'єм камери $-0,9$ мм³ (мкл).

Перед роботою предметне скло камери та шліфоване покривне скло добре промивають під водопровідною водою, прополіскують дистильованою водою та

втирають насухо. Потім покривне скло притирають до камери до появи радужних «ньютонівських» кілець.

Первинні культури, або клітини відібрані після культивування відцентрифугувати при 1000g протягом 10 хвилин. Осад ресуспендувати в 1 мл фосфатно-сольового буферу, або розчину Хенкса. Відібрати аліквоту в 50 мкл та додати 50 мкл 0,4 % розчину барвника трипанового синього (до кінцевого вмісту барвника в розчині 0,2%). Після профарбовування протягом 5 хв, клітини ретельно перемішати та внести пастеровською або автоматичною піпеткою в притерту покривним склом камеру Горяєва. Надлишок розчину видалити фільтрувальним папером.

Необхідно порахувати клітини під об'єктивом х10. При достатній щільності клітин провести підрахунок в чотирьох наборах із 16 маленьких квадратів (в кожному куті центральної заштрихованої області). Порахувати спочатку лише незабарвлені клітини. Розділити отримане число на 4, отримаємо середнє число клітин на 1 мм². Так як висота камери становить 0,1 мм, отже коефіцієнта перерахунку для гемоцитометра становить 10⁴. Отже, загальна формула для підрахунку клітин в камері Горяєва наступна:

$$X=(a*4000*b)/b$$

де X – кількість клітин в 1 мм²; a – сума клітин, порахованих певному об'єму камери; b – кількість порахованих малих квадратів; в – розведення клітинної суспензії

Для визначення життєздатності клітин, що аналізуються, необхідно порахувати зафарбовані клітини 0,4% розчином трипанового синього, приготованого на фосфатно-сольовому буфері. Для визначення кількості живих клітин аліквоту суспензії (~40мкл) змішували з рівною кількістю 0,4% розчину барвника. Декілька мікролітрів суміші вносили під покривне скельце камери Горяєва. Кількість “квадратів”, в яких підраховуються клітини залежить від щільності клітинної культури та від точності, яка необхідна (краще рахувати не менше 40-50 клітин).

Якщо є необхідність визначення точної концентрації (наприклад при побудові кривої росту клітинної популяції), то процедуру підрахунку клітин слід повторити декілька разів, проводячи відповідно концентрування суспензії клітин, або її розведення. Для концентрування клітин використовується процедура їх центрифугування з наступним розведенням в меншому об'ємі буферу або середовища культивування; для розведення суспензії клітин відбирається аліквота і проводиться її кратно розведення певним буфером або культуральним середовищем.

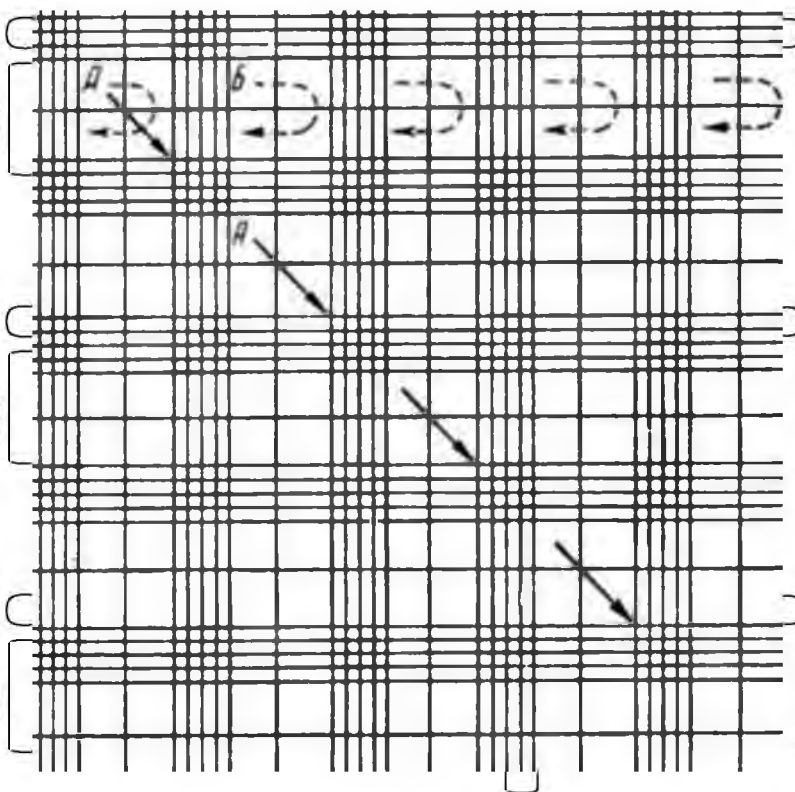
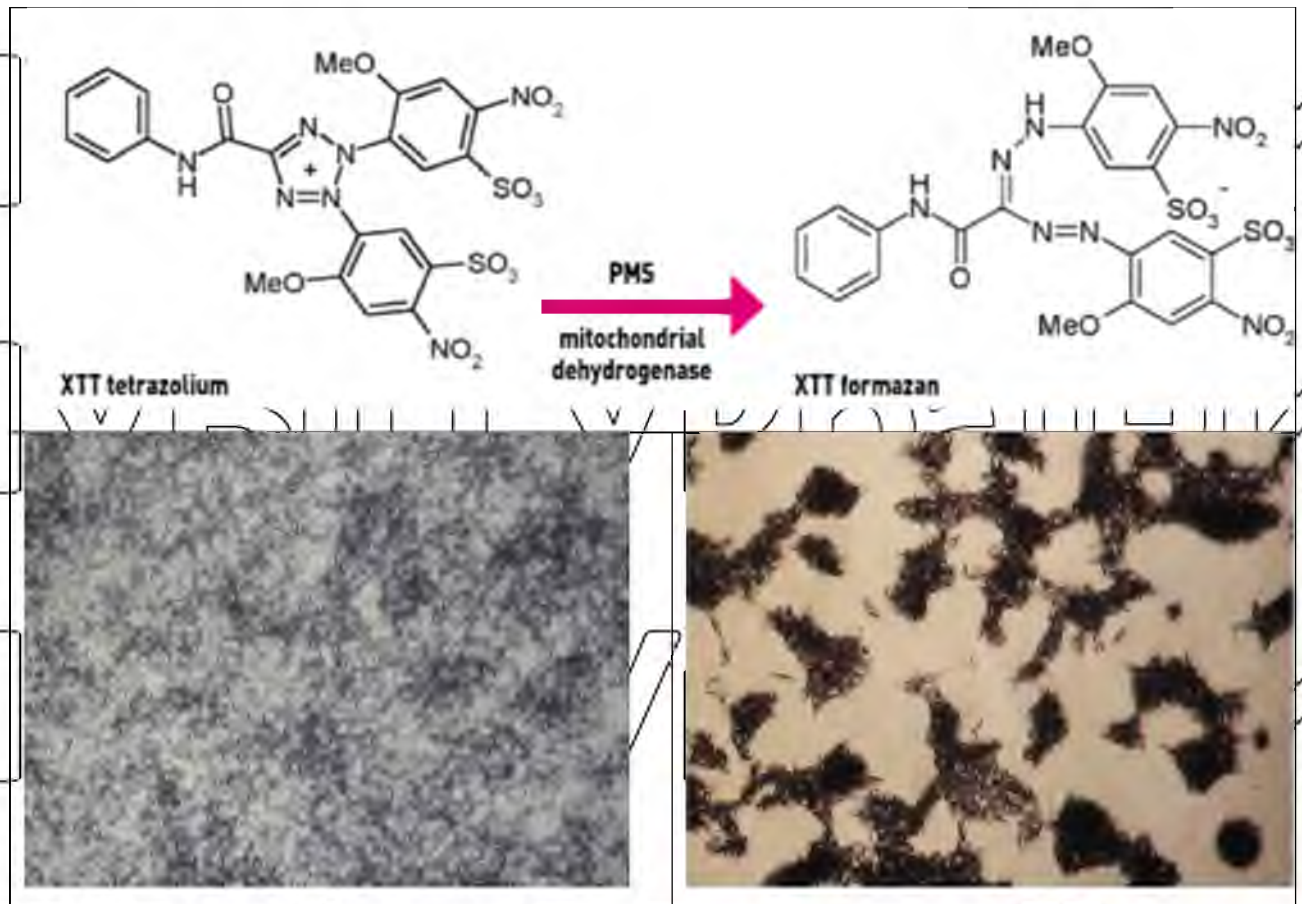


