

УДК 576.5, 543.9

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МОДЕЛЯХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (ОБЗОР)

© 2012 г. К. В. Лисицкая, И. В. Николаев, А. А. Торкова, В. О. Попов, О. В. Королёва

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: koroleva@inbi.ras.ru, lisksenia@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.2012 г.

Представлен анализ современных данных по исследованию функциональных свойств биологически активных веществ в модельных системах на основе культивируемых клеток человека. Систематизированы сведения о практическом использовании клеточных культур для оценки различных функциональных свойств биологически активных веществ: антиоксидантных, иммуномодулирующих, про- и пребиотических, химиопрофилактических. Рассмотрены наиболее перспективные направления использования культивируемых клеток для исследования функциональных свойств, а также трехмерных клеточных моделей.

В последние годы резко возрос интерес к разработке технологий получения биологически активных веществ, способных снижать риск развития заболеваний, сохранять и улучшать здоровье. Развитие этого направления привело к созданию термина “функциональное питание”, которое подразумевает использование биологически активных веществ (БАВ) и композиций, обогащенных биологически активными добавками с целью придания им функциональных свойств (табл. 1).

Одной из центральных проблем применения БАВ является оценка их биологической активности. Клинические исследования и исследования на лабораторных животных высокоинформативны, но являются дорогостоящими и сопряжены с этическими проблемами. Кроме того, различия ряда биохимических реакций у лабораторных животных и человека не позволяют полностью экстраполировать на человека результаты, полученные в экспериментах на животных моделях. В связи с этими, все возрастающую роль в доклинической оценке биологической активности приобретают исследования *in vitro*, в том числе проводимые на культивируемых клетках человека. Использование клеточных моделей имеет ряд преимуществ, так как дает возможность сопоставлять полученные результаты с данными протеомного и геномного анализа; проводить сравнение изменения метаболизма в присутствии и отсутствии БАВ; устранить влияние различных факторов, в том числе пола, возраста, индивидуальных особенностей организма на получаемые результаты оценки биологической активности исследуемых соединений.

Культуральные модели *in vitro* широко распространены для исследования различных характе-

ристик БАВ: цитотоксичности, биодоступности, антиоксидантной, иммуномодулирующей активности и др. Результаты данных исследований нашли отражение в многочисленных работах, посвященных роли отдельных тест-систем в оценке биологической активности.

Цель обзора – суммировать данные различных источников по использованию моделей на основе культивируемых клеток человека для исследования функциональных свойств БАВ и продуктов на их основе.

***In vitro* модели для оценки антиоксидантных свойств БАВ.** Свободнорадикальное окисление (СРО) играет важнейшую роль в развитии различных хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые патологии, сахарный диабет, катаракту, а также опухолевые процессы. Интенсивность СРО в организме модулируется целым рядом антиоксидантов – соединений, которые способны блокировать СРО в концентрациях, сопоставимых с таковыми для окисляемых молекул-мишеней [1]. Антиоксиданты снижают интенсивность СРО важнейших макромолекул клеток – липидов, белков и ДНК, приводящего к их повреждению.

К настоящему времени описано несколько десятков соединений, относящихся к антиоксидантам, объединенных в различные классы. К ним относятся витамины (А, С, Е), макро- и микроэлементы (медь, марганец, цинк, селен, железо), каротиноиды, флавоноиды, нефлавоноидные фенольные соединения и др. [2].

Антиоксиданты характеризуются различными механизмами действия: прямое гашение свободных радикалов, основанное на восстановлении

Таблица 1. Некоторые биологически активные компоненты и их влияние на функции организма человека и профилактику развития заболеваний

Пищевые компоненты	Функциональное свойство	Роль в организме
Лактобактерии, бифидобактерии, олигосахариды	Пре- и пробиотическая активность	Улучшение функций желудочно-кишечного тракта и иммунной системы
Витамин А, С, Е, флавоноиды, каротиноиды, микроэлементы	Антиоксидантные	Защита от окислительного стресса
Витамин С, Е, полифенолы, каротиноиды, кофермент Q10	Антиоксидантные Антигипертензивные	Снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний
Витамин С, Е, полифенолы, каротиноиды	Химиопрофилактические	Снижение риска развития онкологических заболеваний
Витамин А, С, D, Е, цинк, селен, аминокислоты, ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты	Иммуномодуляторные	Иммуномодулирующая функция

свободных радикалов антиоксидантами, связывание ионов металлов переменных валентностей, катализирующих свободнорадикальные реакции, повышение активности эндогенных антиоксидантных систем. При анализе антиоксидантных свойств необходимо учитывать многообразие механизмов антиоксидантного действия соединений, входящих в их состав.

