

INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS AND VITAMINS ON THE FUNCTION OF HUMAN CELLS *IN VITRO*

Danlybayeva G.A., Akhmadeyeva Z.T.

*National Center for Biotechnology
13/5, Korgalzhyn road, Astana, 010000, Kazakhstan
dgaziza@gmail.com*

ABSTRACT

Cell culture is a major tool in biomedical research that has been developing since the middle of the last century.

Healthy cells isolated from body tissues have specific requirements for the composition of artificial culture media. There are a number of synthetic growth media (for example, 199, 703 and Eagle), which contain amino acids, vitamins, and mineral salts, among other additives. Serum is added to all synthetic media, as the main source of growth factors, minerals and proteins, for the cultivation of high-grade cell cultures. In addition to standard synthetic media, there are a various specialised media for efficient propagation of cells with low proliferative potential; however, the high cost of these specialised media prohibits their use in mass-production applications.

To obtain the required amount of material for experimental or commercial purposes, cell proliferation is usually necessary. A major factor in ensuring sufficient cell proliferation is the choice of optimal culture media, which may involve the use of cell-conditioned media, among various other components. Therefore, the addition of growth factors, antioxidants or vitamins to standard media (at non-physiological concentrations) can be very attractive.

This article presents details of the effects of four antioxidants and vitamins on the viability, proliferation activity and expression of proteins in diploid cell culture. Our results reveal that addition of minimal non-toxic concentrations of vitamins and antioxidants to cell culture media has differing effects on the proliferation of continuous cell cultures, ranging from stimulation to suppression of cell proliferation.

Keywords: vitamins, antioxidants, vitamin C, retinoic acid, coenzyme Q10, Dihydroquercetin, diploid human fibroblasts, continuous cell culture MCF-7 and HeLa.

УДК 576.5, 615.27

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И ВИТАМИНОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Данлыбаева Г.А., Ахмадеева Ж.Т.

*Национальный центр биотехнологии
Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан
dgaziza@gmail.com*

АБСТРАКТ

Клеточные культуры – один из основных инструментов, используемых в разнообразных биомедицинских исследованиях.

Извлеченные из тканей организма здоровые клетки предъявляют определенные требования к составу питательных сред. Известен ряд синтетических питательных сред (199, 703, среда Игла и др.), содержащих аминокислоты, витамины, минеральные соли и другие вещества. Для выращивания полноценных культур клеток ко всем средам добавляется сыворотка крови – основной источник ростовых факторов, микроэлементов и белков. Кроме стандартных сред, имеются специализированные среды, обеспечивающие эффективное размножение пролиферативно малоактивных клеток. Однако их высокая стоимость не позволяет использовать в массовом производстве клеточных препаратов.

Для получения требуемого количества клеточного материала необходима экспансия клеток, т.е. размножение в достаточном количестве. Большую роль в этом играют подбор оптимальной среды культивирования, использование кондиционированной клетками среды и различных факторов, влияющих на деление клеток. Поэтому весьма привлекательным выглядит добавление в среду ростовых факторов, витаминов или антиоксидантов (в концентрациях не равных физиологическим уровням).

В статье представлены данные о влиянии 4 витаминов и антиоксидантов, на жизнеспособность, пролиферативную активность и экспрессию белков диплоидной клеточной культуры. Выявлено, что добавленные в минимальных нетоксичных концентрациях витамины и антиоксиданты оказывают различное воздействие на пролиферацию перевиваемых клеточных культур: от стимуляции до подавления пролиферации клеток.

Ключевые слова: витамины, антиоксиданты, витамин С, ретиноевая кислота, коэнзим Q10, дигидрохверцетин, диплоидные фибробласты человека, перевиваемые клеточные культуры MCF-7 и HeLa.

ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом область применения антиоксидантной терапии постоянно расширяется. Среди биологических антиоксидантов наиболее выраженными антиокислительными свойствами обладают витамины, особенно при лечении и профилактике нарушений иммунной системы, связанных с воздействием свободных радикалов (оксидантов). С момента открытия витаминов и последующей расшифровки их химической структуры они стали незаменимыми составляющими полноценного функционирования живых клеточных систем и организмов [1-2].

Интерес к витаминам в 80-х годах XX века возродился после появления сведений об антиканцерогенном действии витаминов в физиологических дозах, а также данных о преимуществах зеленолистной диеты для профилактики рака толстой кишки [3, 4]. Кроме того, появление гипотезы Л. Полинга о противораковом действии высоких доз (выше физиологических доз в 3-10-100 раз) витамина С активизировало экспериментальные и клинические исследования по витаминам [5]. Изыскания, в основном, были проведены в условиях *in vivo* [6-8], и некоторые исследования, касающиеся влияния витаминов на жизнеспособность и стабильность генома – *in vitro* [9-11].

Витамин С. Витамин С – это водорастворимый витамин, который относится к группе «больших» витаминов-антиоксидантов. Основная функция витамина С – защита от оксидативного стресса, участие в окислительно-восстановительных процессах (аскорбиновая кислота – дигидроаскорбиновая кислота, гидроксигидроксилирование). Этот микроэлемент является кофактором для ряда важных ферментов, например, пролил-гидроксилазы, играющей важную роль в синтезе коллагена и подавляющей транскрипционный фактор-индуктор гипоксии – «*hypoxia-inducible factor*» (HIF-1), который участвует в регуляции роста опухоли, функции нейтрофилов, энергетическом метаболизме, и апоптозе [12]. Аскорбиновая кислота усиливает экспрессию генов, ответственных за синтез коллагена в фибробластах, трансформируя лизин в оксализин, который образует поперечные сшивки [13]. Коллаген же необходим для восстановления кожи после ожога, так как является составляющей структуры кожи.

Витамин С – один из нетрадиционных средств лечения рака, который используют для элиминации раковых клеток. Лабораторные исследования показывают, что аскорбиновая кислота для разных клеточных культур токсична в разной концентрации. Так, концентрация внеклеточного витамина С, равная 100-200 мкМ, токсична для некоторых видов клеток, однако только миллимолярные концентрации витамина могут убить злокачественные клетки многих видов рака. Chen и соавторы в своей работе показали, что аскорбиновая кислота в концентрации выше 1 мМ стимулирует выработку перекиси водорода (H₂O₂), который токсичен, преимущественно, для опухолевых клеток [14].

Витамин А. Витамин А – жирорастворимый незаменимый витамин, который может быть в форме спирта (ретинол), альдегида (ретинол) и ретиноевой кислоты. Витамин А влияет на дифференциацию и морфогенез клеток, играя ключевую роль в росте костей, кожи. Активация рецептора ретиноевой кислоты к витамину А в ядре регулирует экспрессию генов, а также синтез гликопротеинов и родопсина. Увеличение экспрессии интерлейкина 2 (IL-2) посредством витамина А приводит к активации Т-клеточного иммунитета [15, 16].

Витамин А и его предшественники (α, β и γ-каротиноиды) имеют антиоксидантные свойства. Наиболее высокой антиокислительной активностью обладает β-каротин, который как и витамин А участвует в обмене тиоловых соединений, подавлении образования дисульфидных групп из сульфгидрильных, регуляции функционально-структурных свойств мембран путем встраивания в гидрофобную зону мембран и взаимодействия с лецитин-холестериновым слоем, в результате которого происходит перестройка мембран клетки, митохондрий и лизосом [17]. Известно, что нехватка витамина А может привести к ночной слепоте, а в раннем возрасте задержке роста и к свертороговению кожи, нарушению зрения и фертильности, однако недавно выявлено, что его большие дозы (гипервитаминоз) могут привести к тератогенному эффекту [18].

