

УДК 577.175.112
DOI 10.17721/1728.2748.2021.86.48-53

К. Калиновська, студ.,
П. Федішин, студ.,
Л. Калачнюк, д-р біол. наук,
Л. Гарманчук, д-р біол. наук,
О. Смірнов, асп.
Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна

ВПЛИВ БЕТАЇНУ НА ЕНДОТЕЛІАЛЬНІ КЛІТИНИ

Використання бетаїну як біоактивної речовини залишається актуальним через його роль у процесах метилювання (зокрема й метіоніну), антиоксидантного захисту клітин за порушення ліпідного обміну, участі у протизапальних процесах та стабілізації ендотеліально-епітеліального бар'єру як потужного регулятора обмінних процесів у клітинах і тканинах. З огляду на це метою пропонованого дослідження є вивчення безпосереднього впливу бетаїну на культивовані ендотеліальні клітини. Завдання роботи – аналіз літературних даних щодо застосування бетаїну як донора метильних груп й осмопротектора (особливо застосування його осмолітичних властивостей) та проведення експериментальних досліджень його впливу на ендотеліальні клітини. Дію бетаїну на клітини ендотелію (лінії PAE) вивчали за допомогою традиційних методичних підходів: МТТ-тест визначення активності мітохондріальних ензимів і вживання клітин й оцінка рівня поглинання глюкози і морфологічних властивостей ендотеліальних клітин.

Результати вивчення дії бетаїну на ендотеліальні клітини засвідчили про: відсутність токсичних ефектів; збільшення концентрації ендотеліоцитів порівняно з контролем за його рівня 0,5 мг/мл та 1 мг/мл у процесі фарбування трипановим синім; зростання оптичного поглинання внаслідок відновлення формазану мітохондріальними ензимами живих клітин у межах його концентрацій 1–4 мг/мл за МТТ-тесту; підвищення активності мітохондріальних оксидоредуктаз у розрахунку на одиницю живих клітин за його концентрації 1 та 4 мг/мл; зростання рівня дифузії глюкози в клітини за 0,125 мг/мл та 1 мг/мл бетаїну в середовищі інкубації. Порівняно з контролем виявлені морфологічні особливості клітин, а саме: їхня видовженість, більша кількість відростків та формування структур, що мали ознаки прокапілярних. Отже, бетаїн у концентрації 1 мг/мл може виконувати роль своєрідного стандарту позитивного впливу на ендотеліальні клітини у подальших дослідженнях біоактивних препаратів.

Ключові слова: бетаїн, глюкоза, ендотеліальні клітини, мітохондріальні ензими, осмоліт.

Вступ. Метаболізм у клітині за патологічних станів вважають важливою терапевтичною мішенню. Попередники метаболічних препаратів можуть бути як синтетичними, так і природними. Останнім часом природну сполуку триметилглїцин – бетаїн, що поширена у тварин, рослин і мікроорганізмів широко використовують як біоактивну речовину [1–3]. Фізіологічно він функціонує як важливий осмопротектор і донор метильних груп. Відомо, що бетаїн функціонує як протизапальний чинник у процесі лікування багатьох захворювань. Він залучений як антиоксидант у метаболізмі S-умісних амінокислот, одночасно пригнічуючи активність ядерного фактора-kB та активацію запального процесу NLRP3, регулює енергетичний обмін, усуває стрес ендоплазматичної сітки й апоптоз [1, 4]. Біологічне значення бетаїну полягає в тому, що, з одного боку, він є важливим донором метильних груп у процесі трансметилювання, каталізованому бетаїн-гомоцистеїнметилтрансферазою. Під час реакції гомоцистеїн перетворюється в метіонін безпосередньо в печінці та нирках. З іншого боку, бетаїн є важливим осмопротектором, головним чинном у нирках, печінці та мозку [5], і його велика кількість може накопичуватися у клітинах, не порушуючи їхньої функції, тобто важливим фактором є те, що ця роль захищена клітинними білками й ензимами за осмотичного стресу.

У клітинах ссавців бетаїн, як осмоліт, відповідає за зменшення гіпертонічного стресу, що приводить до збереження їхнього функціонування та підвищення виживаності. Він послаблює багато типів клітинних стресових чинників, а саме: гіпертермію, гіпертонічність, кислотність, гіперкаліємію та оксидативний стрес [6].