Исследования антиоксидантной активности интенсифицировались в середине 1990-х годов, когда были разработаны различные *in vitro* методики определения антиоксидантной активности БАВ. В настоящее время существует множество таких методик определения антиоксидантной емкости соединений, при этом центральная роль отводится экспериментам, проводимым *in vitro*.

Несмотря на многообразие методик оценки антиоксидантной активности соединений в культуре клеток, они включают воздействие инициатора СРО и методику оценки активности радикалов в клетке.

В качестве инициаторов радикальных и окислительно-восстановительных процессов в культивируемых клетках используются, как правило, перекись водорода и азо-соединения (например, ААПГ – 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид), которые при термическом распаде в присутствии кислорода продуцируют пероксильные радикалы.

Оценку антиоксидантных эффектов на культуральных тест-моделях проводят как по активности свободных радикалов непосредственно в культивируемых клетках, так и по оксидативному повреждению структур клетки, вызываемому свободными радикалами: накопление продуктов окислительной модификации макромолекул (нуклеиновых кислот, липидов, белков), уровню эндогенных антиоксидантных ферментов и молекул, участвующих в апоптозе, и. т.д.

Для оценки активности СРО непосредственно в культивируемых клетках используются различные флуорохромы: дихлорофлуоресцеин ацетат, родамин, гидроэтидин и др. Использование флуоресцентных красителей для детекции СРО основано на их способности проникать в живые клетки, где под действием клеточных ферментативных систем из нефлуоресцирующих соединений происходит образование флуоресцентных продуктов.

Дихлорофлуоресцеин диацетат (ДХФДА) является наиболее распространенным соединением для детекции свободных радикалов. Он проникает в клетки и аккумулируется в цитозоле, где под действием эстераз клетки деацетируется в дихлорофлуоресцеин (ДХФ) [3]. Свободные радикалы (пероксильный радикал, радикал NO_2 , карбонат-радикал, гидроксил-радикал) конвертируют нефлуоресцентное соединение в флуорохром с пиком флуоресценции около 525 нм при длине волны возбуждающего света 498 нм. Данный метод получил широкое распространение в связи с относительной простотой, достаточно высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов.

Дигидрородамин (ДГР) является флуоресцентным красителем для детекции различных свободных радикалов в клетке (гидроксил-радикал, радикал NO_2 , пероксинитрит), но реагирует в меньшей степени с супероксид-радикалом, пероксидом водорода и монооксидом азота. ДГР окисляется в родамин 123 с пиком флуоресценции около 536 нм при длине волны возбуждающего света 500 нм [3].

Гидроэтидин (ГЭ) после проникновения в клетку окисляется преимущественно супероксид-радикалом в флуоресцентный продукт этидин, который, в свою очередь, интеркалирует в ДНК клеток и флуоресцирует с пиком около 600 нм при длине волны возбуждающего света 500–530 нм.

К недостаткам флуорохрома можно отнести его способность спонтанно окисляться, а также вступать в реакцию с феррицитохромом *c* [3], в связи с чем его применение ограничено.

Луминол и люцигенин используются для детекции продукции свободных радикалов в активированных фагоцитах, но также используются в других типах клеток. В настоящее время использование данных флуорохромов ограничено в связи с их низкой специфичностью [3].

Элисия и Киттс [4] определяли антиоксидантную активность антоцианинов из ежевики на культуре клеток Сасо-2 с использованием ДХФДА. СРО в клетках индуцировали добавлением азонициатора ААПГ. Кроме того, определяли жизнеспособность клеток после воздействия на клетки ААПГ в присутствии или в отсутствии раствора антоцианинов. Было показано, что антоцианины обладают антиоксидантными свойствами, выражающимися в дозо-зависимом снижении ААПГ-индуцированного окисления. Также отмечено цитопротективное действие антоцианинов при ААПГ-индуцированном окислительном стрессе.