Коэнзим Q10. Убихинон или коэнзим Q10 – жирорастворимое, витаминоподобное вещество, представлено во всех клетках нашего организма и локализуется преимущественно в митохондриях. Эндогенный синтез в клетках печени является основным источником этого витамина, так как в пищевых продуктах убихинон содержится в небольших количествах. Основная функция убихинона – участие в процессе переноса электронов в дыхательной цепи и окислительном фосфорилировании, при котором происходит синтез АТФ [19].

Вторая функция коэнзим Q10 – антиоксидантная. Свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ) биологических мембран является причиной целого ряда заболеваний. Возникновение ПОЛ зависит от концентрации образовавшихся активных форм кислорода (АФК). Действие Q10 заключается в улавливании

АФК, которое сохраняет липидный слой мембран от ПОЛ. Добавление убихинона в питательную среду клеток выполняет протекторную роль и обеспечивает энергетические потребности в АТФ для высокопролиферативных клеток [20].

Дигидрокверцетин. Дигидрокверцетин (ДГК) (син. таксифолин) – природный флавоноид, который содержится в больших количествах в древесине лиственницы [21]. Его высокая антиоксидантная активность связана с пятью гидроксильными группами, которые функционируют как «хелатор», связывая ионы металлов и других веществ. Он может служить эффективным ингибитором перекисного окисления липидов (который часто приводит к атеросклерозу), белков, нуклеиновых кислот и других соединений. Дигидрокверцетин имеет антиоксидантную способность в 2 раза выше, чем у масла виноградной косточки, в 50 раз – чем у витамина С и в 100 раз – чем у витамина Е. Благодаря его антиоксидантным свойствам, дигидрокверцетин может найти и уничтожить два самых опасных вида свободных радикалов в организме: супероксид и пероксид. Дигидрокверцетин также может защитить красные и белые кровяные клетки, результатом чего является более сильная иммунная система организма. Дигидрокверцетин известен как препарат, который укрепляет стенки капилляров, подавляет старение клеток, имеет противовоспалительный эффект, может использоваться для профилактики болезней мозга, рака, сердечно-сосудистых и кожных заболеваний. Известно, что при ожогах происходит активация ПОЛ, которая нуждается в компенсации дигидрокверцетина для местного лечения термических ожогов кожи [22-24].

Таким образом, первоначальные исследования витаминов и антиоксидантов предполагали их благотворную роль в профилактике заболеваний. Однако более поздние клинические испытания ставят под сомнение пользу этих методов лечения, поскольку известно, что в определенных условиях и при избыточной концентрации антиоксиданты могут проявлять и прооксидантные свойства [25].

Кроме того, существует недостаток данных о влиянии витаминов и антиоксидантов на пролиферативный потенциал клеток в культуре, поэтому целью данной работы является определение влияния вышеуказанных антиоксидантов на рост, морфологию и экспрессию белков диплоидных фибробластов и пролиферацию опухолевых клеток в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Диплоидные фибробласты М-22, любезно предоставленные Конюшко О.И. (ИПиВЭ им. М.П. Чумакова, г. Москва, РФ), и перевиваемые культуры клеток карциномы шейки матки HeLa и аденокарциномы молочной железы MCF-7 культивировали, соответственно, в средах MEM («PAA»), 199 («Himedia») и DMEM («Lonza»), с добавлением 200 mM L-глутамин («Gibco»), 7-10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma»), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки инкубировали в культуральных флаконах (матрасах) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В работе использовали витамин А («AppliChem»), витамин С («PanGeas»), коэнзим Q10 («AppliChem»), дигидрокверцетин («Vita La Vita»). Клетки культивировали до образования 80-90% конфлюэнтного монослоя. Смену среды производили с добавлением витаминов один раз в два дня. Культуры клеток прошли 5-9 последовательных пассажей.

В процессе работы учитывали следующие параметры: сроки образования монослоя, жизнеспособность, пролиферативную активность (индекс пролиферации – ИП) и морфологию культуры. Жизнеспособность культуры (в процентах) определяли при окрашивании 0,2% раствором трипанового синего и последующем подсчете живых неокрашенных клеток в камере Горяева.

ИП определяли по отношению количества выросших клеток к количеству посеянных. Морфологию изучали методом окраски кристаллическим фиолетовым.

Определение нетоксичных концентраций витаминов и антиоксидантов

Цитотоксичность определяли с использованием МТТ-метода. Для этого клетки рассеивали в 96-луночные панели фирмы «Costar» по 100 тыс. клеток/мл. Препараты вносили через 24 часа культивирования клеток. Факторы использовали в концентрациях от 1 до 100 мкМ/мл:

- 1) L-аскорбиновая кислота (витамин С) – 1; 5; 50 и 100 мкМ;
- 2) ретиноевую кислоту (витамин А) – 1; 5; 50 и 100 мкМ;
- 3) коэнзим Q10 – 5; 10; 50 и 100 мкМ;
- 4) дигидрокверцетин – 1; 5; 50 и 100 мкМ.

Культуру клеток с препаратами инкубировали при 37°C в течение 72 ч, после чего среду удаляли, в лунки вносили ростовую среду без сыворотки, добавляли по 20 мкл готового раствора МТТ. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 595 нм на ИФА-ридере «Biorad».

Иммунофенотипирование фибробластов, культивированных с витаминами и антиоксидантами

Исследование уровня экспрессии в клетках осуществляли с использованием иммунофлуоресцентного метода. Клетки за 24 ч до анализа высевали в 4-луночные слайды, предварительно удалив ростовую среду из

слайдов с выросшим монослоем. Затем промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 20 минут. После 3-кратной промывки ФСБ в слайды вносили по 200 мкл 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа. Для определения маркеров фибробластов после инкубации добавляли первичные антитела против CD90, виментина («BD Pharmingen»), коллагена 1 типа, FSP-белка («Sigma»). Для приготовления необходимой концентрации антитела разводили в растворе, содержащем 1% альбумин и 0,1% Tween в PBS. Инкубирование проводили при 37°C в течение 1 часа. После трех пятиминутных отмывок в растворе 0,2% Tween в ФСБ наносили раствор козьих антикрысиных вторичных антител (1:500), конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 («Invitrogen»), и выдерживали препараты в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа. Клетки отмывали от раствора вторичных антител три раза по пять минут раствором 0,2% Tween 20 в ФСБ.

Ядра клеток подкрашивали раствором DAPI в количестве 30 мкл на лунку и выдерживали в темном месте в течение 15 минут. Промывали два раза по пять минут в ФСБ, затем в воде и сушили на воздухе в темноте. После высушивания под покровное стекло наносили по 10 мкл раствора антивыгорающего раствора Prolong^R Gold Antifade Reagent («Invitrogen»), содержащего 90% глицерина, 0,1 М Tris-HCl; 23 мг/мл DABCO (1,4-диаз-бицикло(2,2,2)октан). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа «AxioObserver A1» («Carl Zeiss», Germany) со встроенной CCD-камерой «AxioCam Erc5s» («Carl Zeiss») и программного обеспечения Zen 2011. Обработку полученных снимков проводили с помощью программы «Image J».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Учитывая важность микроэлементов и витаминов в условиях *in vitro*, оптимизация условий культивирования с сохранением жизнеспособности клеток гарантирует стабильность дальнейших исследований. Среды для клеточных культур, воссоздавая естественные условия окружающей среды, могут помочь сформировать на моделях *in vitro* ответ клетки на различные факторы. Обычно многие культуральные среды содержат определенные витамины и минералы, однако в большинстве случаев единственным источником питательных микроэлементов является фетальная бычья сыворотка (FBS), составляющая лишь 5-10% от объема среды. Кроме того, пропорции микроэлементов не всегда соответствуют потребностям клеток, так как состав каждой партии FBS отличается друг от друга [26].