Рис 2.1. Сітка камери Горяєва

2.5 МТТ-колориметричний метод оцінки кількості живих клітин за активністю мітохондріальних дегідрогеназ клітин

МТТ-тест – це непрямий метод визначення проліферативних показників культивованих клітин асоційованих з активністю їх мітохондріальних дегідрогеназ, та цитотоксичного/цитостатичного впливу на клітини *in vivo* [5, 39]. Даний метод заснований на вимірюванні активності мітохондріальної

дегідрогенази, що здатна відновлювати безбарвний водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразоліум бромід (МТТ) у формазан, який кристалізується у середині клітини і має забарвлення від світло-фіолетового до рожевого кольору. (рис.2.2).



При цьому кількість утвореного формазану прямо пропорційна активності мітохондріальних ензимів живих клітин. Тому за інтенсивністю забарвлення розчину можна робити висновки про кількість живих клітин, а також активність мітохондріальних ензимів. Для цього у плоскодонний 96-лунковий планшет вносили завчасно приготовлений 10-кратний розчин МТТ (Sigma, США) (20 мкл МТТ на 200 мкл інкубаційного середовища із розрахунку 5 мг/мл фосфатно-сольового буферу) та інкубували за тих же умов протягом 3-х годин. Після фіксації реактиву живими клітинами та його перетворення в кристали формазану планшет центрифугували при 1500 об/хв. 5 хв.

Після центрифугування планшету видаляли супернатант. Для розчинення

кристалів формагану у кожну лунку додавали 100 мкл органічного розчинника ДМСО (Serva, Чехія) та інкубували протягом 15 хвилин при 37°C. Після розчинення барвника в ДМСО вимірювали величину оптичного поглинання розчину (E) за допомогою мультилункового спектрофотометра при довжині хвилі 540 – 570 нм (E540 – E540) з референтною довжиною хвилі 620 нм. Вимірювання повторювали 2-3 рази, отримані результати усереднювали. Отримані результати інтерпретували у вигляді кривих росту, вказуючи початкову концентрацію висіяних клітин, або залежність оптичного поглинання клітин в колориметричному визначенні в певному часовому інтервалі в залежності від концентрації клітин у лунці.

2.6. Визначення адгезивних властивостей культивованих клітин за забарвленням фіолетовим кристалічним

При фарбуванні ендотеліальних клітин, адгезованих на планшетах, використовували вітальний барвник фіолетовий кристалічний [43]. Оцінку швидкості прикріплення клітин до субстрату за модифікації досліджуваними речовинами здійснювали на високоадгезивному субстраті – 96-лункових планшетах (Falcon, США). Для цього клітини через рівні проміжки часу вносили в лунки та фіксували концентрацію клітин після їх зафарбовування (1% водним розчином кристалічного фіолетового упродовж 5 хв при кімнатній температурі) за колориметричним показником при довжині хвилі 570 нм на спектрофотометричному мультилунковому сканері (Labsystems Multiscan MS). Вимірювання повторювали 2-3 рази, отримані результати усереднювали та інтерпретували у вигляді кривих росту, вказуючи початкову концентрацію висіяних клітин, або залежність оптичного поглинання клітин в колориметричному визначенні в певному часовому інтервалі в залежності від концентрації клітин у лунці.

2.7. Визначення рівня глюкози у середовищі інкубації клітин

Визначали концентрацію глюкози у середовищі культивування клітин за допомогою глюкозооксидазної реакції, яка базується на окисненні глюкози ферментом глюкозооксидазою (з використанням кисню повітря) до глюконової кислоти та перекису водню як описано [42]. У присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназолом з утворенням хіноніміна червоно-фіолетового забарвлення.

Відібрали по 20 мкл середовища, в якому інкубувались клітини, у пробірку, додавали 500 мкл буферного розчину та 500 мкл ензимів. Для калібрувальної проби використовували чисте середовище для культивування клітин. Ретельно перемішали вміст пробірок та витримали 12 хвилин при температурі +37°C.

Потім перенесли по 200 мкл кожної проби на 96-лунковий планшет. Виміряли оптичну щільність калібрувальної та дослідних проб з використанням спектрофотометра при довжині хвилі $\lambda=500$ нм.

Розраховували концентрацію глюкози за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 10,0, \text{ де}$$

C – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л;

10,0 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л;

E_{досл} – оптична щільність дослідної проби;

E_{кал} – оптична щільність калібрувальної проби.

2.8. Визначення загального білка у культурі клітин

Визначали загальний білок за допомогою набору реактивів ТОВ «Філісіт-діагностика».

Принцип методу заснований на тому, що білки реагують з орто-фосфорною кислотою в лужному середовищі з утворенням сполук фіолетового забарвлення.

(біуретова реакція) Інтенсивність забарвлення реакційного розчину прямопропорційна концентрації білків в аналізованій пробі.

В пробірці вносили по 20 мкл дослідної проби. В пробірку, яка була калібрувальною пробою вносили 20 мкл калібрувального розчину. В пробірці за дослідними та калібрувальними пробами додавали по 1 мл біуретового реактиву.

Змішали, витримали 30 хв. при кімнатній температурі (від плюс 18 °С до плюс 25 °С). Виміряли оптичну щільність при довжині хвилі 540 нм для калібрувальної та дослідних проб проти холостої проби.

Розрахунок концентрації загального білку проводили за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 50, \text{ де}$$

C - концентрація загального білку в дослідній пробі, г/л;

50 - концентрація загального білку в калібрувальному розчині, г/л;

Edoc - оптична щільність дослідної проби, одиниці оптичної щільності;

Ecal - оптична щільність калібрувальної, одиниці оптичної щільності.

2.9. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду)

в культурі ендотеліальних клітин

При температурі кипіння у кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи при цьому забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм.

Отриманий біологічний матеріал у кількості 100 мкл (концентрація білка - 5 мг/мл), доводили об'єм до 500 мкл фізіологічним розчином. Додавали до суміші 200 мкл 17 % ТХО, в контрольну пробірку додавали лише 500 мкл фізіологічного розчину. Після осадження білків проводили центрифугування проб при 1500 об/хв на протязі 15 хвилин. Супернатант відбирали у кількості 500 мкл і додавали 250 мкл 0,8 % ТБК. Після вортексування проби інкубували у киплячій водянній бані в пробірках з притертими пробками на протязі 10 хвилин для розвитку забарвлення. Вміст МДА визначали на спектрофотометрі при $\lambda=532$ нм.

