НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет ветеринарної медицини

«Лабораторна оцінка характеристик біологічно активних препаратів з протизапальними властивостями на прикладі бетаїну»

Автор роботи: Федишин Петро Михайлович
Науковий керівник: Калачнюк Лілія Григорівна

Актуальність проблеми

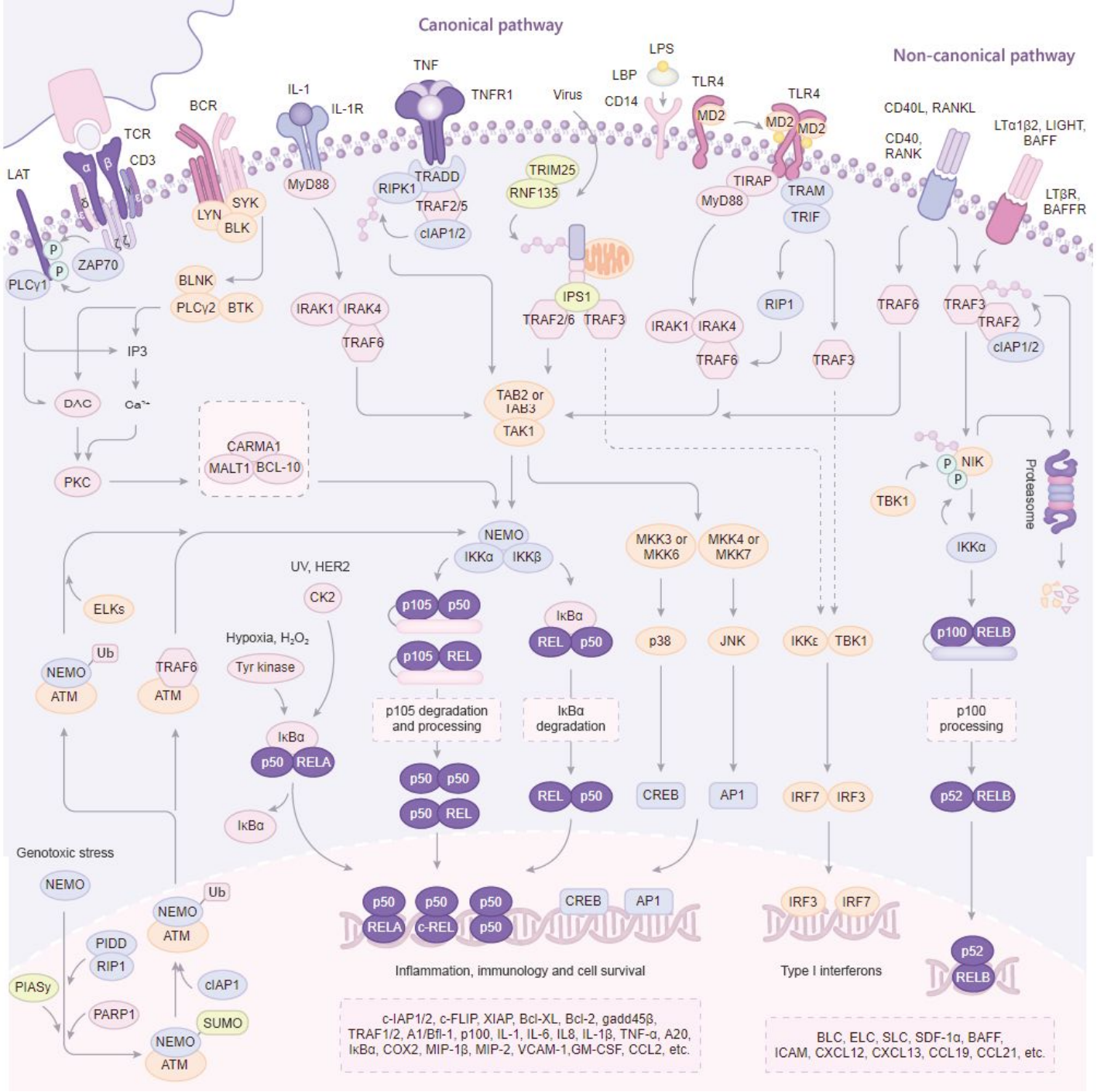
- Попередження небажаних наслідків доступної, дешевої і, як наслідок, менш якісної дієти дозволить покращити здоров’я тварин та підвищити їх продуктивність не збільшуючи вартість їх утримання, що в свою чергу позитивно вплине на рентабельність тваринництва – яка є ключовим моментом для інвесторів та фермерів.
- Загострення проблем охорони здоров'я (пандемія Covid-19, і, як наслідок, погіршення матеріального достатку й психологічного здоров'я населення, що загострили питання здорового харчування та алкоголізму серед населення) збільшило кількість й масштаб досліджень у цих «проблемних» напрямках – а отримані найновіші й більш глибокі дані можуть бути застосовані у ветеринарній медицині.