Перед использованием предварительно клетки размораживали и культивировали, согласно паспорту культуры, в питательной среде с добавлением 200 mM глутамина и 7-10% эмбриональной телячьей сыворотки в стандартных условиях в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. При таких условиях при посевой концентрации 1,2-1,5x10⁵ диплоидные фибробласты формировали конфлуентный монослой через 48-72 часа, при дозе 1,0-10⁵ – через 96 ч. Поэтому для оптимизации условий культивирования было предположено добавление микроэлементов, которые, вероятно, могут ускорить эти процессы.

Ранее нами были определены концентрации препаратов, нетоксичных для диплоидной культуры фибробластов кожно-мышечной ткани эмбриона человека M-22 методом МТТ [27]. Результаты представлены на рисунке 1.

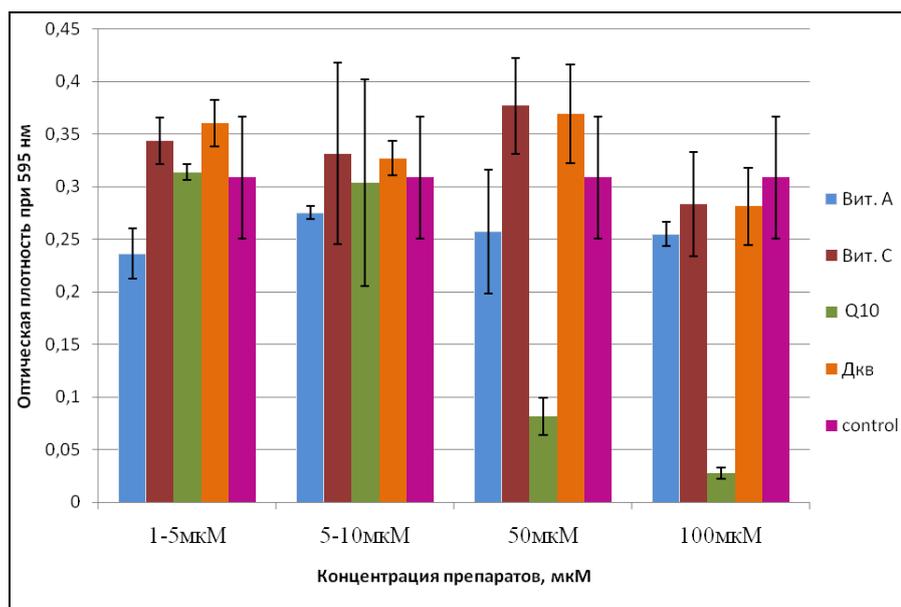


Рис. 1. Влияние различных концентраций витаминов и антиоксидантов на культуру клеток M-22

Fig. 1. The Influence of various concentrations of antioxidants and vitamins on M-22 cell culture

Как видно из рисунка 1, испытуемые витамины и антиоксиданты по-разному влияют на жизнеспособность диплоидной культуры фибробластов М-22. Выявлено, что концентрация 5 мкМ коэнзима Q10 и витамина А и от 1-50 мкМ дигидрохверцетина и витамина С являются нетоксичными для диплоидных клеток. Увеличение же концентрации витамина С и дигидрохверцетина приводит к некоторому снижению жизнеспособности клеток и значительному снижению показателей оптической плотности при увеличении концентрации коэнзима Q10. При добавлении витамина А (ретиноевой кислоты) во всех использованных количествах жизнеспособность была ниже контрольных значений.

В серии следующих опытов определяли влияние тестируемых добавок в нетоксичной дозе на клетки М-22 в процессе культивирования в течение 5 последовательных пассажей. В качестве контроля применяли питательную среду Игла-МЕМ также с добавлением 10% ЭТС и 200 мМ L-глутамина. Все опыты проводили в трех повторностях. Посевная концентрация составляла $1,2 \times 10^5$ кл/мл, клетки инкубировали в культуральных матрасах объемом 50 см³ в течение 3-4 суток при 37°C. В процессе работы учитывали следующие параметры: сроки образования монослоя, морфологию культуры (рисунки 2, 3), пролиферативную активность и жизнеспособность (в %).

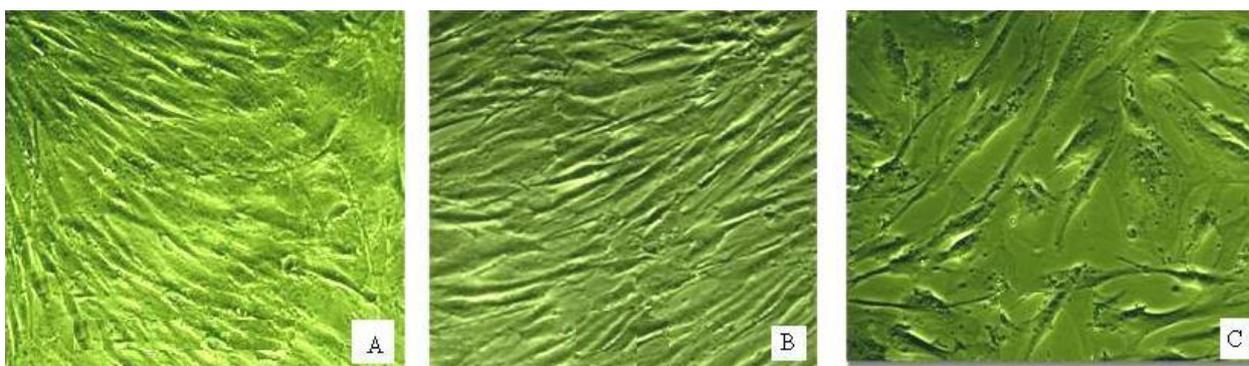
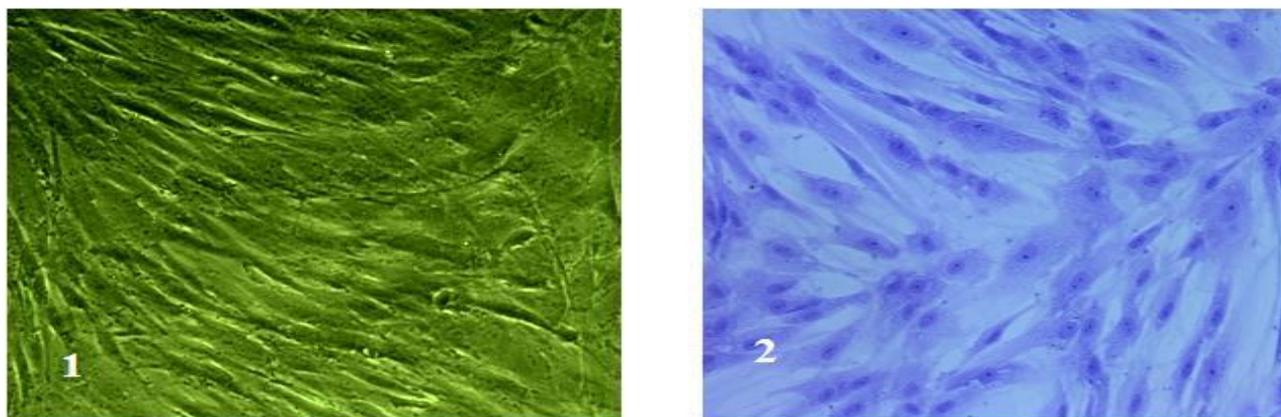


Рис. 2. А – контроль клеток (72 ч. культивирования); В – с витамином С (48 ч культивирования – 3 пассаж); С – с витамином А (96 ч культивирования – 1 пассаж) (увеличение x200)

Fig. 2. А – control cells (cultivated for 72 h); В – with vitamin С (48 hours after seeding – 3 passage); С – vitamin А (cultivated for 96 hours – 1 passage) (x200)

Как видно из рисунков 2-4, клетки, культивируемые с добавлением витамина С, формировали монослой раньше, чем в контроле, причем морфология была идентична морфологии контрольных клеток. Использование витамина А привело к изменению морфологии: клетки стали более вытянутыми и наблюдается сильная вакуолизация цитоплазмы. При этом значительно снизилась ростовая активность клеток в опыте. После 1 пассажа клетки не образовали 50% монослоя в течение 96 часов.