НУБІП України

Концентрацію МДА (ТБК-активні продукти) розраховували за формулою:

$$C = D \cdot 7,5 / 1,56, \text{ де}$$

C – концентрація МДА, мкмоль/л;

D – оптична густина;

7,5 – розведення; 1,56 – молярний коефіцієнт екстинкції МДА [1].

НУБІП України

2.10. Визначення активності каталази

НУБІП України

Активність каталази в клітинах визначали за М. А. Королук і співавт.

[3]. Каталазну активність розраховували порівнянням вмісту пероксиду водню у

пробі на початку реакції та після її припинення. Для цього готували дві проби –

нульову і дослідну. Клітинний лізат готували гомогенізуванням у фізіологічному

розчині (буфер Хенкса / 0,05М трис-НСІ (рН=7,8)) у співвідношенні 1:3. До 25

мкл білкового екстракту (0,025 мг білка) додавали 0,5 мл реакційного буферу, що

містив 0,03% H_2O_2 , та інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Зупиняли

реакцію додаванням 0,5 мл 4 %-го розчину молібдату амонію $(NH_4)_2 Mo_7O_{24}$.

Суміш із додаванням замість білка 0,025 мл дистильованої води інкубували із

реакційною сумішшю 10 хв при кімнатній температурі та зупиняли реакцію

додаванням 0,5 мл 4 %-го розчину молібдату амонію $(NH_4)_2 Mo_7O_{24}$ (нульова

точка). Інтенсивність забарвлення вимірювали на рідері (BioTek, США) при

$\lambda=410$ нм проти контрольної проби (нульова точка).

НУБІП України

НУБІП України

2.11 Оцінка морфологічних характеристик

Визначення морфологічних характеристик за дії аскорбінової кислоти та

лізоциму гідрохлориду проводили на клітинах лінії PAE (аортальні

ендотеліальні клітини свині). Для цього до клітин, які знаходились в 50-60%

моношарі додавали різну концентрацію бетаїну. Через 24 години культивування

НУБІП України

відбирали середовище культивування, промивали двічі фосфатно-сольовим буфером та фіксували 95% етанолом протягом 30 хвилин. Потім відбирали етанол, підсушували клітини та фарбували барвником фіолетовим кристалічним 20 хвилин за температури 37° С.

Оцінку морфологічних параметрів та візуалізацію клітинних популяцій проводили з використанням інвертованого мікроскопу AxioVert (Carl Zeiss), обладнаного програмним забезпеченням AxioVision. Фотозйомку клітинних препаратів проводили з використанням цифрової фотокамери Digital Still Camera з об'єктивом Carl Zeiss Vario-Sonar.

2.12. Статистична обробка отриманих даних

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми «STATISTICA 8.0». Вірогідність відмінностей між показниками контрольної та дослідних груп визначали за критеріями Стьюдента та Фішера. Рівень достовірності приймали при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення ефективності бетаїну як проангіогенного фактору проводили на клітинах ендотелію свині лінії PAE. Ці клітини є іморталізованими, продукують аутокринно різні біологічно активні фактори, переносять 6-8 пасажів при реконсевації з рідкого азоту. Термін подвоєння клітин становить 27 ± 4 години. Ці клітини також використовуються як модель для визначення механізмів диференціювання за впливу різних природних та синтетичних речовин [41].

Ендотеліальна функція й дисфункція пов'язані із процесами запалення, розвитком серцево-судинних захворювань, які включають регуляцію судинного тонусу, створення бар'єру, трансміграцію лейкоцитів, згортання крові й ангіогенез в цілому [8, 38, 50]. Тому, визначення впливу різних препаратів на клітини судин визначає їх придатність та ефективність як проангіогенних чинників. Отже, важливою мішенню бетаїну як модулятора метаболічних дисфункцій можуть бути ендотеліальні клітини, оцінка впливу на які цієї біоактивної речовини і було обрано за мету даного дослідження.

3.1. Визначення виживаності ендотеліальних клітин при зафарбовуванні трипановим синім за дії бетаїну

Для визначення бетаїну на виживаність ендотеліальних клітин проводили його скринінг в діапазоні концентрацій 0.125-4 мг/мл. Для цього до клітин лінії PAE (свинячий аортальний ендотелій), адаптованих в стандартних умовах культивування в середовищі RPMI-1640 з 10% FBS додавали бетаїн та культивували 24 години. Після кінцевого терміну, клітини відкріпляли від субстрату, центрифугували, осад розчиняли в фосфатно-солевому буфері додавали 0.4% розчин трипанового синього та прораховували концентрацію клітин та співвідношення живих та мертвих клітин (рис 3.10)



Рис.3.1 Типові фото підрахунку клітин ендотелію в камері Горяєва в контролі та при додаванні бетаїну (x100)

Токсичних та антипроліферативних ефектів під впливом бетаїну для клітин ендотелію не зафіксовано (табл.3.1). При зафарбовуванні трипановим синім у присутності 0.5 мг/мл та 1 мг/мл бетаїну зафіксовано збільшення концентрації ендотеліоцитів в порівнянні з контролем (таблиця 3.1). Подібні дані було виявлено в дослідженнях інших авторів [14].

Таблиця 3.1

Концентрація клітин лінії PAE та відсоток мертвих клітин за дії бетаїну.

	4 мг/мл	2 мг/мл	1 мг/мл	0.5 мг/мл	0.125 мг/мл	контроль
Концентрація клітин (x1000)	56.2±8.9	71.3±11.7	85.5±4.8*	78.4±3.4	64.6±11.0	69.4±5.7
% мертвих клітин (PAE)	2.3±0.4	8.4±4.2	4.9±1.6	2.3±0.6	6.4±1.2	3.5±0.6

*-P<0.5, порівняно з контролем

Як слідчать наведені дані, концентрація клітин під впливом бетаїну не відрізнялась від контролю, і більше того, при інкубації клітин з 1 мг бетаїну зростала порівняно з контролем в 1.2 рази ($P < 0.5$). Також відсоток мертвих клітин за всіх досліджуваних концентрацій практично не відрізнявся від контролю.

3.2. Визначення активності мітохондріальних ензимів в МТТ-тесті під впливом бетаїну

При тестуванні впливу бетаїну на ендотеліальні клітини в МТТ-тесті виявлено подібну тенденцію, як і при рутинному підрахунку в камері Горяєва. Оптичне поглинання за більшості концентрацій бетаїну в середовищі культивування клітин ендотелію не відрізнялось від оптичного поглинання в контролі (рис.3.2, а). Інкубація з бетаїну в концентрації 2 мг/мл бетаїну призводила до збільшення оптичного поглинання в МТТ-тесті порівняно з контролем на 26% (рис 3.2, б) та незначне зростання даного показника при додаванні бетаїну в концентрації 4 мг/мл та 1 мг/мл.

