

УДК: 615.322

БИОДОСТУПНОСТЬ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Лукашов Р.И.*¹, Новаш Д.С.¹, Бутенко А.В.², Квачева З.Б.², Полешко А.Г.², Адамович Т.Г.¹,
Гурина Н.С.¹

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

² Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси»

*автор для переписки – e-mail: r_lukashov@mail.ru

Аннотация Кофейная кислота – фенольное соединение, относящееся к классу гидроксикоричных кислот и проявляющее широкий спектр фармакологической активности. Значительный фармакологический потенциал вещества проявляется за счет высоких антиоксидантных свойств, однако в высоких концентрациях возможно проявление прооксидантных свойств. Целью данной работы является определение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии клеточной биодоступности кофейной кислоты для культуры фибробластов дермы человека *in vitro*. Для культивирования фибробластов дермы человека использовали модифицированную Дульбекко среду Игла с телячьей эмбриональной сывороткой. Хроматограммы культуральных жидкостей, полученных после инкубации с кофейной кислотой в концентрациях 100 мкМ (24 и 48 ч), 10 мкМ (24 и 48 ч) и 1 мкМ (24 и 48 ч) не отличались от хроматограммы контрольной культуры фибробластов с фосфатным буферным раствором 7,2. Кофейная кислота в концентрации 100 и менее мкМ поглощается культурой фибробластов дермы человека, что говорит о ее высокой биодоступности.

Ключевые слова: кофейная кислота, культура фибробластов дермы человека, высокоэффективная жидкостная хроматография, клеточная биодоступность.

BIOAVAILABILITY OF CAFFEIC ACID FOR THE CULTURE OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS *IN VITRO*

Lukashov R.I.*¹, Novash D.S.¹, Butenko A.V.², Kvacheva Z.B.², Poleshko A.G.², Adamovich T.G.¹,
Gurina N.S.¹

¹ Educational institution “Belarusian State Medical University”

² State scientific institution “Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy
of Sciences of Belarus”

* Corresponding author – e-mail: r_lukashov@mail.ru

Abstract Caffeic acid is a phenolic compound belonging to the class of hydroxycinnamic acids and exhibiting a wide range of pharmacological activity. The significant pharmacological potential of the substance is manifested due to its high antioxidant properties, however, in high concentrations, pro-oxidant properties may occur. The purpose of this work is to determine the cellular bioavailability of caffeic acid for the culture of human dermal fibroblasts *in vitro* using high-performance liquid chromatography. Dulbecco's modified Eagle's medium with fetal calf serum was used to cultivate human dermal fibroblasts. Chromatograms of culture liquids obtained after incubation with caffeic acid at concentrations of 100 μ M (24 and 48 hours), 10 μ M (24 and 48 hours) and 1 μ M (24 and 48 hours) did not differ from the chromatogram of the control fibroblast culture with phosphate buffer solution 7,2. Caffeic acid at a concentration of 100 μ M or less is absorbed by the culture of human dermal fibroblasts, which indicates its high bioavailability.

Key words: caffeic acid, culture of human dermal fibroblasts, high-performance liquid chromatography, cellular bioavailability.

Введение

Фенольные соединения лекарственных растений – известный класс растительных антиоксидантов, который применяется в медицине. Среди подклассов фенольных

соединений выделяют гидроксикоричные кислоты (ГКК), встречающиеся практически в каждом растении. Одним из самых простых представителей этого подкласса является кофейная кислота и ее эфиры, широко представленные в растительном мире (Luna-Guevara et al., 2018).

Кофейная кислота обладает иммуномодулирующей, кардиопротективной (ингибирование ангиотензинпревращающего фермента, ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы, аргиназы и коррекция окислительно-восстановительного дисбаланса), гиполипидемической, гипогликемической (ингибирование альфа-амилазы и альфа-глюкозидазы), антибактериальной, противогрибковой (кандидозы), противоопухолевой (для клеточных линий фибросаркомы, гепатоцеллюлярной саркомы и рака шейки матки), нейропротективной, гепатопротекторной и противовоспалительной активностями (Aijaz et al., 2022). Изучается благоприятное влияние кофейной кислоты на течение коронавирусной инфекции, а именно на воспаление в сердечно-сосудистой системе и почках (Prasansuklab et al., 2021).

