

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПОСЛЕ ВЫРАЩИВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ

*\*Новаш Д.С., \*\*Бутенко А.В., \*Лукашов Р.И., \*\*Квачева З.Б.*

*\*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

*\*\*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»*

*Минск, Республика Беларусь*

*denisnovash@gmail.com;*

*annabutenka@tut.by, r\_lukashov@mail.ru, kvachzb@tut.by*

*Установлена поглощающая способность фибробластов дермы человека в отношении экзогенной кофейной кислоты и ее высокий антиоксидантный потенциал, защищающий клетки от деструктивного влияния активных форм кислорода (АФК). В концентрации 100 мкМ кофейная кислота поглощается клетками практически полностью, токсические эффекты в этой концентрации для клеток не выявлены. В более высоких концентрациях 200 и 300 мкМ кофейная кислота поглощается клетками частично, остается в культуральной жидкости в концентрациях 100 мкМ и более, за счет чего начинает проявлять токсическое действие на фибробласты.*

**Ключевые слова:** *антиоксидантная активность; поглощающая способность; кофейная кислота; фибробласты дермы человека.*

## ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CULTURAL LIQUID AFTER CULTIVATION FIBROBLAST OF HUMAN DERMIS IN THE PRESENCE OF COFFEIC ACID

*\*Novash D.S., \*\*Butenka A.V., \*Lukashou R.I., \*\*Kvacheva Z.B.*

*Belarusian State Medical University,*

*\*\*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of  
Sciences of Belarus*

*Minsk, Belarus,*

*The absorptive capacity of human dermis fibroblasts in relation to exogenous caffeic acid and its high antioxidant potential, which protects cells from the destructive effects of reactive oxygen species (ROS), have been established. The absorption capacity of human dermis fibroblasts in relation to exogenous caffeic acid has been established. At a concentration of 100  $\mu$ M, caffeic acid is almost completely absorbed by cells; toxic effects at this concentration for cells have not been revealed. At higher concentrations of 200 and 300  $\mu$ M, caffeic acid is partially absorbed by the cells, remains in the culture liquid at concentrations of 100  $\mu$ M or more, due to which it begins to exhibit a toxic effect on fibroblasts.*

**Key words:** *antioxidant activity; absorption capacity; caffeic acid; human dermal fibroblasts.*

**Актуальность.** Кофейная (3,4-дигидроксикоричная) кислота относится к группе фенилпропаноидных метаболитов растительных тканей и оказывает противовоспалительное, противоопухолевое, антисклеротическое, антибактериальное действие, повышает продукцию и устойчивость к окислению коллагена, защищает кожу от негативного воздействия ультрафиолетовых

лучей. Данный спектр свойств делает кофейную кислоту перспективным компонентом лекарственных форм, предназначенных для лечения дерматологических заболеваний, и косметических средств для ухода за кожей [1, 2].

Многие из указанных выше эффектов можно связать с высоким антиоксидантным потенциалом кофейной кислоты, защищающим клетки от деструктивного влияния активных форм кислорода (АФК). Данный потенциал реализуется двумя основными путями: через прямое взаимодействие с АФК, а также через хелатирование прооксидантных ионов металлов (например, ионов железа) [3]. Также стоит отметить тот факт, что антиоксиданты в больших дозах могут проявлять прооксидантное действие (например, аскорбиновая кислота начинает восстанавливать ионы  $Fe^{3+}$ , которые затем вступают в реакцию Фентона, генерируя АФК) [4].

Учитывая перспективы применения кофейной кислоты в косметологии рационально рассмотреть ее влияние на культуру фибробластов дермы человека, являющихся основными клетками кожи.

При этом важным аспектом является изучение способности фибробластов поглощать из культуральной среды кофейную кислоту для включения в свой клеточный метаболизм. Для оценки остаточного содержания данного вещества в культуральной жидкости были использованы ее антиоксидантные свойства. Можно предположить, что антиоксидантный потенциал культуральной жидкости свидетельствует не только о содержании в ней кофейной кислоты, но и об ее возможном негативном прооксидантном действии на фибробласты.