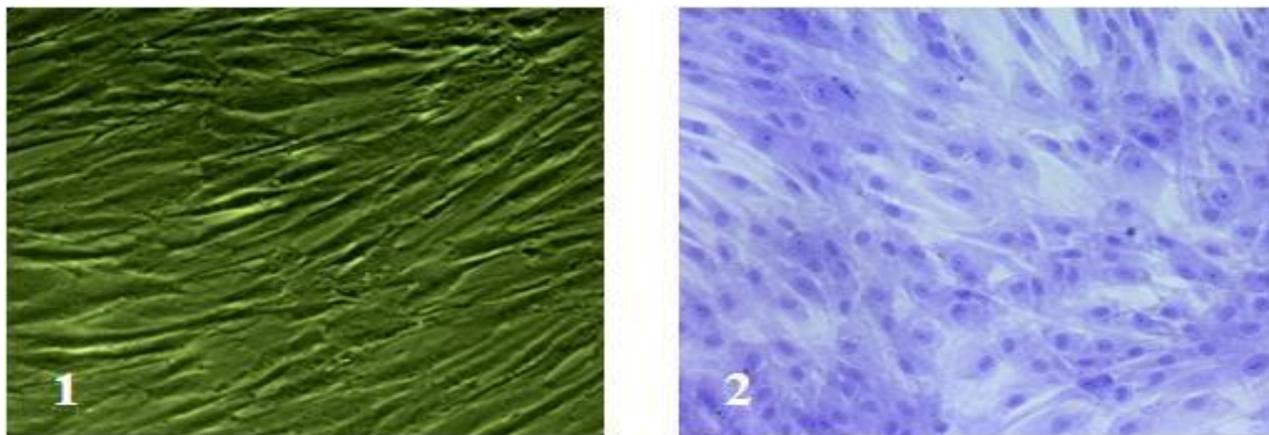


1 – морфология живой неокрашенной диплоидной культуры М-22 в фазово-контрастном микроскопе, увел. x200; 2 – морфология фиксированной диплоидной культуры М-22, окрашивание кристаллическим фиолетовым, увел. x320

Рис. 3. Контроль клеток М-22

1 – morphology of living unstained diploid cell culture of M-22 in a phase-contrast microscope, x200; 2 – morphology of fixed M-22, staining with crystal violet, x320

Fig. 3. Control M-22 cells



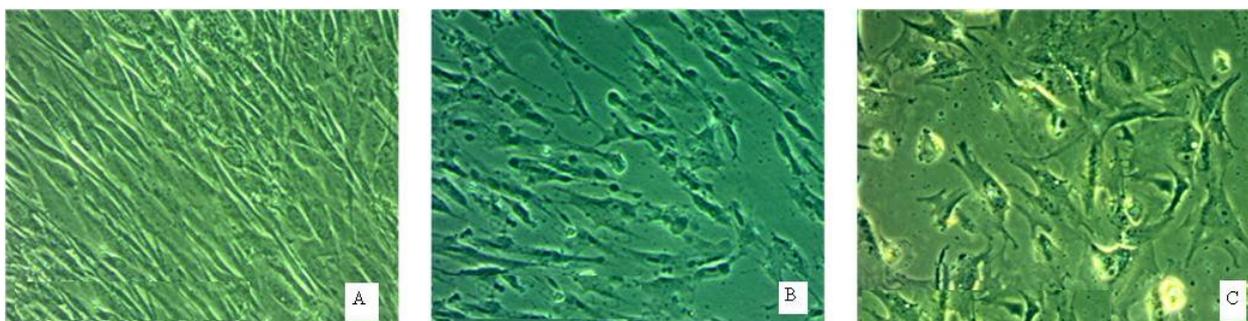
1 – морфология неокрашенной живой диплоидной культуры М-22 в фазово-контрастном микроскопе, увел. х200; 2 – морфология фиксированной диплоидной культуры М-22, окрашивание кристаллическим фиолетовым, увел. х320

Рис. 4. Культивирование с витамином С

1 – morphology of living unstained M-22 diploid cell culture in the phase-contrast microscope, x200; 2 – morphology of fixed M-22, staining with crystal violet, x320

Fig. 4. Cultivation with vitamin C

При добавлении в питательную среду в течение 5 последовательных пассажей антиоксидантов немного менялась морфология – при добавлении коэнзима Q10 клетки приобретали более округлую форму, при добавлении дигидрокверцетина приобретали звездчатую форму (рис. 5). При этом скорость роста и жизнеспособность клеток тоже немного изменялись.



А – контроль клеток; В – с коэнзимом Q10; С – с дигидрокверцетином (увеличение х200)

Рис. 5. Культивирование клеток М-22 в течение 72 ч, неокрашенная культура

А – control cells; В – with coenzyme Q10; С – with dihydroquercetin (x200)

Fig. 5. Cultivation of M-22 cells for 72 hours, unstained culture

Исследования пролиферативной активности показали, что клетки М-22, пассируемые на стандартной среде Игла-МЕМ (контроль), формировали монослой на 3-5 сутки. В зависимости от посевной дозы, значения индекса пролиферации (ИП) находились в пределах от 1,8 до 2,2. Жизнеспособность же культуры составляла 90-95%.

Из рисунка 6 видно, что добавление антиоксидантов коэнзима Q10 и дигидрокверцетина до 3-го пассажа (ИП=2,0-2,4) несколько повышало пролиферативный потенциал по сравнению с контролем. При этом жизнеспособность линии была сопоставима с контролем и составляла 84-95%. Дальнейшее культивирование до 5 последовательных пассажей в присутствии этих препаратов снижало скорость роста клеток.

Добавление к полной питательной среде L (+) аскорбиновой кислоты (витамина С), в концентрации 1 мкМ также приводило к положительной динамике роста клеток.

При культивировании с ретиноевой кислотой (витамином А) индекс пролиферации после 1-го пассажа был равен 1,5, снизившись к 4 пассажу до 0,5. Снижение скорости роста клеток М-22 в присутствии витамина А привело к тому, что после 3 последовательных пассажей в течение 3 недель, клетки перестали расти, вероятно, накапливая дефектные ДНК.