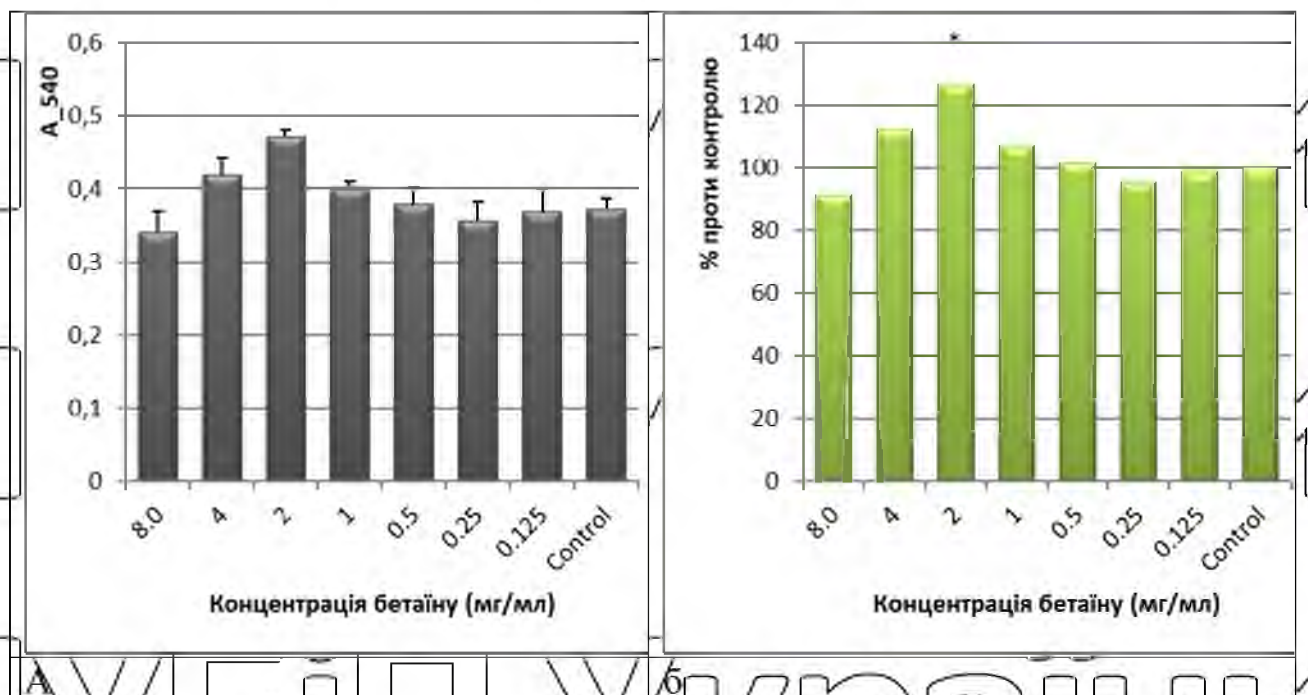


Рис.3.2. Гістограми оптичного поглинання клітин ендотелію (а) та відсоток оптичного поглинання порівняно з контролем (б) за дії бетаїну визначені в МТТ-тесті.

Оскільки МТТ-тест засновано на відновленні солі 3-(4,5- диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразолум броміду до кристалів формазану мітохондріальними ензимами живих клітин (переважно сукцинатдегідрогеназою), то даний біохімічний метод є показовим щодо активності мітохондріального дихання під дією різних факторів [36, 47]. Тому, наступним етапом нашого дослідження було визначення активності мітохондріальних оксидоредуктаз у розрахунку на одиницю живих клітин за дії бетаїну. Отримані дані вказують на підвищення даного показника відносно контролю за концентрації 1 та 4 мг/мл бетаїну, тоді як зі зменшенням концентрації речовини показники активності мітохондріальних ензимів не змінювались (табл.3.2, рис.3.2 (а)). Як свідчать наведені дані, за концентрації бетаїну 4 мг/мл та 2 мг/мл в середовищі інкубації клітин ендотелію активність мітохондріальних ензимів у оптичних одиницях у розрахунку на одиницю живих клітин збільшується в 1.4 та в 1.3 рази ($P < 0.05$), відповідно, порівняно з показником в контролі (табл.3.2).

Таблиця 3.2
Концентрація живих клітин, активність мітохондріальних ферментів як функція відновлення формазану ендотеліоцитами за дії бетаїну

Концентрація бетаїну в середовищі культивування	4 мг/мл	2 мг/мл	1 мг/мл	0.5 мг/мл	0.125 мг/мл	контроль
Концентрація живих клітин (x1000)	54.9±3.7	65.3±4.9	81.3±3.6	76.6±5.5	60.5±4.2	67.0±4.2

Ас 540/1000						
живих клітин	7.6×10^{-3} *	7.2×10^{-3} *	4.9×10^{-3}	5.0×10^{-3}	6.2×10^{-3}	5.5×10^{-3}

*-p<0.05, проти контролю

За концентрацій бетаїну 0.125, 0.5 та 1 мг/мл показники оптичного поглинання у розрахунку на 1000 живих клітин не змінювались порівняно з контролем.

3.3. Визначення поглинання глюкози ендотеліоцитами за дії бетаїну

Наступним етапом дослідження було тестування впливу бетаїну на рівень поглинання глюкози культивованими клітинами. Оскільки, для глюкози властиве швидке проникнення через клітинну мембрану за градієнтом концентрації, утилізація зі швидким утворенням енергії, в тому числі за відсутності кисню, то визначення рівня поглинутої глюкози є маркерним показником їх метаболізму. Метод базується на використанні глюкозооксидазної реакції - окисненні глюкози ферментом глюкозооксидазою з використанням кисню повітря до глюконової кислоти та перекиєву водню, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміна червоно-фіолетового забарвлення, що визначається спектрофотометрично.

При визначенні поглинання глюкози клітинами за різних концентрацій бетаїну збільшення даного показника відносно контролю виявлено за концентрацій 0.125 мг/мл та 1 мг/мл, а при концентрації 4 мг/мл концентрація поглинутої глюкози зменшувалась (табл. 3.3).

Таблиця 3.3
Рівень поглинутої глюкози ендотеліоцитами за дії бетаїну

Концентрація бетаїну в середовищі культивування	4 мг/мл	2 мг/мл	1 мг/мл	0.5 мг/мл	0.125 мг/мл	контроль
Концентрація живих клітин (x1000)	54.9±3.7	65.3±4.9	81.3±3.6	76.6±5.5	60.5±4.2	67.0±4.2
Рівень глюкози /1000 клітин (пкМ)	5.1±0.2	4.4±0.7	7.4±0.1*	5.5±0.4	7.6±0.3*	4.9±0.4

*-p<0.05, проти контролю

Така тенденція, щодо змін рівня поглинутої глюкози – зменшення при найвищій концентрації бетаїну, може бути пов’язана з впливом на процеси осмосу бетаїну [19].

3.4. Визначення активності каталази, ТВК-активних продуктів та SH-груп в клітинах ендотелію за дії бетаїну

Для визначення показників антиоксидантної системи: каталази та активності ТВК-активних продуктів та SH-груп клітини лінії PAE культивували в 12-лункових планшетах та додавали бетаїн в концентрації 2 мг/мл на 24 години.