**Цель исследования** – определить антиоксидантные свойства культуральной жидкости после выращивания фибробластов дермы человека в присутствии кофейной кислоты с оценкой ее клеточной биодоступности (поглощающей способности) и способности включаться в метаболизм клеток.

**Материалы и методы.** С учетом растворимости кофейной кислоты в водных средах максимальная концентрация данного вещества в фосфатном буфере (PBS) составила 300 мкМ.

В экспериментах использовали односуточную культуру фибробластов кожи человека 3-7 пассажа с 80% сформированным монослоем в стадии логарифмического роста, выращенную на покровных стеклах во флаконах. В качестве ростовой среды использовали Дульбеко модифицированную среду Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). После смены среды на поддерживающую (DMEM и 2% ЭТС) вносили раствор кофейной кислоты в PBS pH 7.2 в концентрациях в среде: 300, 200, 100, 10 и 1 мкМ. В контрольные культуры после смены среды вместо препарата вносили PBS. Через 24 ч инкубации в  $CO_2$ -инкубаторе проводили оценку морфологии культур (опытных и контрольных) используя фазовоконтрастный микроскоп Olympus.

В качестве объекта исследования антиоксидантной активности (АОА) использовали образцы культуральной жидкости после выращивания фибробластов дермы человека в течение 24 ч. Определение антиоксидантных свойств проводили спектрофотометрическим методом с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH·). Суть метода состоит в том, что DPPH·, являясь радикалом, восстанавливается антиоксидантами культуральной

жидкости. При этом интенсивность окрашивания системы уменьшается пропорционально содержанию антиоксидантов.

Для приготовления испытуемого раствора использовали 0,400 мл культуральной жидкости, к которой прибавляли 2,80 мл 0,01% спиртового раствора DPPH с учетом относительности метода. Измерение проводили через 30 мин после смешивания. Компенсационный раствор получали смешением 0,400 мл культуральной жидкости и 2,80 мл 96% спирта. Контрольный раствор готовили аналогично испытуемому с использованием культуральной жидкости контрольной культуры фибробластов, которая выращивалась без кофейной кислоты.

Расчеты проводили по формуле:

$$AOA = (A_0 - A) \cdot 100\% / (A_0),$$

где AOA – процент поглощения радикалов культуральной жидкостью;

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

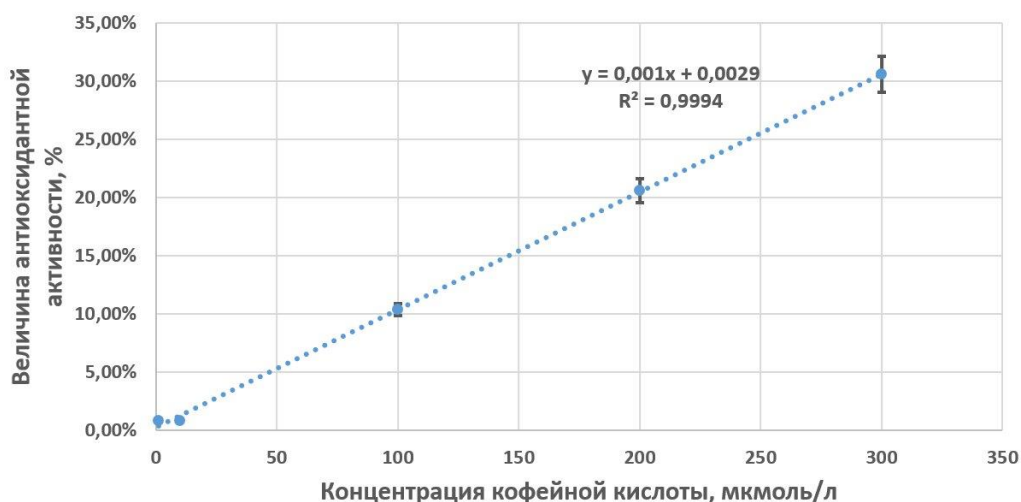
A<sub>0</sub> – оптическая плотность контрольного раствора.