Окрім того, бетаїн за допомогою канонічних механізмів пригнічує продукування IL-1 β , MAPK (JNK, p38 та ERK1/2), що відповідають за експресію прозапальних цитокінів; також бетаїн пригнічує активність NF-kB та експресію IL-1 β шляхом інгібування MAPK та NIK/IKK сигнальних шляхів. Виявлено пригнічувальний ефект бетаїну на експресію mPINK та рівень білка HMGB1, що регулює активацію TLR4. Відомо, що активування запальної кінази NLRP3 пов'язане з виходом іонів K⁺, ви-

кликаним АТФ-опосередкованим активуванням P2X7R. За дії бетаїну виявлено пригнічення активування NLRP3 шляхом підтримки оптимального рівня K⁺ у цитозолі [4]. Бетаїн також за допомогою неканонічних механізмів пригнічує продукування IL-1 β , запобігаючи індукції активності/активування каспази-8. Пригнічення продукції IL-1 β бетаїном може відбуватися за рахунок збільшення експресії гемоксигенази-1, що є компонентом сигнального шляху цГМФ-протеїнкіназа G [1–4]. Отже, усе це підкреслює протизапальну властивість бетаїну шляхом інгібування продукування та секреції IL-1 β та вказує на потенційне застосування добавок бетаїну, як допоміжної терапії за різних запальних захворювань, пов'язаних із секрецією IL-1 β . Ендотеліальна функція й дисфункція пов'язані із процесами запалення (зокрема і запалення легенів через ураження вірусом CoViD-19), розвитком серцево-судинних захворювань, які передбачають регуляцію судинного тонуусу, створення бар'єру, трансміграцію лейкоцитів, згортання крові й ангіогенез загалом [7–9]. З огляду на це можна зробити висновок, що важливою мішенню бетаїну, як модулятора метаболічних дисфункцій, можуть бути ендотеліальні клітини, оцінювання впливу на які цієї біоактивної речовини і було обрано за мету пропонованого дослідження.

Матеріали та методи. Клітини лінії PAE (ендотеліальні клітини аорти свині) культивували у пластикових 96-луноквих планшетах (OrangeScientific, Бельгія). Середовище DMEM (Sigma, США) з 10-ти відсотками ембріональної телячої сироватки (Sigma, США) використовували для вирощування та культивування в інкубаторі CO₂ за 100-відсоткової вологості, 5-відсоткового вмісту CO₂ та температури 37 °C. Вплив бетаїну у широкому діапазоні концентрацій (0,125–8 мг/мл) на ендотеліальні клітини визначали у МТТ-тесті [10–11].

Вживання клітин визначали за співвідношенням живих і мертвих клітин після фарбування останніх трипановим синім. Для цього до клітин додавали рівну кількість барвника, витримували 3–5 хв і вводили в камеру Горяєва. Підрахунок здійснювали у двох паралель-

них експериментах, обчислюючи загальну концентрацію клітин і відсоток мертвих клітин [10].

Активність мітохондріальних ензимів. Відновлювальна активність оксидоредуктаз залежить від концентрації внутрішньоклітинних нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН) і нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФН), уміст яких пов'язаний із присутністю позаклітинної глюкози. За відновлення 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразоліум броміду (МТТ) до кристалів формазану відповідальні зазвичай такі мітохондріальні оксидоредуктази, як: сукцинатдегідрогеназа та цитохром С. Після обчислення кількості живих клітин визначали активність мітохондріальних ензимів на одиницю живих клітин за дії бетаїну в різних концентраціях [10, 11].

Рівень поглинання глюкози. Рівень глюкози в інкубаційному середовищі клітин визначали за допомогою стандартного набору на основі реакції глюкозооксидази, яку модифікували для клітинного культурального середовища як описано раніше [12].

Морфологічні властивості ендотеліальних клітин за дії бетаїну досліджували після фарбування кристалічним фіолетовим барвником, як описано раніше [13].

Результати та їхнє обговорення. У процесі визначення дії бетаїну на клітини ендотелію токсичних ефектів не виявлено, що спостерігалось і в інших дослідженнях [14–16]. У процесі зафарбовування трипановим синім за присутності 0,5 мг/мл та 1 мг/мл бетаїну зафіксовано збільшення концентрації ендотеліоцитів порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 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 (x 1000)	56,2±8,9	71,3±11,7	85,5±4,8*	78,4±3,4	64,6±11,9	69,4±5,7
Відсоток 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

У процесі тестування впливу бетаїну на ендотеліальні клітини в МТТ-тесті виявлено подібну тенденцію – достовірне збільшення на 26 % оптичного поглинання як функції відновлення формазану мітохондріальними

ензимами живих клітин за дії бетаїну в концентрації 2 мг/мл (рис. 1) та незначне зростання показника за додавання бетаїну в концентрації 4 мг/мл та 1 мг/мл.