Самаранаяка с соавт. [5] показали защитное действие белкового гидролизата тихоокеанского хека от ААПГ-индуцированного внутриклеточного окисления на культуре клеток Сасо-2 с использованием флуорохрома ДХФДА. Отмечено, что белковый гидролизат значительно снижает интенсивность СРО в клетках по сравнению с таковым уровнем в клетках, инкубированных в отсутствие гидролизата.

Опосредованное действие свободных радикалов на клетки оценивают по образованию различных биомаркеров — продуктов перекисного окисления макромолекул в клетке. Так, свободные радикалы индуцируют перекисное окисление липидов (ПОЛ), приводящее к образованию различных конечных продуктов: малонового диальдегида (МДА), F2-изопростанов, конъюгированных Шиффовых оснований, диеновых конъюгатов [6, 7]. ПОЛ в клетке приводит к нарушению функций клеточной мембраны, инактивации связанных с мембраной рецепторов, повреждению ДНК.

МДА является наиболее изученным продуктом ПОЛ [6]. Он представляет собой альдегид, образующий ковалентные связи с ДНК и обладающий токсичным, мутагенным и атерогенным действием на клетки. МДА является важным маркером уровня перекисного окисления липидов. Отмечено, что его уровень в плазме достоверно повышается при воздействии неблагоприятных факторов — алкоголя и табака [8].

Методика определения МДА основывается на спектрофотометрическом определении продук-

тов его реакции с тиобарбитуровой кислотой. Вместе с тем, взаимодействие тиобарбитурата с МДА неспецифично, и может наблюдаться завышение результатов вследствие его взаимодействия с другими карбонил-содержащими соединениями. Описаны более чувствительные и воспроизводимые методики определения МДА посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в крови и тканях, а также в культивируемых клетках [9].

Методом ВЭЖХ Хванг и Боуэн [10] исследовали антиоксидантный и химиопрофилактический эффекты ликопина и экстракта томатной пасты на культуре клеток рака простаты линии LNCaP. Показано, что при добавлении низких концентраций ликопина достоверно снижается уровень продукта реакции МДА и тиобарбитурата в клетках.

Ши с соавт. [11] исследовали антиоксидантный эффект полифенолов яблок при воздействии окислителя на клетки печени. Было отмечено, что уровень МДА в культуральной среде первичной культуры гепатоцитов мыши значительно превышает таковой при инкубации клеток с полифенолами яблок.

F(2)-изопростаны являются структурно близкими к простагландинам соединениями, образующимися в результате перекисного окисления ахаридоновой кислоты [12]. Имеются данные об уровне F(2)-изопростанов в различных биологических жидкостях: плазме крови, моче, цереброспинальной и бронхоальвеолярной жидкостях. Данные об уровне F(2)-изопростанов в культивируемых клетках немногочисленны и к настоящему времени имеют только исследовательский интерес.

Так, описана методика анализа F(2)-изопростанов методом двумерного электрофореза с последующей масс-спектрометрией, пригодная для культивируемых клеток [13]. Также описана методика определения уровня F(2)-изопростанов в первичной культуре астроцитов мыши с использованием радиоизотопной метки с последующей газовой хроматографией и масс-спектрометрией [13].

Лоук с соавт. [14] определяли уровень F(2)-изопростанов в линии клеток ТНР-1 при ААПГ-индуцированном окислительном стрессе в норме и при добавлении в культуральную среду антиоксиданта аскорбиновой кислоты. Отмечено, что аскорбиновая кислота снижает уровень гибели клеток и содержание F(2)-изопростанов.

Повреждение молекул ДНК в результате их непосредственного взаимодействия с гидроксильным радикалом играет ключевую роль в гибели клеток, индуцированной активными формами кислорода (АФК). Отмечено, что АФК вызывают необратимые повреждения хроматина, включая

Таблица 2. Изменения в клетках, происходящие при апоптозе, и методы их оценки

Структуры клетки	Характерные изменения	Методики оценки
Клетка	Изменение морфологии клеток	Микроскопия
	Повышение проницаемости мембраны	Окраска клеток красителями (пропидий йодид) Высвобождение аннексина V
Ядро и ДНК	Изменение морфологии ядер	Микроскопия
	Фрагментация ДНК	<i>In situ</i> гибридизация, Гель-электрофорез Флуоресцентные красители
Цитоплазма	Активация белков, участвующих в апоптозе	Активность каспаз и транскляминаз
Митохондрии	Целостность мембраны	Потенциал митохондриальной мембраны Высвобождение цитохрома c
	Метаболическая активность	Активность цитратсинтазы

фрагментацию молекул ДНК, приводящие в апоптозу и некрозу клеток [15].