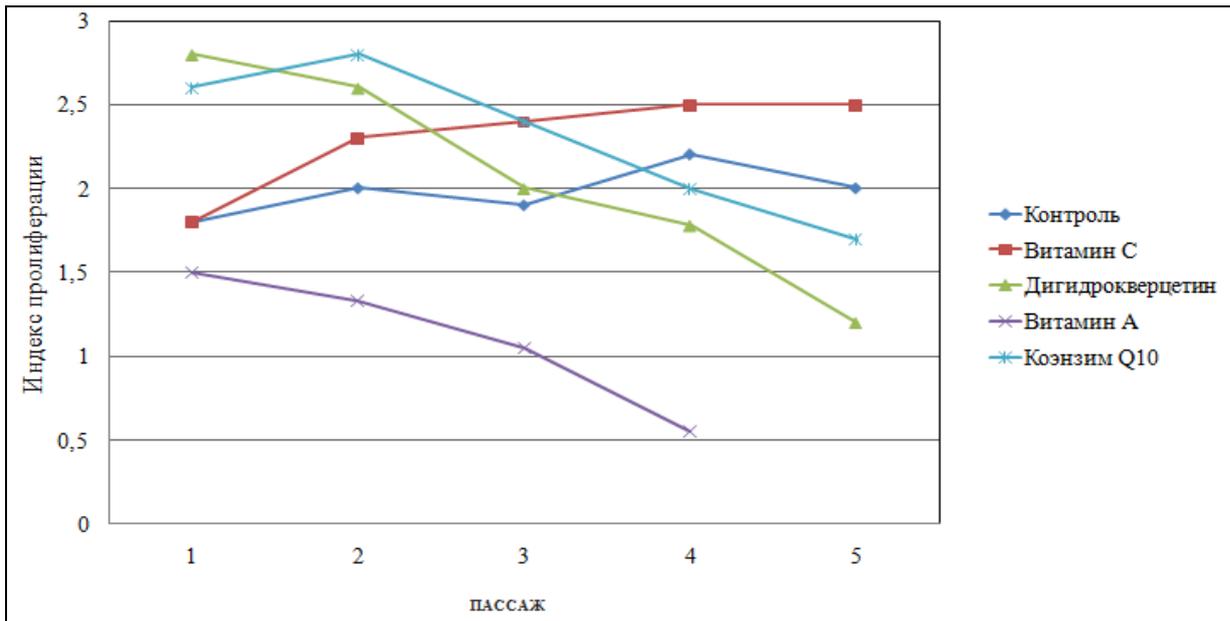


Рис. 6. Влияние витаминов и антиоксидантов на пролиферацию диплоидных клеток

Fig. 6. Effects of antioxidant vitamins on the diploid cell proliferation

Ввиду положительной динамики роста клеток при добавлении витамина С до 5 пассажа, культивирование с ним было продолжено до 10 пассажа. В результате исследования было выявлено, что пролиферативный индекс при добавлении витамина С несколько снижается к 8-10 пассажу и составляет 1,2-1,4, тогда как в контроле ИП остается равным 1,8-2,2.

В связи с различным воздействием на клетки представлялось интересным изучить сочетанное влияние изучаемых препаратов на пролиферацию клеток кожно-мышечной ткани М-22.

Использование комбинации витаминов: L (+) аскорбиновой кислоты (витамина С) и ретиноевой кислоты (витамина А) привело к снижению ИП уже после первого пассажа (рис. 7). Кроме того, следует отметить, что клетки в среде с добавлением смеси этих двух витаминов, в отобранных дозах, росли медленнее (9-12 суток) по сравнению с контролем (3-5 суток).

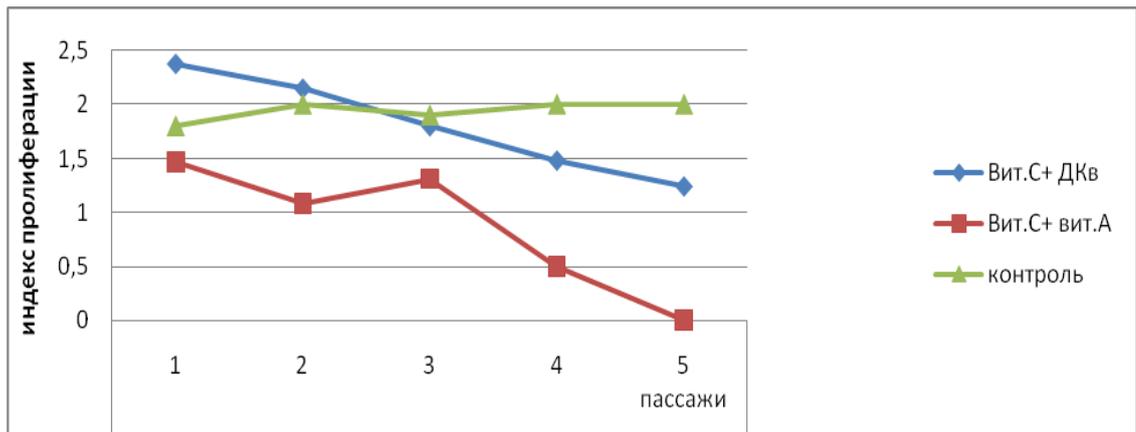


Рис. 7. Влияние смеси витаминов и антиоксидантов на пролиферативную активность диплоидных фибробластов

Fig. 7. Effects of the mixture of vitamins and antioxidants on the proliferative activity of diploid fibroblasts

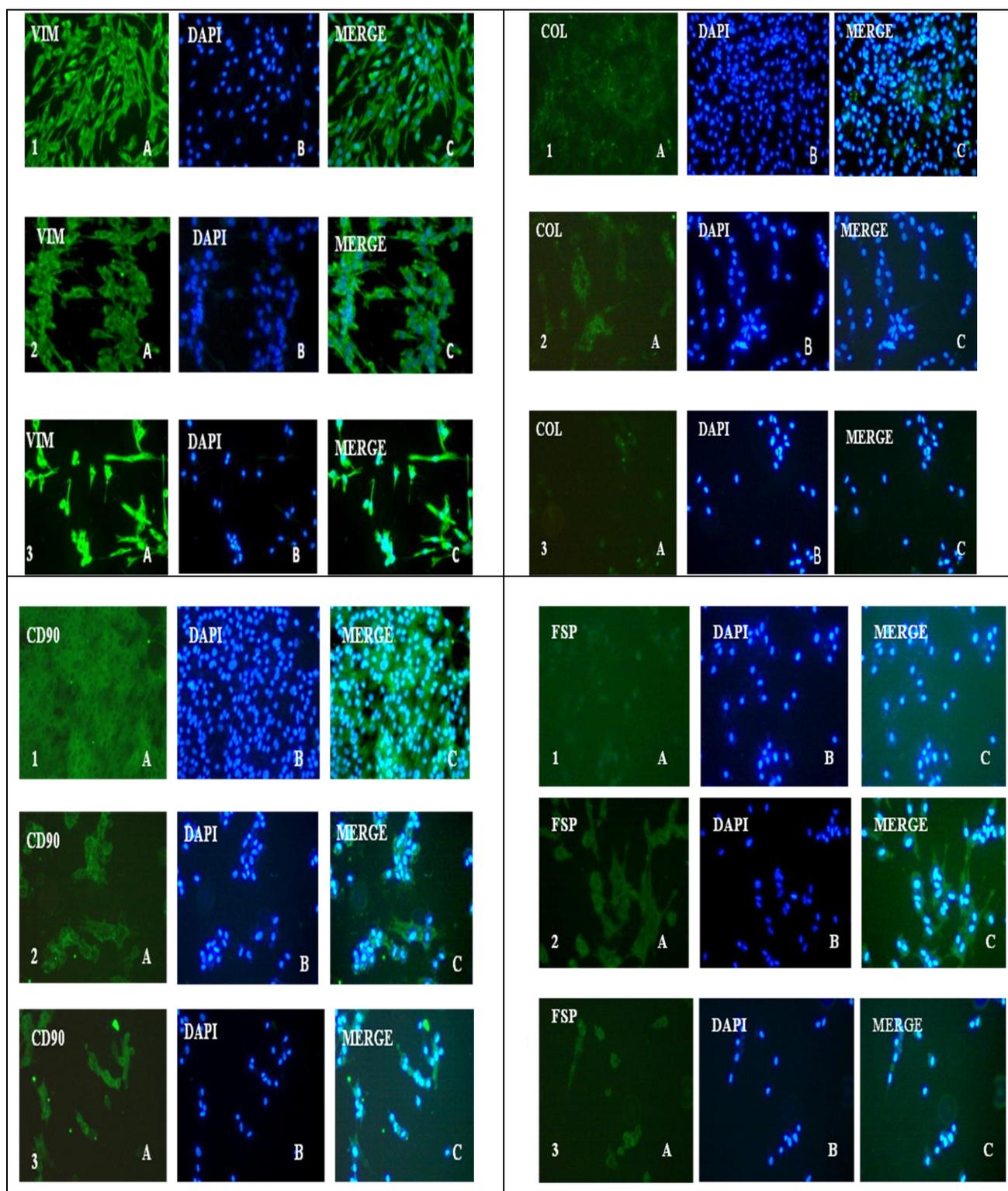
Сочетание витамина С и дигидрокверцетина повышает ИП при первых пассажах, как при использовании аскорбиновой кислоты и ДКВ в отдельности, снижаясь к третьему пассажу до уровня контроля и далее ниже.