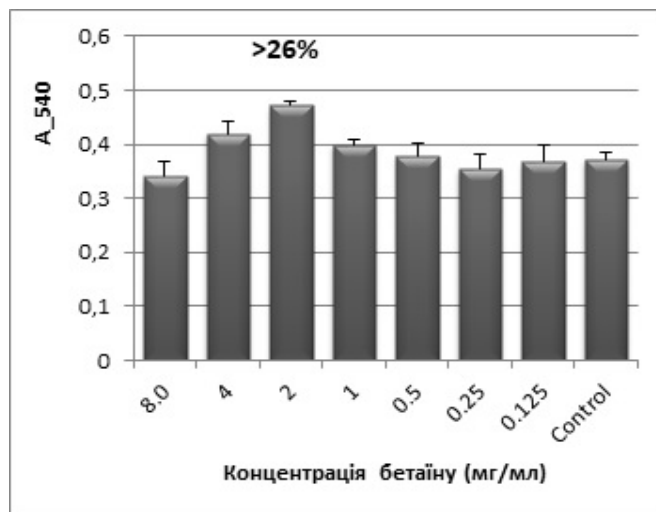


Рис. 1. Гістограми оптичного поглинання клітин ендотелію за дії бетаїну, визначені в МТТ-тесті

Визначення активності мітохондріальних оксидоредуктаз у розрахунку на одиницю живих клітин за дії бетаїну вказує на підвищення зазначеного показника щодо контролю за концентрації 1 та 4 мг/мл бетаїну, тоді як зі зменшенням концентрації речовини показники активності мітохондріальних ензимів не змінювались

(табл. 2, рис. 1). У процесі визначення поглинання глюкози клітинами у розрахунку на 1000 живих клітин за різних концентрацій бетаїну збільшення зазначеного показника щодо контролю виявлено за концентрації 0,125 мг/мл та 1 мг/мл, а за концентрації 4 мг/мл концентрація поглинутої глюкози зменшувалась (табл. 2).

Таблиця 2. Концентрація живих клітин, активність мітохондріальних ферментів як функція відновлення формазану та рівень поглинутої глюкози ендотеліоцитами за дії бетаїну

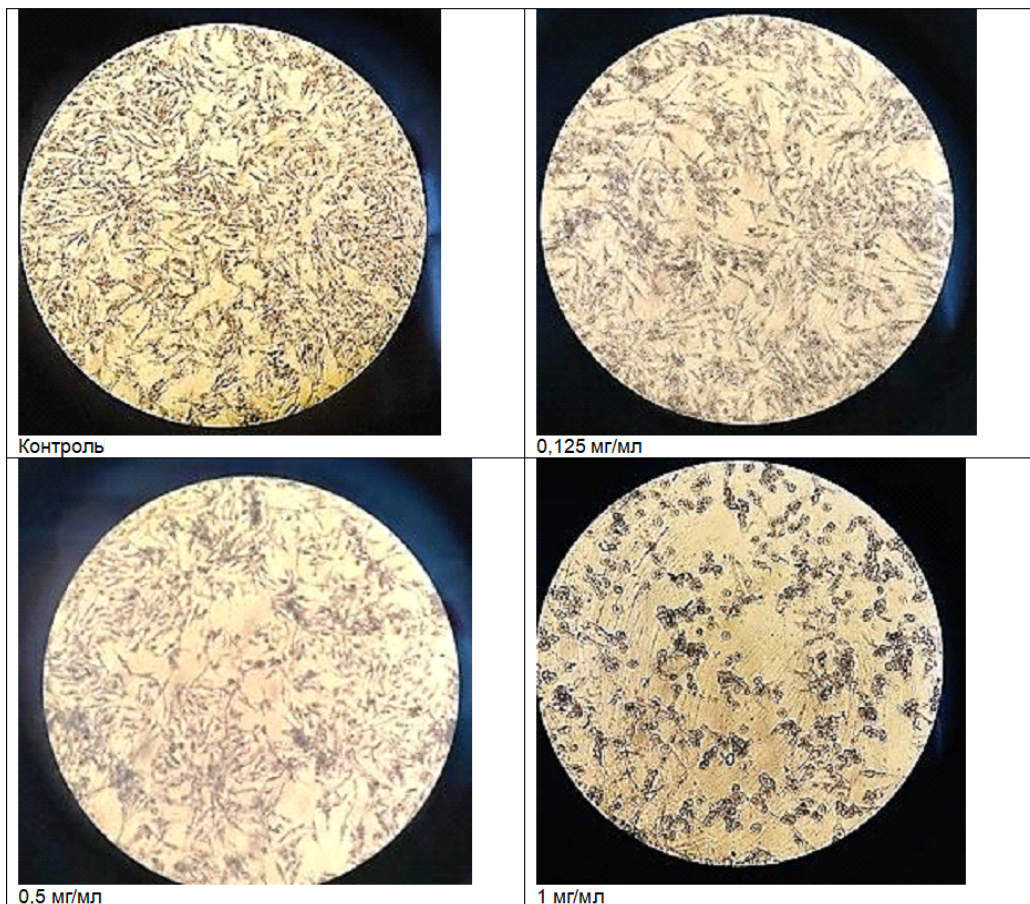
	4 мг/мл	2 мг/мл	1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,125 мг/мл	контроль
Концентрація живих клітин (x 1000)	54,9±3,7	65,3±4,9	81,3±3,6	76,6±5,5	60,5±4,2	67,0±4,2
A ₅₄₀ /1000 живих клітин	7,6x10 ⁻³	7,2x10 ⁻³	4,9x10 ⁻³	5,0x10 ⁻³	6,2x10 ⁻³	5,5x10 ⁻³
Рівень глюкози /1000 клітин (мкМ)	5,1±0,2	4,4±0,7	7,4±0,1*	5,5±0,4	7,6±0,3*	4,9±0,4