Такое многообразие фармакологических эффектов кофейной кислоты можно объяснить ее высоким антиоксидантным потенциалом. Данный эффект реализуется двумя основными путями: через прямое взаимодействие с активными формами кислорода (АФК), а также через хелатирование прооксидантных ионов металлов (например, ионов железа) (Teixeira et al., 2013). Также стоит отметить тот факт, что антиоксиданты в больших дозах могут проявлять прооксидантное действие (например, аскорбиновая кислота начинает восстанавливать Fe^{3+} , которые затем вступают в реакцию Фентона, генерируя АФК) (Savel, 2003).

Ранее для кофейной кислоты были установлена максимально переносимая концентрация в 100 мкМ в культуре фибробластов дермы человека, концентрации 200 и 300 обладали цитотоксическим эффектом (Лукашов и соавт., 2021). При этом при изучении антиоксидантной активности (АОА) культуральной жидкости установлено, что АОА в концентрациях 200 и 300 мкМ сохранялась в отличие от 100 мкМ (Новаш и соавт., 2021), что дает возможность предположить наличие кофейной кислоты в культуре в токсических концентрациях, которые проявляют прооксидантное действие, и ее минимальный остаток при 100 мкМ. Поэтому целесообразно данное предположение подтвердить методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При этом по остаточному количеству кофейной кислоты в культуральной жидкости можно судить о степени ее поглощения клетками и, соответственно, о степени ее клеточной биодоступности. Такие работы в научной литературе практически отсутствуют.

Цель исследования. Изучить методом ВЭЖХ клеточную биодоступность кофейной кислоты для культуры фибробластов дермы человека *in vitro*.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали стандартный образец кофейной кислоты (Sigma-Aldrich). С учетом растворимости кофейной кислоты в водных средах максимальная концентрация данного вещества в фосфатном буферном растворе 7,2 (PBS) составила 300 мкМ.

Перед внесением в культуру клеток раствор кофейной кислоты фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм. При этом содержание кофейной кислоты снижается менее, чем на 5% ($p < 0,05$). При хранении такого раствора в холодильнике в течение двух дней и при замораживании – размораживании два раза содержание статистически значимо ($p < 0,05$) не изменялось.

В экспериментах использовали односуточную культуру фибробластов кожи (дермы) человека 3-7 пассажа с 80% сформированным монослоем в стадии логарифмического роста, выращенную на покровных стеклах во флаконах. В качестве ростовой среды использовали модифицированную Дульбекко среда Игла (ДМЕМ) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). После смены среды на поддерживающую (ДМЕМ и 2 % ЭТС) вносили раствор кофейной кислоты в PBS в

концентрациях: 100, 10 и 1 мкМ. В контрольные флаконы с культурой после смены среды вместо кофейной кислоты вносили PBS.

Учет результатов проводили через 24 ч и 48 ч. Для ВЭЖХ использовали культуральная жидкость после выдерживания фибробластов дермы человека с кофейной кислотой в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ (нетоксичные концентрации для фибробластов). Перед проведением ВЭЖХ культуральную жидкость центрифугировали при 7 000 об/мин в течение 5 мин. Для хроматографического анализа в вials методом декантации отбирали 0,5–1 мл.

Анализ проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Германия, Thermo Fisher Scientific) с насосом на четыре растворителя и устройством для вакуумной дегазации элюента, автосамплером с термостатом, термостатом для колонок с краном переключения, диодно-матричным и флуоресцентным детекторами. Обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью компьютерной программы Chromeleon 7.0.

Условия хроматографирования (из частной фармакопейной статьи на траву эхинацеи пурпурной 07/2016: 1823):

- колонка длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная *силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм;
- температура: 35 °С;
- подвижная фаза:
- подвижная фаза А: *кислота фосфорная Р – вода Р* (1:999, об/об);
- подвижная фаза В: *ацетонитрил Р* (табл. 1);
- скорость подвижной фазы: 1,5 мл/мин;
- диодно-матричный детектор, 330 нм; диапазон длин волн для записи спектра поглощения 190 – 800 нм;
- объем вводимой пробы: 10 мкл (Марченко и соавт., 2016).

Таблица 1 – Условия хроматографирования

Время (мин)	Подвижная фаза А (% , об/об)	Подвижная фаза В (% , об/об)
0	90	10
0 – 13	90 → 78	10 → 22
13 – 14	78 → 60	22 → 40
14 – 20	60	40

Деионизацию воды очищенной осуществляли на приборе «ДВ–1». Центрифугирование анализируемых образцов осуществляли на центрифуге СМ-70М.07.

Результаты и обсуждение

Для определения концентрации кофейной кислоты в культуральной жидкости после выдерживания фибробластов с ней построен градуировочный график (рис. 1) зависимости площади хроматографического пика кофейной кислоте от ее концентрации.