Таким образом, минимальные нетоксичные дозы использованных антиоксидантов на начальном этапе при применении в течение 1-2 пассажей оказывают стимулирующее действие на скорость пролиферации диплоидной культуры фибробластов М-22. Однако использование в течение 5 последовательных пассажей

снижает ростостимулирующую активность изучаемых антиоксидантов, кроме витамина С, который оказывает положительное влияние до 8-9 пассажей.

Следующим этапом исследований было изучение влияния применяемых антиоксидантов на способность диплоидной культуры М-22 экспрессировать характерные для этих клеток белки после 3 пассажей. С этой целью проведен иммуноцитохимический анализ экспрессии маркерных белков фибробластов: поверхностного белка, специфичного для фибробластов – FSP, клон 1B10, коллагена 1 типа, маркера промежуточных филаментов и структурно интегрированного в плазматическую мембрану белка – виментина и молекул адгезии CD90.

Использование иммунофлуоресцентного анализа показало, что применение витаминов и антиоксидантов, оказывая влияние на пролиферативный потенциал клеток, не изменяет их способность экспрессировать характерные для фибробластов маркерные белки.



1 – контроль; 2 – с витамином А; 3 – с витамином С: А – окрашивание белками (Vim – виментин, CD90; Col – коллаген; FSP – фибробластспецифичный белок); В – окрашивание ядер DAPI; С – совмещение

Рис. 8. Влияние витаминов на экспрессию белков в диплоидных клетках

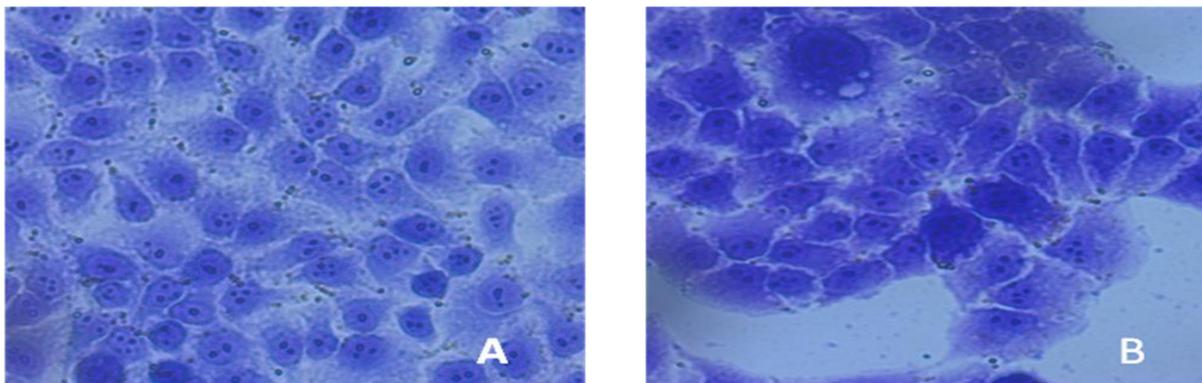
1 – control; 2 – with vitamin A; 3 – with vitamin C: A protein staining (Vim – vimentin, CD90, the Col – collagen, the FSP – fibroblasts-specific protein); B – staining of nuclei with DAPI; C – merge

Fig. 8. The influence of vitamins on the expression of proteins in diploid cells

Как видно из рисунка 8, иммуноцитохимическое окрашивание клеток диплоидной культуры фибробластов в питательной среде с добавлением витаминов и антиоксидантов выявило активный синтез коллагена 1 типа, FSP-белка, виментина и CD90, аналогичный таковому в контрольных клетках, культивируемых в стандартной питательной среде с добавлением только 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Таким образом, минимальные нетоксичные концентрации антиоксидантов и витаминов, не влияя на способность экспрессировать характерные белки в течение 3 пассажей, оказывают различное воздействие на пролиферативный потенциал диплоидных фибробластов при последовательном пассировании в их присутствии, активизируя рост клеток вначале, с последующим снижением ИП. Полученные нами данные согласуются с тем фактом, что практически все витамины (включая витамины А и С) при их прямом воздействии на клеточные системы в концентрациях более 10^{-6} – 10^{-5} моль/л ингибируют пролиферацию (деление) фибробластов [28].

Так как известно, что высокие дозы витамина С играют важную роль в подавлении роста некоторых видов раковых клеток, которые обладают высоким энергетическим метаболизмом, представлялось интересным определить влияние витамина С как антиоксиданта на пролиферацию клеточных культур опухолевого происхождения: Hela и MCF-7, культивируемых длительное время в присутствии нетоксичных доз.



А – контроль; В – с витамином С

Рис. 9. Морфология клеток Hela

А – control; В – with vitamin C

Fig. 9. The morphology of Hela cells

Как видно из рис. 9, добавление витамина С не меняет морфологию опухолевых клеток. Обе культуры (контроль и опыт) представлены эпителиоподобными клетками с четкими границами и крупными ядрами разнообразной формы, ядрышки крупные, от одного до нескольких в ядре.

Однако при последовательном пассировании (рис. 10) в течение 9 пассажей витамин С в низкой концентрации – 1 мкМ оказывает неоднозначное воздействие на пролиферацию клеток.