Примітка. **p* < 0,05, проти контролю.

За дії бетаїну фіксували морфологічні відмінності клітин від аналогічних у контролі а саме – видовженість клітин (1), більше відростків (2), а також формування структур, що мали ознаки прокапілярних (3) (рис. 2 Б). Також за концентрації бетаїну 1 мг/мл в середовищі інкубації за представленими даними на рис. 2 А проявлялись структури 3D-конгломератів, що вказує на зміну

морфогенетичних реакцій, таких як розпластання на субстраті, які напряду пов'язані з адгезивними молекулами та міжклітинною комунікацією. Підтвердження ознак диференціювання клітин (видовженість клітин та формування прокапілярних структур) ендотелію за дії бетаїну наведено на рис. 2 Б (1, 3).

А)



Б)

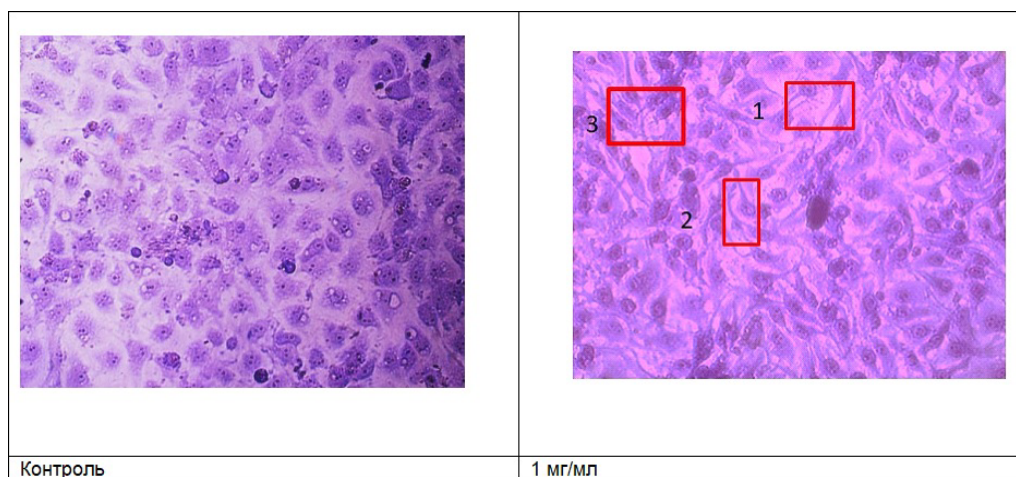


Рис. 2. Морфологічні особливості ендотеліальних клітин за впливу бетаїну (рис. 2 А, х 50); фарбування кристалічним фіолетовим барвником (рис. 2 Б х 200)