По закінченню терміну інкубації клітини знімали із субстрату, визначали рівень білку та вищенаведені показники у розрахунок на мг білку. Як свідчать наведені дані каталазна активність зростала (рис. 3.3,а), тоді як рівень SH-груп знижувався (рис.3.3, б), а ТВК-активні продукти практично не відрізнялись від контролю (рис. 3.3 в)

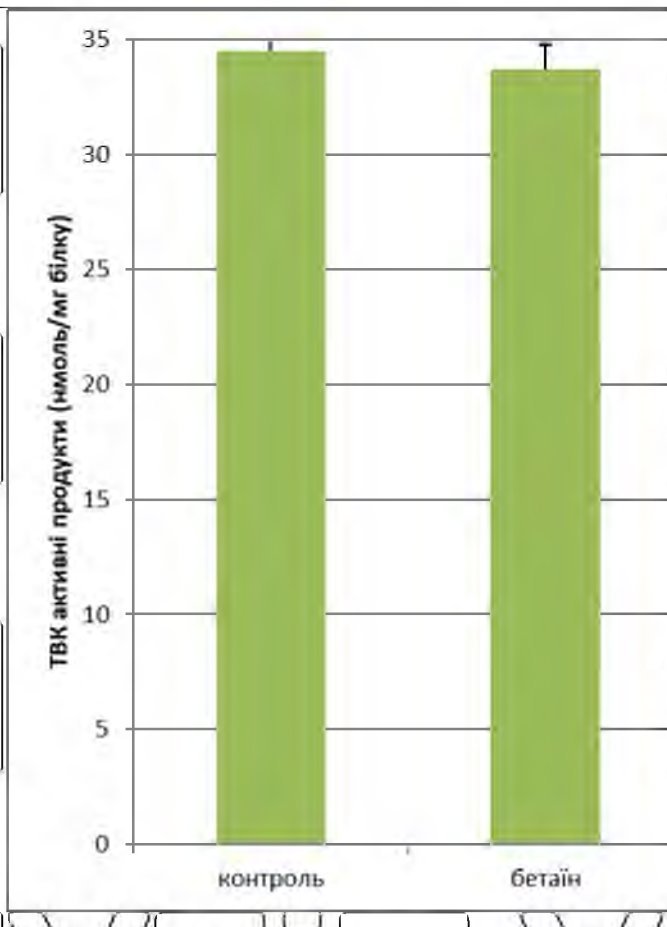
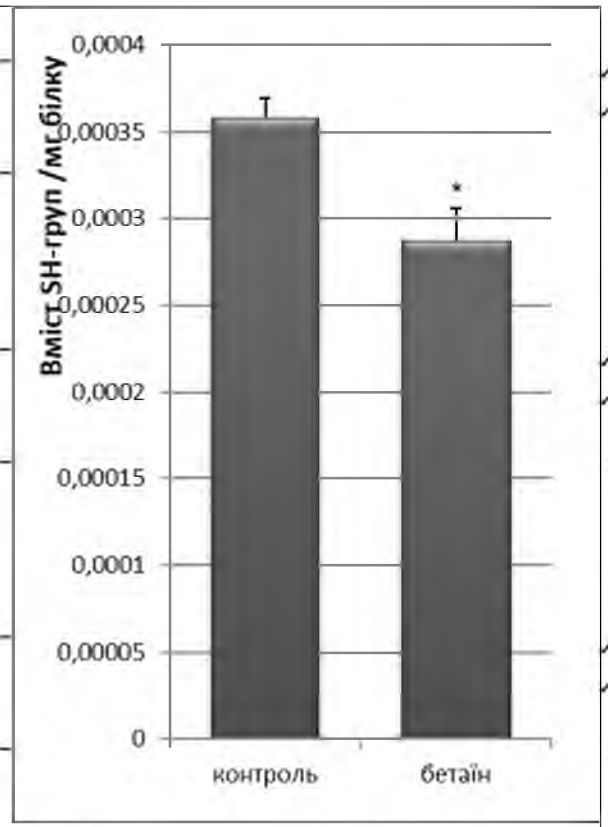
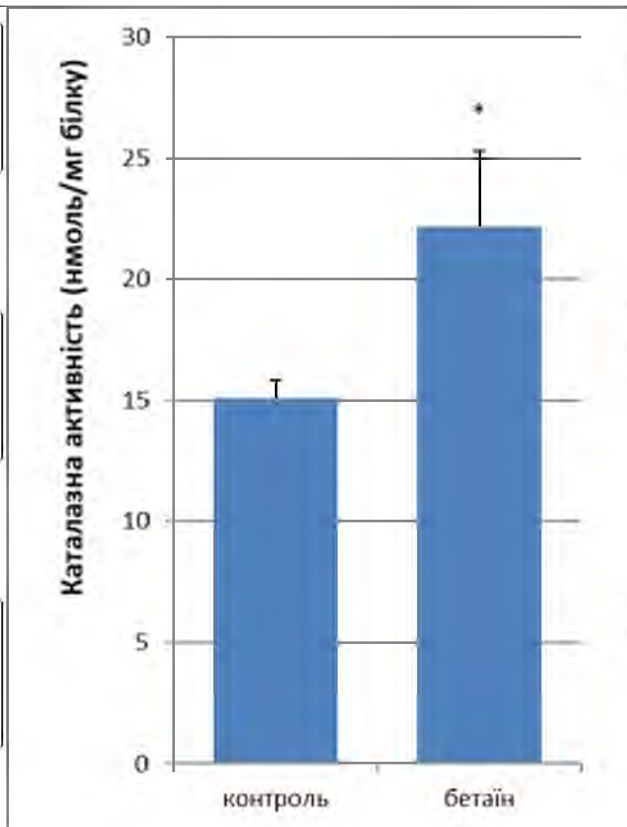


Рис.3.3 Рівень каталазної активності ТВК-активних продуктів та SH-груп в клітинах ендотелію за дії бетаїну

України
України
України

Таким чином визначення основних показників антиоксидантного захисту вказує на нормалізацію бетаїном даних показників. Клітини в нормі синтезують активні форми кисню АФК – це не лише радикали, але й черадикальні молекули з високою реакційною здатністю. До найважливіших вільних радикалів належать гідроксил, супероксид-аніон радикал, азотвмісні радикали (діоксид і монооксид азоту), пероксид. Інші сполуки – пероксинітрит, гіпохлорна кислота, пероксид водню, синглетний кисень, озон, нітритна кислота, триоксид дінітрогену не є вільними радикалами, але легко спричиняють вільнорадикальні реакції в живому організмі. Серцево-судинна система в значній мірі залежить від вільнорадикальних реакцій [4].

Тому, пригнічення надмірного утворення АФК в ендотелії може бути одним із механізмів нормального обміну речовин через ендотеліальний бар'єр.

3.5. Визначення морфологічних характеристик клітин ендотелію свині за дії бетаїну

Фіксацію морфологічних особливостей ендотелію свині в культурі проводили з використанням інвертованого мікроскопу Axio Vert-40 з програмним забезпеченням AxioVision. Для цього клітини відфотографували в реальному часі в стерильних умовах та після фіксації клітин і забарвлення адгезованих клітин фіолетовим кристалічним. За дії бетаїну при культивуванні ендотелію протягом 2 діб фіксували деякі відмінності від аналогічного контролю. морфологічні відмінності клітин від аналогічних в контролі (рис.3.4, 3.5), а саме - видовженість клітин (1), більше відростків (2), а також формування структур, що мали ознаки прокапілярних (3) (рис 3.5)

Як видно з наведених фото (рис.3.4) під впливом бетаїну проявлялись більш закріплені на субстраті та розпластані клітини. На рис. 3.5 наведено типово фото з видовженими клітинами та ознаками формування прокапілярних структур.