Мета роботи

- Дослідження впливу бетаїну на клітини, що є мішенями за розвитку АХП, НАЖХП та Covid-19, для створення у подальшому стандартного протоколу досліджень біоактивних препаратів «ОВА+» та «Біофосфомаг».

Завдання роботи

1. Дослідити особливості запальних процесів за АХП, НАЖХП та Covid-19. Вивчити механізм цитокін опосередкованої протизапальної дії бетаїну та проаналізувати його потенційну ефективність за даних паталогій.
2. Враховуючи особливості вищезазначених процесів, обрати тип клітин для подальших досліджень на клітинних моделях.
3. Провести першу серію експериментів на клітинній моделі для дослідження загального впливу різних концентрацій бетаїну на клітини, і проаналізувати отриманні результати.



- Протизапальна дія бетаїну базується на здатності пригнічувати продукцію IL-1β за допомогою канонічних (регулює активацію TLR4…) і неканонічних механізмів.

- За АХП механізм запалення зумовлений активацією метаболітами кишкової мікробіоти рецептора TLR4, що призводить до вивільнення цитокінів й алкогольного ураження печінки.

- За НАЖХП відбуваються два паралельні процеси розвитку запалення. Перший – активація метаболітами кишкової мікробіоти рецептора TLR4 й подальшого синтезу цитокінів. Другий пов’язаний із жировою тканиною, що бере участь у секреції адипонектину, лептину, TNF й IL-6, а також є джерелом пальмітинової кислоти, цераміду – що порушують функції мітохондрій, викликають окисний стрес і загибель адипоцитів.

- За COVID-19 процеси запалення зумовлені продукцією саме IL-1β.

- Клітини-мішені – ендотеліоцити.

Матеріали та методи

Експеримент було поставлено на клітинах лінії PAE (ендотеліальні клітини аорти свині). Культивували клітини у середовищі DMEM (Sigma, США) з 10% сироватки зародка бика (Sigma, США) – у інкубаторі CO_2 за 95% вологості, 5% вмісту CO_2 та при температурі 37 ± 1 ° С.

Підрахунок клітин проводився за допомогою світлового мікроскопу у камері Горяєва.

Оцінка морфологічних даних проводилась за допомогою інвертованого мікроскопу AxioVert (Carl Zeiss) – із програмним забеспеченям AxioVision. Фотографували за допомогою Digital Still Camera із об’єктивом Carl Zeiss Vario-Sonar.

Рівень поглинання глюкози визначали методом на основі реакції із глюкозооксидазою.

Активність мітохондріальних ензимів, переважно сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1) – за допомогою МТТ тесту.

Концентрацію ТБК-активних сполук, а саме малонового диальдегіду (МДА), рівень загальних SH-груп, та активність каталази (КФ 1.11.1.6) – згідно зазначених методів відповідно [18-20].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп’ютерної програми «STATISTICA 8.0».

Підтверджено відсутність токсичного ефекту за дії бетаїну у різних концентраціях. Фарбування трипановим синім показало збільшення концентрації ендотеліоцитів порівняно із контрольним зразком – за концентрації бетаїну 0,5 мг/мл та 1 мг/мл (табл. 1).

Таблиця 1 - Концентрація клітин та відсоток мертвих клітин за різних концентрацій бетаїну.