Аналогичные измерения и расчеты проводили для серии растворов кофейной кислоты в PBS, полученных методом последовательного разведения: 300, 200, 100, 10 и 1 мкмоль/л (модельные растворы). Для испытуемого раствора и его компенсационного раствора отбирали раствор кофейной кислоты в PBS в соответствующей концентрации, для контрольного раствора и его компенсационного раствора такой же объем 96% спирта.

Все измерения проводили трижды ( $n = 3$ ;  $P = 95\%$ ) на спектрофотометре Solar серии PB 2201 при длине волны 517 нм.

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами было установлено, что концентрация кофейной кислоты 100 мкМ является максимальной переносимой для исследуемой культуры дермальных фибробластов, а концентрации 300 и 200 мкМ вызвали деструкцию более 60% клеток в монослое.

Зависимость величины AOA модельных растворов от концентрации кофейной кислоты отражена на графике (рисунок 1).

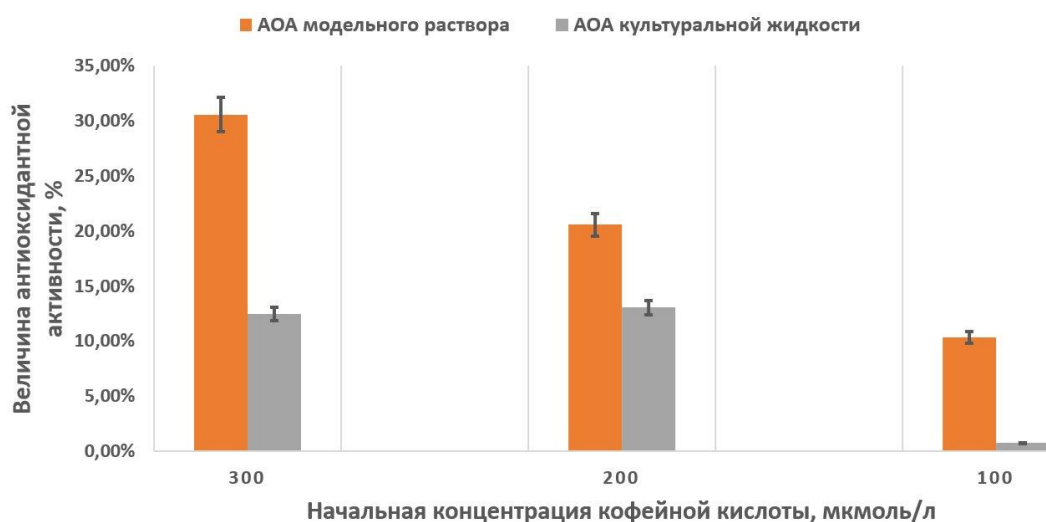


**Рисунок 1** – Зависимость величины антиоксидантной активности от концентрации кофейной кислоты

Как видно из рисунка 1, зависимость величины AOA от концентрации кофейной кислоты в диапазоне 10–300 мкмоль/л носит линейный характер.

Величины АОА растворов в концентрациях 1 и 10 мкМ статистически значимых отличий не имели ( $p = 0,98 > 0,05$ ;  $t_{\text{крит1}} = 12,7$ ;  $t = 0,028$ ;  $|t| < t_{\text{крит1}}$ ). Нижняя граница доверительного интервала для растворов кофейной кислоты в концентрациях 10 и 1 мкМ опускалась ниже нуля, что говорит о низкой чувствительности методики и высоком пороге определения.

Таким образом, достоверно определить кофейную кислоту в концентрации менее 10 мкМ в культуральной жидкости по величине АОА не представляется возможным.



**Рисунок 2** – Антиоксидантная активность культуральной жидкости с кофейной кислотой и модельных растворов кофейной кислоты

На рисунке 2 представлено значительное уменьшение величины АОА культуральной жидкости после инкубации культуры фибробластов с кофейной кислотой в течение 24 ч по сравнению с модельными растворами.