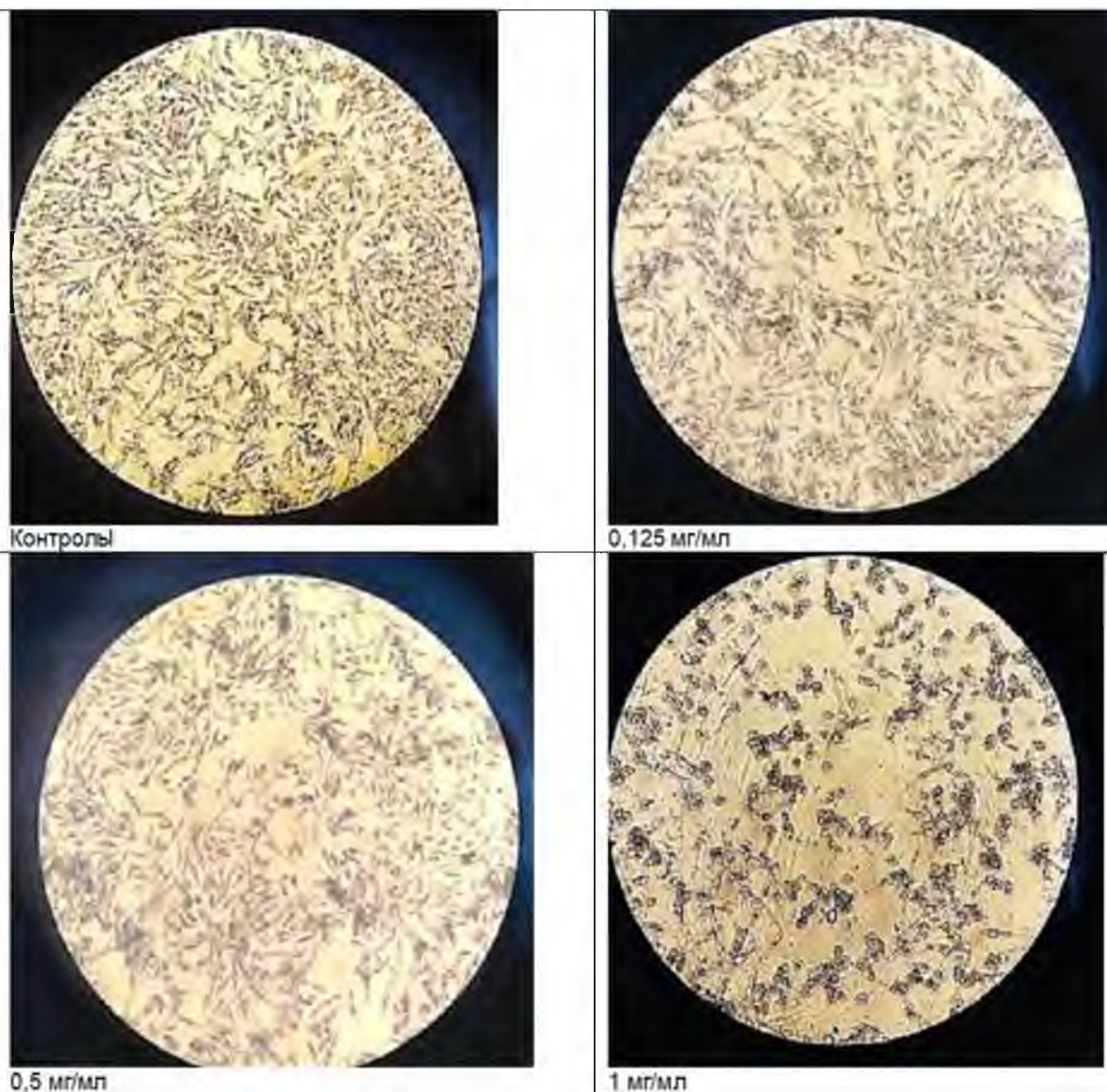


Рис.3.4. Типові фотс клітин PAE під впливом бетаїну X50.

За концентрації бетаїну 1 мг/мл спостерігали формування 3D структур, що може бути ознаками морфогенезу в культурі за дії осмолітика – бетаїну.

На рис. 3.5 представлені виділені локуси з типовими відмінностями від контролю.

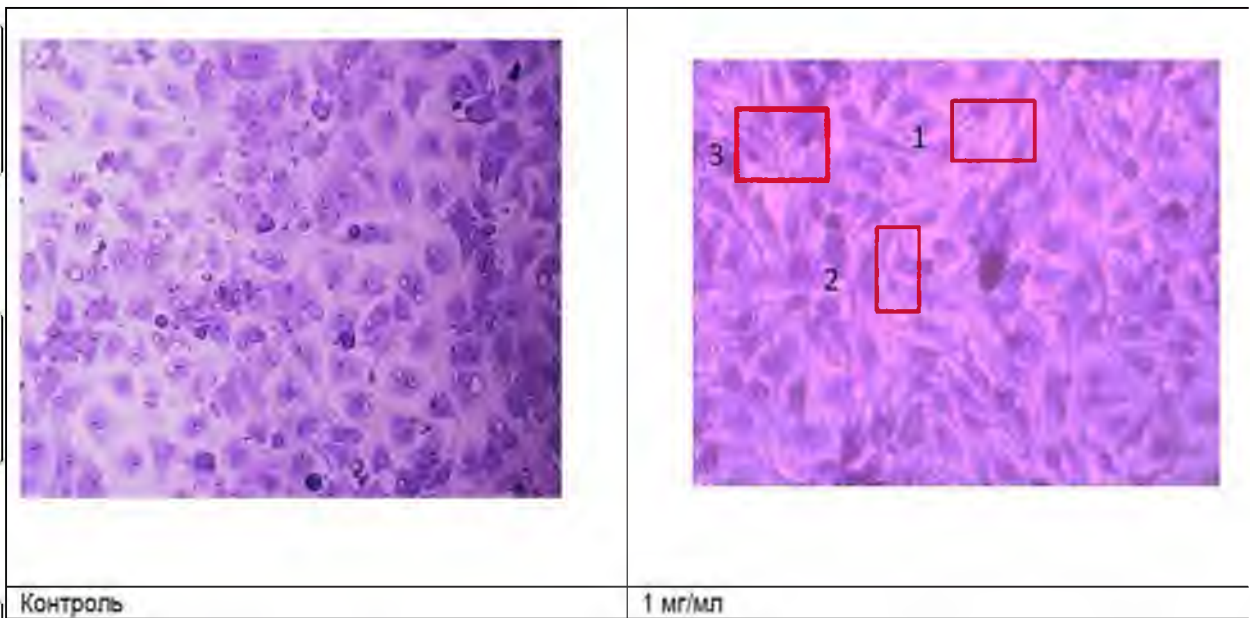


Рис. 3.5 Морфологічні особливості ендотеліальних клітин за впливу бетаїну (рис. 2А, x50); фарбування кристалічним фіолетовим барвником (рис.2Б x200)

Таким чином порівнюючи отримані нами результати з літературними даними інших авторів [13, 46, 51] бетаїн або його похідні можуть слугувати своєрідними заміниками протизапальним антицитокіновим препаратам для стабілізації ендотелію. У попередніх дослідженнях [29] за застосування біопротекторних речовин (бетаїну та протеїновмісних добавок, збагачених мінералами у хелатованій формі) на тваринних моделях алкогольної інтоксикації виявлено відновлення активності маркерних ферментів ушкодження печінки та нормалізацію окисно-відновних процесів й інтенсивності трансамінування. Враховуючи результати впливу бетаїну на ендотеліоцити, а саме: посилення росту й розмноження клітин, підвищення рівня їх виживання, збільшення активності мітохондріальних ферментів, необхідні подальші дослідження на клітинних і, можливо, тваринних моделях з ангіогенез-опосередкованим та імуномодуляторним механізмом.