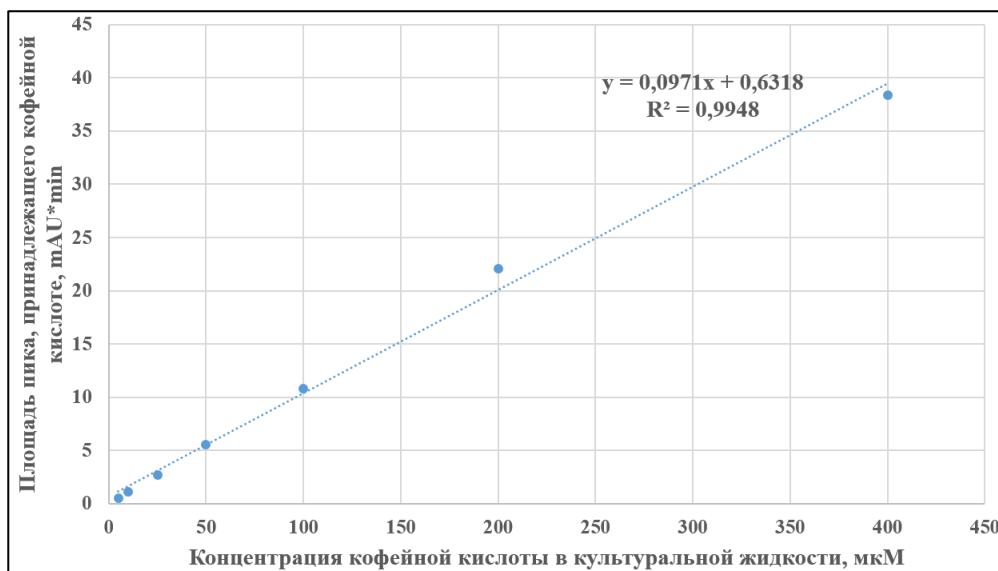


Рисунок 1 – Зависимость площади хроматографического пика, принадлежащего кофейной кислоте, от ее концентрации

На рис. 2 и 3 представлены хроматограммы культуральной жидкости, полученной после инкубирования фибробластов при концентрации кофейной кислоты равной 100 мкМ в течение 24 ч, и культуральной жидкости, полученной после инкубирования фибробластов с PBS 7,2 в течение 24 ч, соответственно.

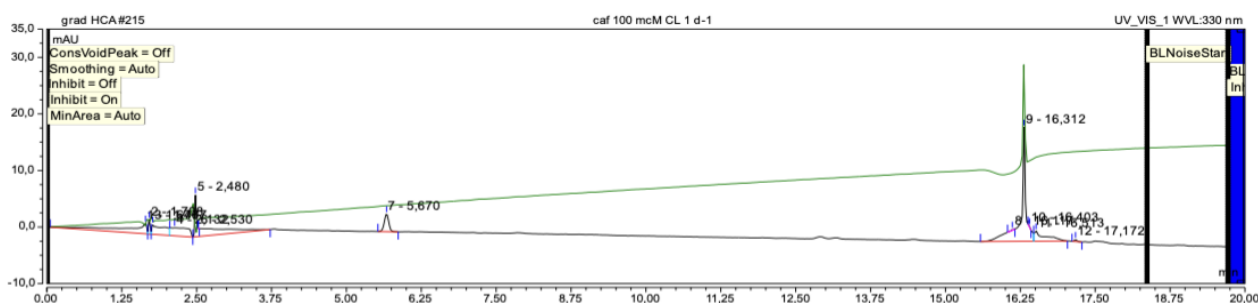


Рисунок 2 – Хроматограмма культуральной жидкости после инкубации с кофейной кислотой в концентрации 100 мкМ

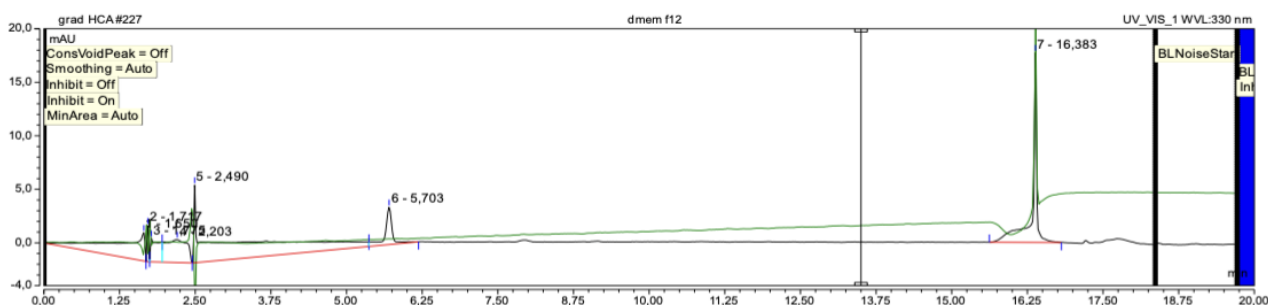


Рисунок 3 – Хроматограмма культуральной жидкости после инкубации фибробластов с PBS 7,2