	4 мг/мл	2 мг/мл	1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,125 мг/мл	контроль
Концентрація клітин (х1000)	56,2±8,9	71,3±11,7	85,5±4,8*	78,4±3,4	64,6±11,9	69,4±5,7
% мертвих клітин	2,3±0,4	8,4±4,2	4,9±1,6	2,3±0,6	6,4±1,2	3,5±0,6

Прим. *- p<0,05, порівняно з контролем

Зафіксовано збільшення поглинання глюкози клітинами за концентрації бетаїну 1 та 0,125 мг/мл, що свідчить про посилення активності метаболічних процесів (табл. 2). Слід зазначити, що збільшення концентрації бетаїну до 2 та 4 мг/мл майже не вплинуло на інтенсивність поглинання глюкози клітинами – що можна пояснити впливом такої концентрації препарату на осмотичні процеси і як наслідок, процес транспорту глюкози до клітини.

Таблиця 2 - 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 (х1000)	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 (mkM)	5,1±0,2	4,4±0,7	7,4±0,1*	5,5±0,4	7,6±0,3*	4,9±0,4

Прим. *- p<0,05, порівняно з контролем

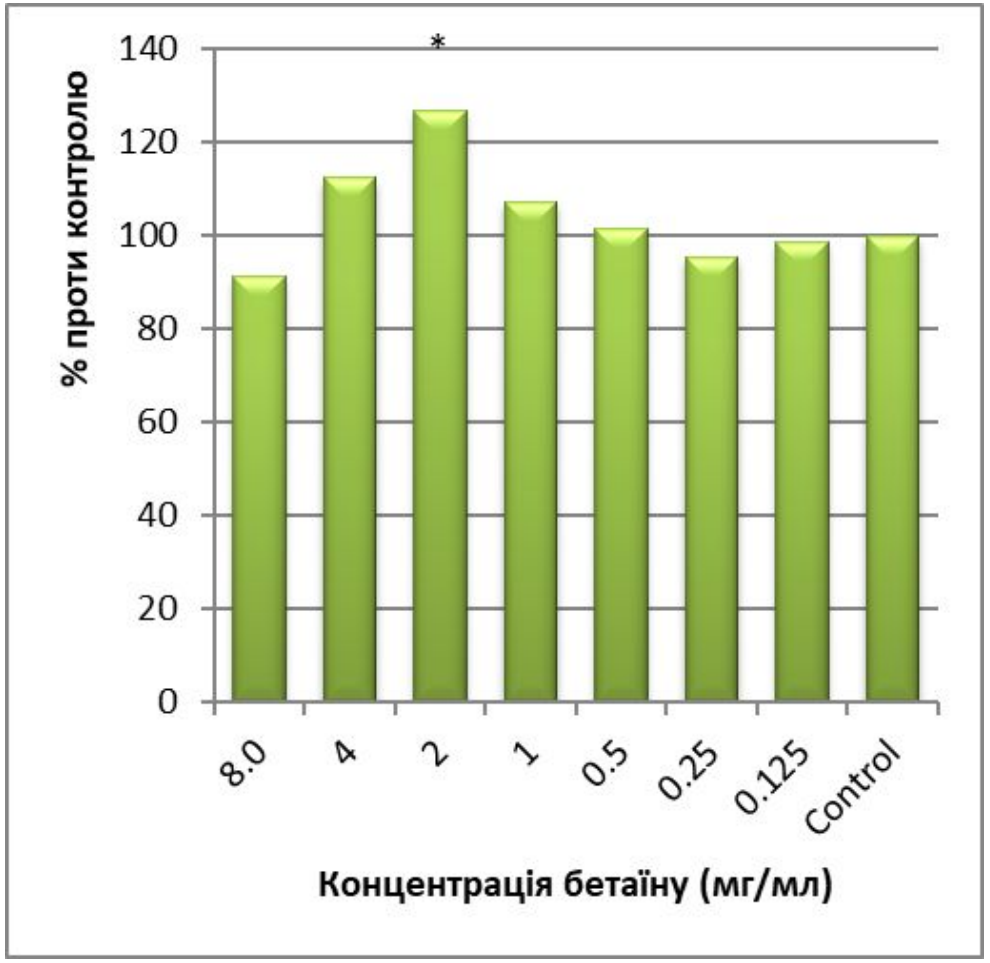


Рис. 2 - Відсоток оптичного поглинання порівняно з контролем за дії бетаїну визначені в МТТ-тесті.