3.6 Визначення економічної ефективності даних досліджень

В структурі клінічних та преклінічних досліджень в біомедицині та ветеринарній медицині широко впроваджуються альтернативні методи тестування біопрепаратів. Експрес -тестування проводиться на культивованих клітинах різного походження. В нашому дослідженні для визначення активності біопрепарату бетаїну було обрано клітини аортального ендотелію свині лінії РАЕ.

Отримані нами результати вказують на спрощену систему тестування, економічну ефективність, яка досягається меншими видатками на реактиви та експериментальні тварини, а також визначенням основних показників функціонування ендотеліальних клітин як основної мішені ангиогенезу за дії біопрепарату бетаїну.

ВИСНОВКИ

Згідно аналізу експериментальних даних щодо впливу бетаїну на ендотеліальні клітини свині лінії PAE нами отримано результати, що свідчать про нормалізуючий ефект бетаїну на проліферативні та метаболічні показники

1. Не виявлено токсичних ефектів бетаїну на клітини аортального ендотелію свині

2. Зафіксовано збільшення концентрації ендотелоцитів у порівнянні з контролем за його рівня 0,5 мг/мл та 1 мг/мл при фарбуванні трипановим синім;

3. У МТТ-тесті продемонстровано зростання оптичного поглинання внаслідок відновлення формагану мітохондріальними ензимами живих клітин в межах його концентрацій 1-4 мг/мл та відмічено підвищення активності мітохондріальних оксидоредуктаз у розрахунку на одиницю живих клітин;

4. За концентрації бетаїну 0,125 мг/мл та 1 мг/мл виявлено достовірне зростання поглинання глюкози клітинами;

5. При визначенні деяких показників антиоксидантного захисту під впливом бетаїну виявлено зростання каталазної активності, зниження рівня SH-груп, тоді як показник ТВК-активних продуктів залишався незмінним в порівнянні з контролем.

6. Під впливом бетаїну зафіксовано морфологічні відмінності клітин від контролю, такі як їх видовженість, більша кількість відростків та формування структур, що мали ознаки прокапілярних.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1 Гаврилов В.И. Методика определения малонового диальдегида в сыворотке крови / В.П. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, И.Г. Майорова // Вопр.мед.химии. – 1987. – №1. – С.118-122.

2 Гарманчук Л.В., Перепелица О.М., Гришков Г.В. та ін. Вплив фуллеренів C₆₀ на адгезивні властивості клітин раку молочної залози // Доповіді національної академії наук України, 2009, №4, с. 164-167.

3 Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы. Лабораторное дело. 1988. №1. С. 16–18.

4 Трохимович А.А. Вільнорадикальне окиснення і антиоксидантна система в серцево-судинній патології / А.А. Трохимович [та ін.] // Науковий вісник Ужгородського університету. – 2011. – № 2. – С.361-364.

5 Черепович В. С., Волочник Е. В., Антоненко Е. В. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности. - Медицинский журнал, 2006. - № 2 - С. 106 – 108

6 Шульпекова Ю.О. Неалкогольна жирова хвороба печінки: патогенез, діагностика, лікування // Гастроентрологія. Ревматологія. — 2006. — №6 (141).

7 Almaslhadany A, Shackebaei D, Van der Touw T, Jones GL, Suleiman MS, King N. Homocysteine exposure impairs myocardial resistance to ischaemia reperfusion and oxidative stress. Cell Physiol Biochem (2015) 37(6):2265–74. doi:10.1159/000438582

8 Amraei R. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. // Cells. 2020. Vol. 9, no 7. P. 1652. doi: 10.3390/cells9071652

9 Baggott JE, Tamura T. Homocysteine, iron and cardiovascular disease: a hypothesis. Nutrients (2015) 7(2):1108–18. doi:10.3390/nu7021108

10 Bingül İ, Aydın AF, Başaran-Küçükgergin C, Doğan-Ekici I, Çoban J, Doğru-Abbasoğlu S, et al. High-fat diet plus carbon tetrachloride-induced liver fibrosis is

alleviated by betaine treatment in rats // *Int Immunopharmacol* (2016) 39:199.

doi:10.1016/j.intimp.2016.07.028

11 Bingül I., Başaranküçükgergin C, Aydın AF, Çoban J, Doganekici I,

Doğruabbasoğlu S, et al. Betaine treatment decreased oxidative stress, inflammation, and stellate cell activation in rats with alcoholic liver fibrosis.

Environ Toxicol Pharmacol (2016) 45:170. doi:10.1016/j.etap.2016.05.033

12 Burg M.B., Ferraris J.D. Intracellular organic osmolytes: function and regulation //

J. Biol. Chem. — 2008, Mar 21. — Vol. 283 (12). — P. 7309-13

13 David F., Farley J., Huang H. Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta

stimulated equine articular chondrocytes // *Vet Surg.* 2007. Vol. 36, no 3. P. 221–

27. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00253.x. PMID 17461946.

14 D'Onofrio N., Mele L., Martino E. Synergistic Effect of Dietary Betaines on

SIRT1-Mediated Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cal 27.

Cancers (Basel). 2020. Vol. 12. No 9. P. 2468. doi: 10.3390/cancers12092468.

15 Gaur N, Karouzakis E, Glück S, Bagdonas I, Jungel A, Michel BA, et al.

MicroRNAs interfere with DNA methylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *RMD Open* (2016) 2(2): e000299. doi:10.1136/rmdopen2016-000299

16 Geng CA, Ma YB, Zhang XM Mulberrofurane G and isomulberrofurane G from

Morus alba L. antihpatitis B virus activity and mass spectrometric fragmentation.

J Agric Food Chem (2012) 60(33):8197. doi:10.1021/jf302639b.

17 Ge CX, Yu R, Xu MX, Li PQ, Fan CY, Li JM, et al. Betaine prevented fructose-

induced NAFLD by regulating LXR α /PPAR α pathway and alleviating ER stress in

rats. *Eur J Pharmacol* (2016) 770:154–64. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.043

18 Go EK, Jung KJ, Kim JY, Yu BP, Chung HY. Betaine suppresses proinflammatory

signaling during aging: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor-inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinases. *J*

Gerontol (2005) 60(10):1252. doi:10.1093/gerona/60.10.1252

19 Hoffmann L, Brauers G, Gellermann T. Osmotic regulation of hepatic betaine

metabolism. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013. Vol. 304, no 9. P.

G835–846. doi:10.1152/ajpgi.00332.2012.