З аналізу літературних даних [4, 17, 18] і наших досліджень випливає, що бетаїн або його похідні можуть слугувати своєрідними заміниками протизапальним антицитокіновим препаратам для стабілізації ендотелію. У попередніх дослідженнях [5, 6, 19, 20] і нашій роботі [21] за застосування біопротекторних речовин (бетаїну та протеїнумісних добавок, збагачених мінералами в хелатованій формі) на тваринних моделях алкогольної інтоксикації виявлено відновлення активності маркерних ензимів ушкодження печінки та нормалізацію окисно-відновних процесів інтенсивності трансамінування. Ураховуючи результати впливу бетаїну на ендотелію,

а саме: посилення росту й розмноження клітин, підвищення рівня їхнього виживання, збільшення активності мітохондріальних ензимів, необхідні подальші дослідження на клітинних і, можливо, тваринних моделях з ангіогенез-опосередкованим й імуномодуляторним механізмом.

Висновки. Згідно з аналізом експериментальних даних щодо впливу бетаїну на ендотеліальні клітини нами отримано такі результати:

- не виявлено токсичних ефектів бетаїну;

- зафіксовано збільшення концентрації ендотеліоцитів порівняно з контролем за його рівня 0,5 мг/мл та 1 мг/мл у процесі фарбування трипановим синім;
- в МТТ-тесті продемонстровано зростання оптичного поглинання внаслідок відновлення формазану мітохондріальними ензимами живих клітин у межах його концентрацій 1–4 мг/мл;
- за концентрації бетаїну 1 та 4 мг/мл відмічено підвищення активності мітохондріальних оксидоредуктаз у розрахунку на одиницю живих клітин;
- за концентрації бетаїну 0,125 мг/мл та 1 мг/мл виявлено достовірне зростання поглинання глюкози клітинами;
- порівняно з контролем під впливом бетаїну зафіксовано такі морфологічні відмінності клітин, як їхня видовженість, більша кількість відростків і формування структур, що мали ознаки прокапілярних.

Список використаних джерел

1. Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications / G. Zhao, F. He, C. Wu, et al. // *Front. Immunol.*, 2018 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01070>
2. Yu D. Effects of betaine on growth performance and carcass characteristics in growing pigs. / D.Yu, Z.Xu// *Asian-australas J Anim Sci.* 2004. Vol. 17(12). P. 490–493. doi:10.5713/ajas.2004.1700
3. Osmotic regulation of hepatic betaine metabolism. / L.Hoffmann, Brauers, G.T.Gehrmann, et al. // *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol.* 2013. Vol. 304, no 9. P. G835–846. doi:10.1152/ajpgi.00332.2012
4. Betaine Inhibits Interleukin-1beta Production and Release: Potential Mechanisms. / Y. Xia, S.Chen, G.Zhu, et al. *Front Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 2670. doi: 10.3389/fimmu.2018.02670
5. Kempson S. A. Betaine Transport in Kidney and Liver: Use of Betaine in Liver Injury. / S. A.Kempson, K. Vovor-Dassu, C.Day // *Cell Physiol.Biochem.* 2013. Vol. 32(suppl 1).P. 32-40. DOI: 10.1159/000356622
6. Willingham B.D. Betaine Supplementation May Improve Heat Tolerance: Potential Mechanisms in Humans. / B.D. Willingham, T.J. Ragland, M.J. Ormsbee // *Nutrients.*2020.Vol. 12, no 10.P. 2939; doi:10.3390/nu12102939
7. Outgrowth, proliferation, viability, angiogenesis and phenotype of primary human endothelial cells in different purchasable endothelial culture media: feed wisely. /B.Leopold, J. Strutz, E. Weiss, et al. // *Histochemistry and Cell Biology.* 2019. Vol. 152. P. 377–390. <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01815-2>
8. Amraei R.COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. / R.Amraei, N. Rahimi // *Cells.* 2020. Vol. 9, no 7. P. 1652. doi: 10.3390/cells9071652.
9. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. / Z. Varga, A. J.Flammer, P. Steiger, et al. // *Lancet.* 2020 Vol. 395. No 10234. P.1417-1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5
10. Garmanchouk L. V. Influence of pro-angiogenic cytokines on proliferative activity and survival of endothelial cells. / L. V.Garmanchouk, O.N. Pyaskovskaya, G. I. Solyanik//*Biopolym Cell.* 2010.Vol. 26. No 3.P. 187-193.
11. 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
12. The mechanism of VEGF-mediated endothelial cells survival and proliferation in conditions of unfed-culture / T.V. Nikolaienko, V. V. Nikulina, D. V. Shelest, L. V. Garmanchuk // *Ukr. Biochem. J.* 2016. Vol. 88, No 4. P. 12-19
13. Biological Activity of Cerium Dioxide Nanoparticles / V. Sarnatskaya, Y. Shlapa, L. Yushko, et al. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2020. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36936>
14. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Buffalo Milk δ -Valerobetaine./ N.D'Onofrio, A.Balestrieri, G.Neglia, et al. // *J Agric Food Chem.* 2019. Vol. 67. No 6. P. 1702-1710. doi: 10.1021/acs.jafc.8b07166.
15. Synergistic Effect of Dietary Betaines on SIRT1-Mediated Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cal 27. / N.D'Onofrio, L.Mele, E.Martino, et al. *Cancers (Basel).* 2020.Vol. 12. No 9. P. 2468. doi: 10.3390/cancers12092468.
16. ROS-Mediated Apoptotic Cell Death of Human Colon Cancer LoVo Cells by Milk δ -Valerobetaine. / N.D'Onofrio, N. A.Cacciola, E.Martino, et al. // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10. No 1. P. 8978. doi: 10.1038/s41598-020-65865-6.
17. 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. / S.Vlahopoulos, I.Boldogh, A.Casola, A. R.Brasier // *Blood.* 1999. Vol. 94. no 6.P. 1878–1889. doi:10.1182/blood.V94.6.1878.418k03_1878_1889.
18. Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. / F.David, J.Farley, H.Huang, J. P.Lavoie,