Из рисунка 2 видно, что за 24 ч культура фибробластов дермы человека при инкубации с начальной концентрацией кофейной кислоты 100 мкМ практически полностью поглощает ее, не оставляя ее в больших концентрациях в культуральной жидкости. При этом концентрация 100 мкМ является максимальной переносимой для исследуемой культуры клеток.

При увеличении начальной концентрации до 200 мкМ отмечено уменьшение АОА в среднем на 36,5% (отн.) по сравнению с модельным раствором, что связано с уменьшением концентрации кофейной кислоты в культуральной жидкости. Однако данное снижение не такое резкое ( $p = 0,00296 < 0,05$ ;  $t_{\text{крит2}} = 4,3$ ;  $t = 18,3$ ;  $|t| > t_{\text{крит2}}$ ), как можно было ожидать в случае увеличения концентрации субстрата. Данный факт может свидетельствовать о переизбытке кофейной кислоты в культуральной жидкости (расчетная концентрация составила 127,7 мкМ) и проявлении ею токсического действия, что подтверждается данными изменения морфологии клеток.

Дальнейшее увеличение начальной концентрации вносимого антиоксиданта до 300 мкМ привело к более резкому (в 2,5 раза; ( $p = 0,0038 < 0,05$ ;  $t_{\text{крит3}} = 4,3$ ;  $t = -16,2$ ;  $|t| > t_{\text{крит3}}$ )) его поглощению культурой клеток, хотя величина АОА культуральной жидкости находится на уровне начальной концентрации 200 мкМ ( $p = 0,66 > 0,05$ ;  $t_{\text{крит4}} = 12,7$ ;  $t = -0,59$ ;  $|t| < t_{\text{крит4}}$ ).

Поскольку обнаружено токсическое действие кофейной кислоты в концентрации 200 мкМ, то объяснение более резкого уменьшения АОА при 300 мкМ, чем ожидалось, может быть связано с изменением поведения самой кофейной кислоты. Это вещество, вероятно, в низких концентрациях ведет себя в культуре клеток как обычный антиоксидант, однако при сильном увеличении ее концентрации проявляет прооксидантные свойства, т.е. кофейная кислота, по сути, нивелирует свое же антиоксидантное действие, что подтверждается одинаковой величиной АОА культуральной жидкости в начальных концентрациях 300 и 200 мкМ.

**Выводы.** Фибробласты дермы человека поглощают экзогенную кофейную кислоту из культуральной среды и включают ее в свой метаболизм, обеспечивающий антиоксидантную защиту клеток. Это подтверждается тем, что в концентрации 100 мкМ поглощение происходит практически полностью, без явных токсических эффектов. В более высоких концентрациях 200 и 300 мкМ кофейная кислота из культуральной жидкости поглощается не полностью (остаточное содержание в культуральной жидкости 100 мкМ и более) и оказывает уже токсическое действие на культуру фибробластов, предположительно, за счет проявления в высоких концентрациях прооксидантных свойств.

### Список литературы

1. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics / С. Magnani [et al.] // *Analytical Methods*. – 2014. – № 6 (10). – Р. 1–9. Doi: 10.1039/c3ay41807c.
2. Caffeic Acid-layered Double Hydroxide Hybrid: A New Raw Material for Cosmetic Applicationis / М. Bastianini [et al.] // *Cosmetics*. – 2018. – № 5 (51) [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://doi.org/10.3390/cosmetics5030051>. – Дата доступа а: 22.08.2021.
3. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview / J. Teixeira[et al.] // *Biomed Res Int*. – 2013 [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23956973/>. – Дата доступа : 22.08.2021.
4. Savel, J. Fenton reaction acceleration using maltose and ascorbic acid / J. Savel // *Monatsschrift fur Brauwissenschaft*. – 2003. – № 56. – Р. 4–8.