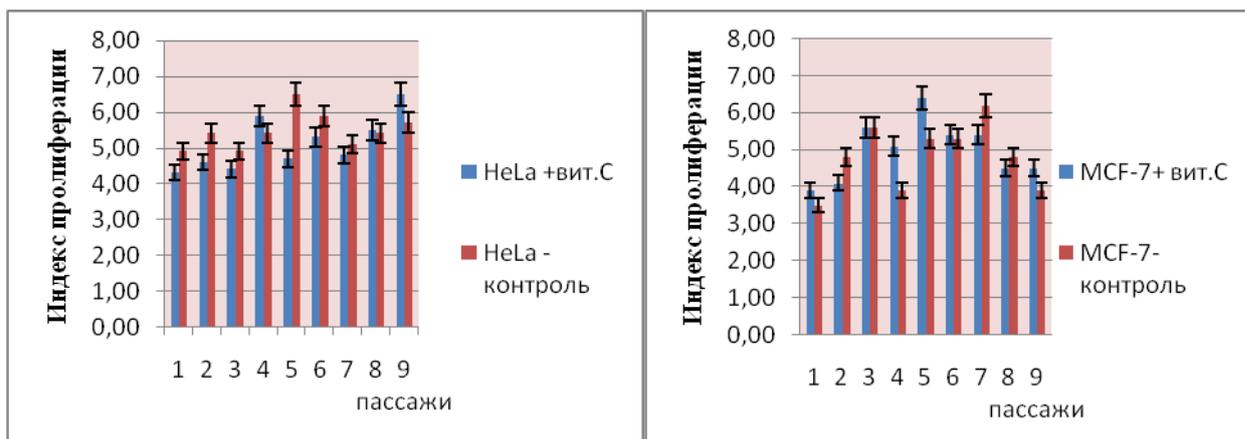


Рис. 10. Влияние витамина С на рост опухолевых клеток

Fig. 10. Effect of vitamin C on the growth of tumor cells

Как видно из рисунка 10, при добавлении его к клеткам карциномы шейки матки HeLa наблюдается некоторое снижение индекса пролиферации до 6 пассажа, по сравнению с контролем. Так, в контроле значения ИП в процессе культивирования составляли 4,9-6,5, тогда как в опыте ИП составлял от 4,3 до 5,9, достигая значения 6,5 к 9 пассажу. В клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7 также отмечается скачкообразное повышение ИП, которые составляли 3,9-6,4, немного отличаясь от контроля (3,5-6,2), при этом на 4-5 пассажах отмечено усиление роста опухолевых клеток в присутствии витамина. Вероятно, такое влияние витамина С, как и других аскорбатов, флавоноидов и многих полифенольных соединений, связано с тем, что они являются неустойчивыми в обычно используемой для культивирования клеток среде, и переживают быстрое окисление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе в условиях *in vitro* были протестированы витамины и антиоксиданты: L-аскорбиновая кислота (витамин С), ретиноевая кислота (витамин А), коэнзим Q10 и дигидрокверцетин. В результате исследований выявлено, что минимальные нетоксичные дозы использованных антиоксидантов и витаминов при применении в течение 1-2 пассажей (на начальном этапе) оказывают стимулирующее действие на скорость пролиферации диплоидной культуры фибробластов человека, за исключением витамина С, положительный эффект которого наблюдался до 9 пассажа. При дальнейшем последовательном пассировании в присутствии тестируемых биологически активных добавок пролиферативная активность фибробластов снижается. Применение витамина С в концентрации 1 мкМ оказывает неоднозначно ингибирующее действие на пролиферацию перевиваемых культур клеток карциномы шейки матки HeLa и аденокарциномы молочной железы MCF-7.

Финансирование

Работа выполнена в рамках гранта №0829/ГФ «Создание биосовместимых раневых покрытий с использованием культивированных клеток кожи для регенерации ожоговых ран» по приоритету «Наука о жизни» бюджетной программы Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- Halliwell B., Cuttidge J.M.S, Cross C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? // J. Lab. Clin. Med. – 1992. – Vol. 119, №6. – P. 598-620.
- Papas A.M. (ed.) Antioxidants status, diet, nutrition and health. – London: RC Pres, 1999. – 650 p.
- Choi S.W., Mason J.B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme // Journal of Nutrition. – 2000. – Vol. 130. – P. 129-132.
- Stover P.J. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease // Nutrition Reviews. – 2004. – Vol. 62. – P. S3-S13.
- Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1976. – Vol. 3685, №73. – P. 89.
- Wilson J.X. Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium // BioFactors. – 2009. – №35(1). – P. 5-13.

7. Bowman G.L., Dodge H., Frei B. et al. Ascorbic acid and rates of cognitive decline in Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2009. – Vol. 16(1). – P. 93-98.
8. Gann P.H. Randomized trials of antioxidant supplementation for cancer prevention: first bias, now chance—next, cause // *Journal of the American Medical Assoc.* – 2009. – Vol. 301. – P. 102-103.
9. Vargas Arigony A.L., Marques de Oliveira I., Machado M., Bordin D.L., Bergter L., Prá D., Pêgas Henriques J.A. The Influence of Micronutrients in Cell Culture: A Reflection on Viability and Genomic Stability // *Bio. Med. Research International*. – 2013. – Vol. 3. – 22 p.
10. Stewart M.S., Cameron G.S., and Pence B.C. Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1996. – Vol. 106, №5. – P. 1086-1089.
11. Sweetman S.F., Strain J.J., McKelvey-Martin V.J. Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells // *Nutrition and Cancer*. – 1997. – Vol. 2013. – Article ID 157240. – P. 11.
12. Traber M.G., Stevens J.F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2011. – Vol. 51, №5. – P. 1000-1013.
13. Boyera N., Galey I., Bernard B.A. Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts // *Int. J. Cosmetic Sci.* – 1998. – Vol. 20(3). – P. 151-158.
14. Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., Kristina M.C. et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 8749-8754.
15. Azqueta A., Collins A.R. Carotenoids and DNA damage // *Mutation Research*. – 2012. – Vol. 733, №1-2. – P. 4-13.
16. Sommer A., Vyas K.S. A global clinical view on vitamin A and carotenoids // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2012. – Vol. 96. – suppl. 5. – P. 1204S-1206S.
17. Palozza P., Serini S., Di Nicuolo F., Piccioni E., Calviello G. Prooxidant effects of β -carotene in cultured cells // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2003. – Vol. 24, №6. – P. 353-362.
18. Lee L.M., Leung C.Y., Tang W.W. et al. A paradoxical teratogenic mechanism for retinoic acid // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2012. – Vol. 109, №34. – P. 13668-13673.
19. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2004. – Vol. 1660 (1-2). – P. 171-199.
20. Navas P., Villalba J.M., de Cabo R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses // *Mitochondrion*. – 2007. – Vol. 7. – P. S34-S40.
21. Giwa S.A., Swan E.P. Heartwood extractives of a Western larch tree (*Larix occidentalis* nutt.) // *Wood and Fiber*. – 1975. – №7. – P. 216-221.
22. Potapovich A.I., Kostyuk V.A. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2003. – Vol. 68(5). – P. 514-519.
23. Tikhonov V.P., Makarova M.N., Zajtseva M.A., Makarov V.G. Efficacy of (\pm)-taxifolin from *Larix sibirica* (Münchh.) Ledeb. on blood pressure in experiments *in vivo* // *Planta Med.* – 2006. – №72. – P. 174.
24. Наумов А.А., Поцелуева М.М., Шаталин Ю.В. Воздействие наноконлекса, содержащего антиоксидант, липид и аминокислоту, на раневую поверхность, вызванную термическим ожогом // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2010. – №1. – С. 69-73.
25. Stewart A.F., Kim E.D. Harmful Effects of Antioxidant Therapy. In Parekattil S. J., Agarwal A. (eds.) *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*. Luxembourg, Springer Science + Business Media . – 2012. – P. 499-506.
26. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л.П. Дьяконова. – М.: Спутник, 2009. – 308 с.
27. Danlybaeva G., Isabekova A., Akhmadeyeva Z. Effects of Antioxidants and Vitamins on the Proliferation of Human Diploid Cells // *International Scientific Conference “Personalized medicine & global health”* October, 16-19, 2013, Astana, Kazakhstan // *Central Asian Journal Of Global Health*. – 2013. – Vol. 2. – P. 35.
28. Децина А.Н. Теория мягких косметологических воздействий. Современная косметология. – Новосибирск, 2001. – 505 с.