S.Laverty // *Vet Surg.* 2007. Vol. 36. no 3. P. 221–27. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00253.x. PMID 17461946.

19. Antiangiogenic effect of betaine on pathologic retinal neovascularization via suppression of reactive oxygen species mediated vascular endothelial growth factor signaling. / S. W.Park, H. O.Jun, E.Kwon, et al. // *VasculPharmacol.* 2017. Vol. 90. P. 19-26. doi: 10.1016/j.vph.2016.07.007.

20. Lee I. Regulation of Cytochrome c Oxidase by Natural Compounds Resveratrol, (–)-Epicatechin, and Betaine. / I.Lee // *Cells.* 2021.Vol. 10. P. 1346. <https://doi.org/10.3390/cells10061346>

21. Bio protectors' effect on the composition of some amino acids under alcohol-induced oxidative stress. / Kalachniuk, L., Fedyshyn, P., Smirnov, O., et al. // *EUREKA: Life Sciences.* 2021. Vol. 4.P. 50–57. doi: <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2021.001985>

Reference (Scopus)

1. Zhao, G., He, F., Wu, C., Li, P., Li, N., Deng, J., Zhu, G., Ren, W., Peng, Y.(2018). Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications// *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01070>
2. Yu, D., Xu, Z. (2004) Effects of betaine on growth performance and carcass characteristics in growing pigs. *Asian-australas J Anim Sci.* 17(12):490–3. doi:10.5713/ajas.2004.1700
3. Hoffmann, L., Brauers, G., Gehrmann, T., Haussinger, D., Mayatepek, E., Schliess, F., et al. (2013) Osmotic regulation of hepatic betaine metabolism. *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol.* 304(9):G835–46. doi:10.1152/ajpgi.00332.2012
4. Xia Y, Chen S, Zhu G, Huang R, Yin Y, Ren W. (2018) Betaine Inhibits Interleukin-1beta Production and Release: Potential Mechanisms. *Front Immunol.* 9:2670. doi: 10.3389/fimmu.2018.02670
5. Kempson S. A., Vovor-Dassu, K., Day, C. (2013). Betaine Transport in Kidney and Liver: Use of Betaine in Liver Injury. *Cell PhysiolBiochem*, 32(suppl 1), 32-40. DOI: 10.1159/000356622
6. Willingham, B.D., Ragland, T.J., Ormsbee, M.J. (2020). Betaine Supplementation May Improve Heat Tolerance: Potential Mechanisms in Humans. *Nutrients.* 12 (10), 2939; doi:10.3390/nu12102939
7. Leopold, B., Strutz, J., Weiss, E., Gindlhuber, J., Birner-Gruenberger, R., Hackl, H., M. Appel, H., Cvitic, S., Hidden, U. (2019) Outgrowth, proliferation, viability, angiogenesis and phenotype of primary human endothelial cells in different purchasable endothelial culture media: feed wisely. *Histochemistry and Cell Biology.* 152:377–390 <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01815-2>
8. Amraei, R., Rahimi, N. (2020) COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells.* 9(7):1652. doi: 10.3390/cells9071652.
9. Varga, Z., Flammer, A. J., Steiger, P., Haberecker, M., Andermatt, R., Zinkernagel, A. S., Mehra, M. R., Schuepbach, R. A., Ruschitzka, F., Moch, H. (2020) Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet.* 395(10234):1417-1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5