20 Horio M, Ito A, Matsuoka Y, Moriyama T, Orita Y, Takenaka M, et al. Apoptosis induced by hypertonicity in Madin-Darley canine kidney cells: protective effect of betaine. *Nephrol Dial Transplant* (2001) 16(3):483-90. doi:10.1093/ndt/16.3.483

21 Huang LS, Voyiaziakis E, Markenson DF, Sokol KA, Hayek T, Breslow JL. apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. *J Clin Invest* (1995) 96(5):2152-61. doi:10.1172/JCI118269

22 Imbard A., Benoist J.F., Blom H.J. Neural tube defects, folic acid and methylation // *Int. J. Environ Res Public Health*. — 2013, Sep 17. — Vol. 10 (9) — P. 4352-89

23 Iwasaki H. Impaired PRMT1 activity in the liver and pancreas of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sci* (2009) 85(3-4):161. doi:10.1016/j.lfs.2009.05.007

24 Iwasaki H. Involvement of PRMT1 in hnRNPQ activation and internalization of insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) 372(2):314-9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.051

25 Iwasaki H, Yada T. Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 364(4):1015. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.113

26 Ji C, Shinohara M, Kuhlenskamp J, Chan C, Kaplowitz N. Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes. *Hepatology* (2010) 46(5):1586-96. doi:10.1002/hep.21854

27 Jin Z, Mendu SK, Birnir B. GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids* (2013) 45(1):87-94. doi:10.1007/s00726-011-1193-7

28 Jung YS, Sun JK, Kwon DY, Ahn CW, Kim YS, Choi DW, et al. Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food Chem Toxicol* (2013) 62(12):292-8. doi:10.1016/j.fct.2013.08.049

29 Kalachniuk L, Fedyshyn P, Smirnov O. Bio protectors' effect on the composition of some amino acids under alcohol-induced oxidative stress // *EUREKA: Life*

30 Kathirvel E, Morgan K, Nandgiri G, Sandoval BC, Caudill MA, Bottiglieri T, et al.

Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2010) 299(5): G1068. doi:10.1152/ajpgi.00249.2010

31 Kettunen H, Peuranen S, Tiihonen K, Saarinen M. Intestinal uptake of betaine in vitro and the distribution of methyl groups from betaine, choline, and methionine

in the body of broiler chicks. *Comp Biochem Physiol a Mol Integr Physiol* (2001) 128(2):269. doi:10.1016/S1095-6433(00)00301-9.

32 Kettunen H, Tiihonen K, Peuranen S, Saarinen MT, Remus JC. Dietary betaine accumulates in the liver and intestinal tissue and stabilizes the intestinal epithelial

structure in healthy and coccidia-infected broiler chicks. *Comp Biochem Physiol a Mol Integr Physiol* (2001) 130(4):759-69. doi:10.1016/S1095-6433(01)00410-X.

33 Kharbanda KK, Todero SL, King AL, Osna NA, Mcvicker BL, Tuma DJ, et al. Betaine treatment attenuates chronic ethanol-induced hepatic steatosis and

alterations to the mitochondrial respiratory chain proteome. *Int J Hepatol* (2011) 2012(16):962183. doi:10.1155/2012/962183

34 Kharbanda KK, Todero SL, Ward BW, Tuma DJ. Betaine administration corrects ethanol-induced defective VLDL secretion. *Mol Cell Biochem* (2009) 327(1-2):75-8. doi:10.1007/s11010-009-0044-2

35 Kwon DY, Jung YS, Kim SJ, Park HK, Park JH, Kim YC. Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by

betaine supplementation in rats. *J Nutr* (2009) 139(1):63. doi:10.3945/jn.108.094771

36 Li Y, Xu S, Mihaylova M, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in

diet-induced insulin resistant mice. *Cell Metab* (2011) 13(4):376-88. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.009

37 Liu Yu., Peterson D. A., Kimura H., Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction // *J. Neurochem.* 1997. — 69, No. 2. — P. 582–591.

38 Leopold B., Strutz J., Weiss E. Outgrowth, proliferation, viability, angiogenesis and phenotype of primary human endothelial cells in different purchasable endothelial culture media feed wisely. // *Histochemistry and Cell Biology*. 2019. Vol. 152. P. 377–390 <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01815-2>

39 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. / T. Mosmann // *J Immunol Methods*. 1983. Vol. 65. No 1-2 P. 55-63.

40 Mukherjee S. Betaine and nonalcoholic steatohepatitis: back to the future // *World J Gastroenterol* — 2011, Aug 28. — Vol. 17(32). — P. 3663-3664

41 Nikolaienko T., Nikulina V., Garmanchuk L., Makarenko O. Mechanism of proangiogenic activity of mitocorrectin on endothelial cells in vitro // *Artery Research* Volume 24, December 2018, Page 81

42 Nikolaienko T., Petruk N., Shelest D., L. Garmanchuk. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells. *Bull. of T. Shevchenko Nat. Univ. of Kyiv*. 2015; 1(69): 36-38.

43 Nikulina V., Garmanchuk L., Zborovski Y, Orisik V, Vovk M, Orisik S, Nikolaienko T, Babchuk I, Pekhno V. Cytostatic and pro-apoptotic effect of N-hydroxy-4-(((e)-2-phenylethenyl)sulfonyl) amino)butanamide on tumor cells // *European Journal of Cancer*. 2016, 57S1, S9.

44 Olli K, Lahtinen S, Rautonen N, Tiihonen K. Betaine reduces the expression of inflammatory adipokines caused by hypoxia in human adipocytes. *Br J Nutr* (2013) 109(1):43–9. doi:10.1017/S0007114512000888

45 Olsen M. et al. Effect of hyperosmotic conditions on the expression of the betaine-GABA-transporter (BGT-1) in cultured mouse astrocytes // *Neurochem. Res.* — 2005 Jun — Jul — Vol. 30 (6-7). — P. 855-65

46 Park S W., Jun H.O., Kwon E. Antiangiogenic effect of betaine on pathologic retinal neovascularization via suppression of reactive oxygen species mediated

vascular endothelial growth factor signaling. // *Vascul Pharmacol*. 2017. Vol. 90. P.19-26. doi: 10.1016/j.vph.2016.07.007.

47 Slater T. F., Sawyer B., Strauli U. Studies of succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium systems // *Biochim Biophys. Acta.* – 1963. – 77. – P. 383–393;

48 Smith M.D. et al. Inhibition of the betaine-GABA transporter (mGAT2/BGT-1) modulates spontaneous electrographic bursting in the medial entorhinal cortex (mEC) // *Epilepsy Res.* — 2008 Mar. — Vol. 79 (1). — P. 6-13.

49 Song Z, Deaciuc I, Zhou Z, Song M, Chen T, Hill D, et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in beneficial effects of betaine on high sucrose diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007) 293(4):G894. doi:10.1152/ajpgi.00133.2007

50 Varga Z., Flammer A.J., Steiger P. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. // *Lancet*. 2020 Vol. 395. No 10234. P.1417-1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.

51 Ylahopoulos S, Boldogh I, Casola A. Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. // *Blood* 1999 Vol 94, no 6. P. 1878–1889.

52 Xu L, Huang D, Hu Q, Wu J, Wang Y, Feng J. Betaine alleviates hepatic lipid accumulation via enhancing hepatic lipid export and fatty acid oxidation in rats fed with a high-fat diet. *Br J Nutr* (2015) 113(12):1835–43. doi:10.1017/S0007114515001130

53 Zeisel S. Choline, other methyl-donors and epigenetics. *Nutrients* (2017) 9(5):445. doi:10.3390/nu9050445

54 Zhang W, Wang LW, Wang LK, Li X, Zhang H, Luo LP, et al. Betaine protects against high-fat-diet-induced liver injury by inhibition of high-mobility group box 1 and Toll-like receptor 4 expression in rats. *Dig Dis Sci* (2013) 58(11):3198. doi:10.1007/s10620-013-2775-x.