REFERENCES

1. Halliwell B., Cuttridge J.M.S, Cross C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 1992, vol. 119, no. 6, pp. 598-620.
2. Papas A.M. (ed.) *Antioxidants status, diet, nutrition and health*. Lond.: CRC Pres., 1999, 650 p.
3. Choi S.W., Mason J.B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *Journal of Nutrition*, 2000, vol. 130, pp. 129-132.
4. Stover P.J. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutrition Reviews*, 2004, vol. 62, pp. S3-S13.
5. Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1976, vol. 3685, no. 73, pp. 89.

6. Wilson J.X. Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *BioFactors.*, 2009, no. 35(1), pp. 5-13.
7. Bowman G.L., Dodge H., Frei B. et al. Ascorbic acid and rates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2009, vol. 16(1), pp. 93-98.
8. Gann P.H. Randomized trials of antioxidant supplementation for cancer prevention: first bias, now chance-next, cause. *Journal of the American Medical Assoc.*, 2009, vol. 301, pp. 102-103.
9. Vargas Arigony A.L., Marques de Oliveira I., Machado M., Bordin D.L., Bergter L., Prá D. and Pêgas Henriques J.A. The Influence of Micronutrients in Cell Culture: A Reflection on Viability and Genomic Stability. *Bio. Med. Research International.*, 2013, vol. 3, 22 p.
10. Stewart M.S., Cameron G.S., Pence B.C. Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *Journal of Investigative Dermatology*, 1996, vol. 106, no. 5, pp. 1086-1089.
11. Sweetman S.F., Strain J.J., McKelvey-Martin V.J. Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells. *Nutrition and Cancer*, 1997, vol. 2013, article ID 157240, pp. 11.
12. Traber M.G., Stevens J.F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, vol. 51, no. 5, pp. 1000-1013.
13. Boyera N., Galey I., Bernand B.A. Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts. *Int. J. Cosmetic Sci.*, 1998, vol. 20(3), pp. 151-158.
14. Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., Kristina M.C. et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, vol. 104, pp. 8749-8754.
15. Azqueta A., Collins A.R. Carotenoids and DNA damage. *Mutation Research.*, 2012, vol. 733, no. 1-2, pp. 4-13.
16. Sommer A., Vyas K.S. A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, vol. 96, suppl. 5, pp. 1204S-1206S.
17. Palozza P., Serini S., Di Nicuolo F., Piccioni E., and Calviello G. Prooxidant effects of β -carotene in cultured cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003, vol. 24, no. 6, pp. 353-362.
18. Lee L.M., Leung C.Y., Tang W.W. et al. A paradoxical teratogenic mechanism for retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2012, vol. 109, no. 34, pp. 13668-13673.
19. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, vol. 1660(1-2), pp. 171-199.
20. Navas P., Villalba J.M., de Cabo R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion.*, 2007, vol. 7, pp. S34-S40.
21. Giwa S.A., Swan E.P. Heartwood extractives of a Western larch tree (*Larix occidentalis* nutt.). *Wood and Fiber*, 1975, no. 7, pp. 216-221.
22. Potapovich A.I., Kostyuk V.A. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. *Biochemistry (Mosc.)*, 2003, vol. 68(5), pp. 514-519.
23. Tikhonov V.P., Makarova M.N., Zajtseva M.A., Makarov V.G. Efficacy of (\pm)-taxifolin from *Larix sibirica* (Mûnchh.) Ledeb. on blood pressure in experiments *in vivo*. *Planta Med.*, 2006, no. 72, pp. 174.
24. Naumov A.A., Pocolueva M.M., Shatalin Yu.V. Vozdejstvie nanokompleks-soderzhashchego antioksidant, lipid i aminokislota na ranevuyu poverhnost vyzvannuyu termicheskim ozhogom. *Byulleten-eksperimentalnoi biologii i mediciny*, 2010, no. 1, pp. 69-73.
25. Stewart A.F., Kim E.D. Harmful Effects of Antioxidant Therapy. In Parekattil S.J., Agarwal A. (eds.) *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*. Luxembourg, Springer Science + Business Media, 2012, pp. 499-506.
26. Zhivotnaya kletka v culture (metody I primeneniya v biotekhnologii) / pod red. L.P. Dyakonova. M.: Izd-vo Sputnik, 2009, 308 s.
27. Danlybaeva G., Isabekova A., Akhmadeyeva Z. Effects of Antioxidants and Vitamins on the Proliferation of Human Diploid Cells. International Scientific Conference "Personalized medicine & global health", October, 16-19, 2013, Astana, Kazakhstan. *Central Asian Journal Of Global Health*, 2013, vol. 2, pp. 35. <http://dx.doi.org/10.5195/caigh.2013.112>.
28. Decina A.N. Teoriya myagkih kosmetologicheskikh vozdejstvij. *Sovremennaya kosmetologiya*. Novosibirsk, 2001, 505 s.

АДАМ ЖАСУШАЛАРЫНЫҢ ФУНКЦИОНАЛДЫ БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ АНТИОКСИДАНТТАР МЕН ДӘРУМЕНДЕРДІҢ IN VITRO ЖАҒДАЙЫНДАҒЫ ӘСЕРІ

Даңлыбаева Г.А., Ақмадеева Ж.Т.

*Ұлттық биотехнология орталығы
Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан
dgaziza@gmail.com*

ТҮЙІН

Жасуша өсінділері – алуан түрлі биомедициналық зерттеулерде қолданылатын негізгі құрал өз дамуын өткен ғасырдың ортасынан бастады.

Ағзаның ұлпаларынан бөлінген жасушалар жасанды қоректік ортаның құрамына белгілі талаптар қояды. Жасушаның тіршілік ету қабілетін сақтау үшін құрамында минералды тұздар, дәрумендер, амин қышқылдары және басқа заттары бар синтетикалық қоректік орталардың (199, 703, Игла ортасы және басқалар да), бірнеше түрлері белгілі. Құнды жасуша өсінділерін өсіру үшін синтетикалық орталарға қанның сарысуы қосылады, ол микроэлементтер және ақуыздар, өсу факторларын негізгі көзі болып табылады. Қазіргі уақытта стандартты жасанды қоректік орталардан басқа пролиферативтік белсенділігі төмен жасушаларды тиімді көбейту үшін арнайы орталарды әзірленеді. Дегенмен, олардың бағасының жоғары болуына байланысты жасуша препараттарын жаппай өндіруге мүмкіндік бермейді.

Жасуша материалының қажетті мөлшерін алу үшін жасушалардың экспансиясы қажет, яғни жеткілікті мөлшерде көбейту. Бұл мәселені шешудің негізгі бағыты – жасушалардың бөлінуіне әсер ететін, әр түрлі факторлар мен кондиционерленген жасушалар ортасын қолдану, өсіруге оңтайлы ортаны таңдау болып табылады. Сондықтан стандартты орталарға өсу факторлары, дәрумендер немесе антиоксиданттар (физиологиялық деңгейде тең емес концентрацияда) қосылады.

Мақалада 4 түрлі дәрумендер және антиоксиданттардың диплоидты жасуша өсіндісінің ақуыздар экспрессиясы мен пролиферативтік белсенділігіне, тіршілік ету қабілетіне әсер ететіні туралы мәліметтер берілген. Қоректік ортасына дәрумендер мен антиоксиданттардың аз мөлшердегі уытсыз концентрациясын қосқанда ұзақ мерзімде өсірілетін жасуша өсінділерінің пролиферациясына әр түрлі әсер етеді: пролиферациялық жасушаларды ыңталандырудан жойып жіберуге дейін.

Негізгі сөздер: дәрумендер, антиоксиданттар, С дәрумені, ретиноидты қышқыл, коэнзим Q10, дигидрокверцетин, адамдардың диплоидты фибробластары, MCF-7 және HeLa ұзақ уақыт мерзімінде өсірілетін жасуша өсінділері.