10. Garmanchouk, L. V., Pyaskovskaya, O. N., Solyanik, G. I. (2010) Influence of pro-angiogenic cytokines on proliferative activity and survival of endothelial cells. *Biopolym Cell.* 26(3): 187-193.
11. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2): 55-63.
12. Nikolaienko, T.V., Nikulina, V.V., Shelest, D. V., Garmanchuk, L. V. (2016) The mechanism of VEGF-mediated endothelial cells survival and proliferation in conditions of unfed-culture// *Ukr. Biochem. J.* 88, (4):12-19
13. Sarnatskaya, V., Shlapa, Y., Yushko, L., Shton, I., Solopan, S., Ostrovskaya, G., Kalachniuk, L., Neglia, A., Garmanchuk, L., Prokopenko, I., Khudenko, N., Maslenny, V., Bubnovskaya, L., Belous, A., Nikolae, V. (2020) Biological Activity of Cerium Dioxide Nanoparticles. *J Biomed Materials Res. Part A*, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36936>
14. D'Onofrio, N., Balestrieri, A., Neglia, G., Monaco, A., Tatullo, M., Casale, R., Limone, A., Balestrieri, M. L., Campanile, G. J (2019) Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Buffalo Milk δ -Valerobetaine. *Agric Food Chem.* 67(6):1702-1710. doi: 10.1021/acs.jafc.8b07166.
15. D'Onofrio, N., Mele, L., Martino, E., Salzano, A., Restucci, B., Cautela, D., Tatullo, M., Balestrieri, M. L., Campanile, G. (2020) Synergistic Effect of Dietary Betaines on SIRT1-Mediated Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cal 27. *Cancers (Basel).*12(9):2468. doi: 10.3390/cancers12092468.
16. D'Onofrio, N., Cacciola, N.A., Martino, E., Borrelli, F., Fiorino, F., Lombardi, A., Neglia, G., Balestrieri, M. L., Campanile, G. (2020) ROS-Mediated Apoptotic Cell Death of Human Colon Cancer LoVo Cells by Milk δ -Valerobetaine. *Sci Rep.* 10(1):8978. doi: 10.1038/s41598-020-65865-6.
17. Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A., Brasier, A. R. (1999). 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.* 94 (6): 1878–89. doi:10.1182/blood.V94.6.1878.418k03_1878_1889.
18. David, F., Farley, J., Huang, H., Lavoie, J. P., Laverty, S. (2007). Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. *Vet Surg.* 36 (3): 221–27. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00253.x.
19. Park, S. W., Jun, H. O., Kwon, E., Yun, J. W., Kim, J. H., Park, Y. J., Kang, B. C., Kim, J. H. (2017) Antiangiogenic effect of betaine on pathologic retinal neovascularization via suppression of reactive oxygen

species mediated vascular endothelial growth factor signaling. *VasculPharmacol.*90:19-26. doi: 10.1016/j.vph.2016.07.007.

20. Lee, I. (2021) Regulation of Cytochrome c Oxidase by Natural Compounds Resveratrol, (-)-Epicatechin, and Betaine. *Cells.* 10, 1346. <https://doi.org/10.3390/cells10061346>

21. Kalachniuk, L., Fedyshyn, P., Smirnov, O., Prys-Kadenko, V., Palonko, R., Amauta, O. (2021). Bio protectors' effect on the composition of some amino acids under alcohol-induced oxidative stress. *EUREKA: LifeSciences,* 4, 50–57. doi: <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2021.001985>

Надійшла до редколегії 7.09.2021
Отримано виправлений варіант 6.10.2021
Підписано до друку 6.10.2021