Активність мітохондріальних ензимів (переважно сукцинатдегідрогенази) суттєво зросла за концентрації 2 мг/мл та 4 мг/мл – на 33% та 40% відповідно. І майже не змінилась за концентрації 1 мг/мл і менше (рис. 2). Це свідчить про збільшення інтенсивності процесів енергетичного метаболізму, зокрема підвищення активності електрон-транспортного ланцюга та процесів окиснювального фосфорилювання.

Зафіксовано збільшення активності каталази на 46% за концентрації бетаїну 2 мг/мл (рис. 3). Враховуючи, що рівень активності каталази напряму залежить від кількості її субстрату (перекису водню), можна казати про збільшення продукції активних форм кисню.

Також за концентрації 2 мг/мл спостерігалось значне зниження (майже на 20%) рівня загальних SH-груп (рис. 4), тобто можна казати про зниження кількості відновленого глутатіону (GSH). Існують дві імовірні причини цього. Перша пов' язана із окисненням відновленого глутатіону (GSH) до окисненої форми (G-S-S-G) – аргументом цього є збільшення активності каталази. Друга стосується впливу бетаїну на метіоніновий цикл, а саме, він зменшує продукцію попередника глутатіона у цьому циклі – гомоцистеїну.

Відсутність збільшення кількості МДА (рис. 4) свідчить про відсутність наслідків окисного стресу, не зважаючи на підвищення інтенсивності окисно-відновних процесів у клітинах.

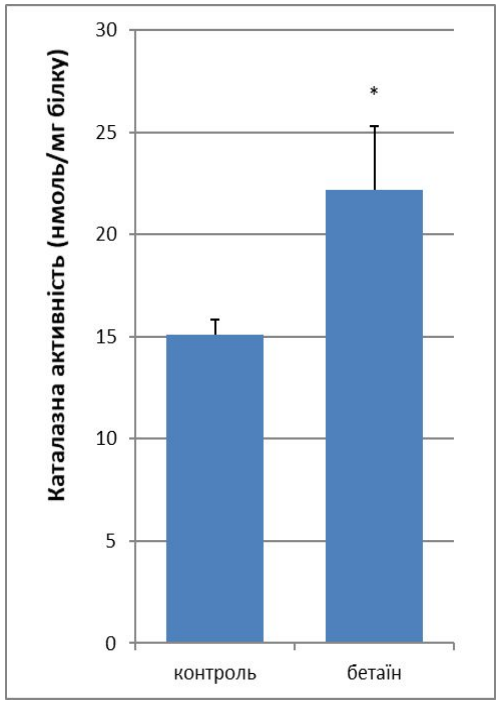


Рис. 3 - Активність каталази за дії бетаїну.