Представленные хроматограммы практически не отличались друг от друга за исключением неразделившихся пиков со временами удерживания более 16 мин. Спектры поглощения веществ этих пиков не похожи на таковые для ГКК. На рис. 3 также видно, что пик, соответствующий кофейной кислоте (время удержания 9,3 мин) отсутствовал. Это подтверждает ранее сделанные выводы, сделанные при изучении АОА культуральной жидкости (Новаш и соавт., 2021). Учитывая то, что отсутствовал четкий пик, который мог бы

соответствовать метаболиту кофейной кислоты, то можно считать, что кофейная кислота поглощается фибробластами дермы человека, а небольшие малоразделимые пики относились к экскретируемым фибробластами в культуральную жидкость метаболитам. На следующем этапе целесообразно изучить культуру самих клеток на предмет наличия кофейной кислоты и ее метаболитов.

Хроматограммы культуральных жидкостей, полученных после инкубации с кофейной кислотой в концентрациях 100 мкМ (48 ч), 10 мкМ (24 и 48 ч) и 1 мкМ (24 и 48 ч) не отличались от хроматограммы, представленной на рисунке 3, что подтверждает способность фибробластов к поглощению кофейной кислоты.

Выводы

Кофейная кислота в концентрации 100 и менее мкМ полностью поглощается культурой фибробластов дермы человека, не оказывая на нее токсичных эффектов, что доказывает ее высокую клеточную биодоступность в данных концентрациях.

Список литературы

1. Anti-COVID-19 drug candidates: A review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection / A. Prasansuklab [et al.] // J. Tradit. Complement. Med. – 2021. – № 11 (2). – P. 144 – 157. doi: 10.1016/j.jtcme.2020.12.001
2. Chapter 3 - Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases / L. Luna-Guevara [et al.] // [Studies in Natural Products Chemistry](#). – 2018. – Vol. 59. – P. 79-108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003>
3. Chemical, biological and pharmacological prospects of caffeic acid / M. Aijaz [et al.] // Biointerface Research in Applied Chemistry. – 2022. – Vol. 13, iss. 4. – P. 24 – 50. doi: [10.3389/fonc.2019.00541](#)
4. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview [Electronic resource] / J. Teixeira [et al.] // Biomed. Res. Int. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23956973/>. – Date of access: 30.04.2023. doi: 10.1155/2013/251754
5. Savel, J. Fenton reaction acceleration using maltose and ascorbic acid / J. Savel // Monatsschrift fur Brauwissenschaft. – 2003. – № 56. – P. 4 – 8. doi: [10.3390/molecules27175451](#)
6. Антиоксидантные свойства культуральной жидкости после выращивания фибробластов дермы человека в присутствии кофейной кислоты [Электронный ресурс] / Д. С. Новаш [и др.] // Современные технологии в медицинском образовании : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Белорус. гос. мед. ун-та, Республика Беларусь, г. Минск, 1-5 ноября 2021 г. / под ред. С.П. Рубниковича, В.А. Филонюка. – Минск, 2021. – С. 2060-2064. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
7. Государственная фармакопея Респ. Беларусь (ГФ РБ II) : в 2-х т. / РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» ; под общ. ред. С. И. Марченко. – Молодечно : Победа, 2016. – Т. 2 : Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья. – 1368 с.
8. Морфофункциональные характеристики фибробластов дермы человека при культивировании с кофейной кислотой [Электронный ресурс] / Р. И. Лукашов [и др.] // Инновации в медицине и фармации - 2021 : материалы дистанцион. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Минск, [нояб. 2021 г.] / под ред. С.П. Рубниковича, В. А. Филонюка. - Минск, 2021. - С. 502-504.



**ФБГНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ**

**XI МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ**

к 300-летию РАН

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ТЕХНОЛОГИЙ ЗДОРОВЬЕСБЕРЕЖЕНИЯ

30 ноября-1 декабря 2023 года



СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Москва, 2023