Received in the editorial 7.09.2021
Received a revised version on 6.10.2021
Signed in the press on 6.10.2021

К. Калиновская, студ.,
П. Фецишин, студ.,
Л. Калачнюк, д-р биол. наук
Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина,
Л. Гарманчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
А. Смирнов, асп.
Институт биологии животных НААН, Львов, Украина

ВЛИЯНИЕ БЕТАИНА НА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Использование бетаина как биоактивного вещества остается актуальным в связи с его ролью в процессах метилирования (в частности метионина), антиоксидантной защиты клеток при нарушении липидного обмена, участия в противовоспалительных процессах и стабилизации эндотелиально-эпителиального барьера как мощного регулятора обменных процессов в клетках и тканях. Поэтому целью данной работы стало изучение непосредственного влияния бетаина на культивируемые эндотелиальные клетки. Задачи работы – анализ литературных данных по применению бетаина в качестве донора метильных групп и осмопротектора (особенно применение его осмолитических свойств) и проведение экспериментальных исследований его влияния на эндотелиальные клетки. Действие бетаина на клетки эндотелия (линии RAE) изучалось с помощью традиционных методических подходов: МТТ-тест определения активности митохондриальных ферментов и выживания клеток и оценка уровня поглощения глюкозы и морфологических свойств эндотелиальных клеток.

Результаты изучения действия бетаина на эндотелиальные клетки свидетельствуют об: отсутствии токсических эффектов; увеличении концентрации эндотелиоцитов по сравнению с контролем его уровня 0,5 мг/мл и 1 мг/мл при окраске трипановым синим; росте оптического поглощения вследствие восстановления формазана митохондриальными энзимами живых клеток в пределах его концентраций 1–4 мг/мл в МТТ-тестах; повышении активности митохондриальных оксидоредуктаз в расчете на единицу живых клеток при концентрации бетаина 1 и 4 мг/мл; увеличении диффузии глюкозы в клетки при 0,125 мг/мл и 1 мг/мл биопрепарата. По сравнению с контролем выявлены морфологические различия клеток, а именно: вытянутость, большее количество отростков и формирование структур, имеющих признаки прокапиллярных. Таким образом, бетаин в концентрации 1 мг/мл может выполнять роль своеобразного стандарта положительного влияния на эндотелиальные клетки в последующих исследованиях биоактивных препаратов.

Ключевые слова: бетаин, глюкоза, эндотелиальные клетки, митохондриальные энзимы, осмолит.

K. Kalynovska, Student,
P. Fedyshyn, Student,
L. Kalachniuk, Dr Hab.
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
L. Garmanchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
O. Smirnov, PhD Student
Institute of animal biology of NAAS, Lviv, Ukraine

BETAINE INFLUENCE ON THE ENDOTHELIAL CELLS

The use of betaine as a bioactive substance remains relevant due to its role in methylation processes (including methionine), antioxidant protection of cells for lipid metabolism, participation in anti-inflammatory processes and stabilization of the endothelial-epithelial barrier as a powerful regulator of metabolic processes in cells and tissues. Therefore, the aim of this work was to study the direct effect of betaine on cultured endothelial cells. The objectives of the work were to analyze the literature on the use of betaine as a donor of methyl groups and osmoprotector (especially the use of its osmotolytic properties), and to conduct experimental studies of its effect on endothelial cells. The effect of betaine on endothelial cells (RAE lines) was studied using traditional methodological approaches: MTT test to determine the activity of mitochondrial enzymes and cell survival, assessment of glucose uptake and morphological properties of endothelial cells.

The results of the study of the effect of betaine on endothelial cells showed no toxic effects, increased concentration of endothelial cells compared with control of its level of 0,5 mg/ml and 1 mg/ml when stained with trypan blue, increased optical absorption due to reduction of formazan by mitochondrial enzymes in living cells within its concentrations of 1–4 mg/ml by MTT test, increasing the activity of mitochondrial oxidoreductases per unit of living cells at its concentrations of 1 and 4 mg/ml, the highest absorption of glucose by cells at 0,125 mg/ml and 1 mg/ml of the biological product, compared with the control there were morphological differences of cells, namely: elongation, greater number of processes and the formation of structures that had signs of procapillary. Therefore, betaine at a concentration of 1 mg/ml may serve as a kind of standard of positive effects on endothelial cells in subsequent studies of bioactive drugs.

Keywords: betaine, glucose, endothelial cells, mitochondrial enzymes, osmolite.