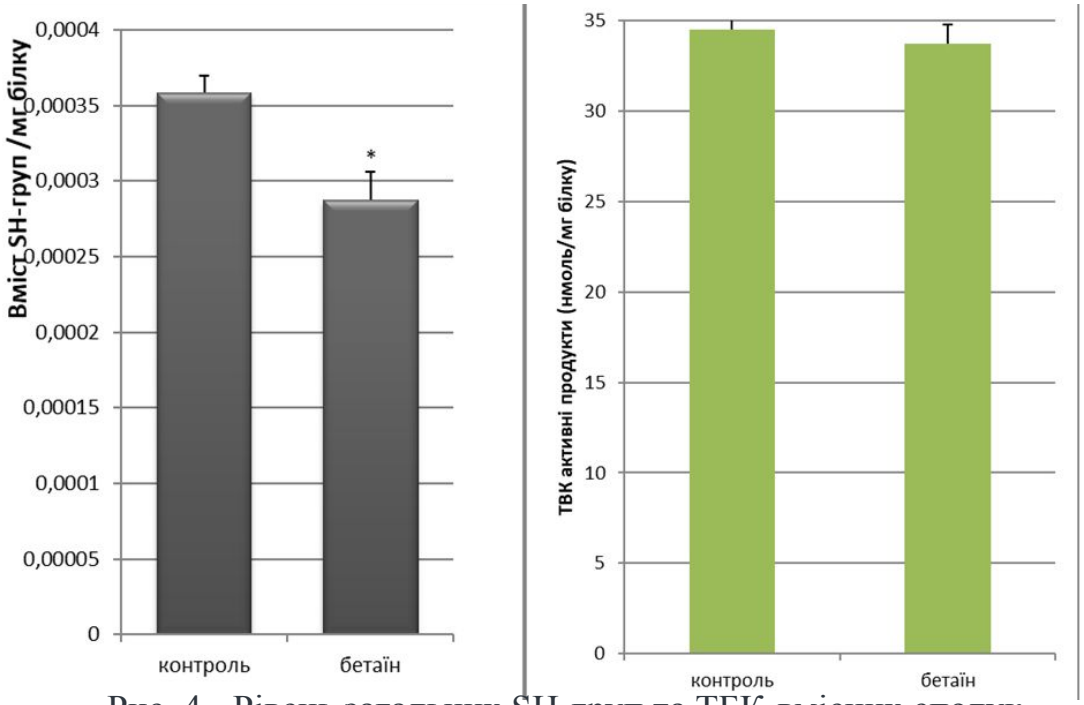


Рис. 4 - Рівень загальних SH-груп та ТБК-вмісних сполук.

Висновки

1. Бетаїн може бути ефективним протизапальним засобом за АХП та Covid-19 через його здатність інгібувати секрецію IL-1β, а його здатність стимулювати метаболічні й проліферативні процеси ендотеліальних клітин, дисфункція яких є складовою патогенезу АХП, НАЖХП та Covid-19, є аргументом щодо його потенційної терапевтичної ефективності за даних патологій.

2. Найбільш перспективною для подальших досліджень є концентрація бетаїну 1 мг/мл – за такої концентрації фіксувалось збільшення поглинання глюкози клітинами, та відмічався розвиток як морфології окремих клітин, так і ускладнення їх структури у просторі. Менші концентрації – 0,5 та 0,125 мг/мл – не продемонстрували достовірних змін порівняно із контролем. Збільшення концентрації до 2 мг/мл і вище сприяло підвищенню продукції активних форм кисню, що відповідним чином навантажило антиоксидантні механізми клітин (каталаза, глутатіон).

3. Отримано експериментальні дані оцінки біоактивного препарату (бетаїну), які в майбутньому ляжуть в основу проєкту протоколу лабораторних досліджень біопрепаратів – «ОВА+», «Біофосфомаг» та інших.

Патент. Арнаута О.В., Михайлюк М.М., Калачнюк Л.Г., **Федишин П.М**., Павлюк О.В. Спосіб виготовлення препарату ветеринарного призначення «ОВА+» UA147929U Бюл.№ 25 від 23.06.2021

Опубліковані статті:

- Kalachniuk, L., **Fedyshyn, P.,** Smirnov, O., Prys-Kadenko, V., Palonko, R., & Arnauta, O. (2021). Bio protectors' effect on the composition of some amino acids under alcohol-induced oxidative stress. *EUREKA: Life Sciences*, (4), 50-57. doi: https://doi.org/10.21303/2504-5695.2021.001985 (Copernicus)
- К. Калиновська, **П. Федишин**, Л. Калачнюк, Л. Гарманчук, О. Смірнов. (2021). Вплив бетаїну на ендотеліальні клітини. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. 3(86), С.48-52. DOI 10.17721/1728.2748.2021.86.48-53

Опубліковані тези:

- **Fedyshyn P**., L.Smirnov, O., Kalachniuk L. (2021). Analysis of the influence of alcohol-induced stress on the quantitative and qualitative composition of amino acids related to SAM and GSH transformations. ISPEC 7th International conference on agriculture, animal sciences and rural development, September 18-19, 2021 / Mus Alparslan University, Turkey.
- **Федишин П.М.,** Калиновська К.О., науковий керівник – Калачнюк Л.Г. (2021). Дія бетаїну за різних концентраціях на морфологію і життєдіяльність ендотеліальних клітин лінії PAE. Діджиталізація науки як виклик сьогодення: матеріали II Міжнародної студентської наукової конференції (Т. 2), м. Одеса, 17 грудня, 2021.
- **Федишин П.М.,** Калиновська К.О., Калачнюк Л.Г. (2021). Біохімічні показники стану ендотеліальних клітин лінії PAE за дії бетаїну у різних концентраціях. VI Міжнародна науково-практична конференція "Topical issues of modern science, society and education ", 26-28 грудня 2021 р., Харків, Україна.