Методики для выявления фрагментации ДНК в культивируемых клетках при воздействии индукторов СРО многочисленны, и наибольшее распространение среди них нашла нерадиоактивная методика с бромдезоксисуридином (БрДУ). Данная методика основана на интеркаляции в ДНК аналога тимидина. Меченые таким образом фрагментированные молекулы ДНК детектируются методом иммуноферментного анализа (ИФА) в цитозоле (апоптотическая гибель клеток) и в культуральной среде (некроз клеток).

Миллер с соавт. [16] определяли антиоксидантную активность отваров зеленого чая и *Uncaria guianensis* на культивируемых клетках эпителия желудка человека линии AGS и эпителия кишечника мыши линии IEC-18. Было показано, что отвары достоверно снижают по сравнению с контролем фрагментацию ДНК, меченной БрДУ, индуцированную в клетках линии AGS окислителем пероксинитритом.

Повышение уровня свободных радикалов или снижение активности детоксикационных механизмов в клетке приводит к увеличению клеточного редокс-потенциала и повреждению внутриклеточных макромолекул в результате их окисления, что, в конечном счете, вызывает апоптоз клеток.

Способность пероксида водорода индуцировать апоптоз клеток была показана еще в 1991 г. [17]. Позднее индукция апоптоза свободными радикалами была продемонстрирована на различных типах клеток. К настоящему моменту известны некоторые из путей реализации апоптотических каскадных процессов. Одной из центральных ролей при этом отводят митохондриям, снижение целостности мембран которых приводит к высвобождению цитохрома c и активации эффекторных каспаз [18].

Способность антиоксидантов снижать уровень апоптоза, и, таким образом, риск развития различных заболеваний, была показана на различных клеточных культурах [19]. Методы детекции апоптоза в культивируемых клетках многочисленны и могут быть классифицированы на основании биологического эффекта, вызываемого свободными радикалами в клетке (табл. 2) [20].

Среди методик, основанных на определении морфологии клеток, широкое распространение в *in vitro* исследованиях приобрел метод окрашивания ядер красителем Hoechst 33342, который связывается с конденсированным хроматином апоптотических клеток, в меньшей степени — с хроматином нормальных клеток. Интенсивность окрашивания клеток при этом детектируют по флуоресценции красителя.

По уровню апоптоза клеток Кук с соавт. [21] определяли антиоксидантный эффект кверцетина на клеточной линии RPE пигментного эпителия сетчатки. При окрашивании клеток Hoechst 33342 и МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) показано, что кверцетин снижает оксидативный стресс и гибель клеток, индуцированную пероксидом водорода. Кроме того, отмечено снижение уровня каспазы-3, участвующей в индукции апоптоза.

Целостная митохондриальная мембрана живых клеток обладает электрическим градиентом, генерируемым протонной помпой электронно-транспортной цепи митохондрий и выражающимся в величине потенциала митохондриальной мембраны. Увеличение проницаемости митохондриальной мембраны приводит к высвобождению из митохондрий цитохрома c и активации каспаз, что является одним из главных маркеров клеточной гибели [22].

Оценка потенциала митохондриальной мембраны проводится посредством окрашивания различными флуоресцентными красителями. Катионные флуорохромы в живых клетках за счет разности потенциалов проникают сквозь митохондриальную мембрану, а изменение флуоресценции детектируется на флуориметре [23].

Так, краситель JC-1 является членом цианинового семейства флуорохромов и обладает различными спектрами флуоресценции: мономеры – зеленой, агрегаты – красной. При этом в нормальных клетках происходит накопление красителя в митохондриях с образованием агрегатов, а митохондрии клеток в состоянии апоптоза содержат только мономеры красителя.

Помимо увеличения проницаемости митохондриальных мембран маркером запрограммированной клеточной гибели является повышение экспрессии проапоптотических белков на фоне снижения экспрессии антиапоптотических. Важнейшими регуляторами процесса апоптоза являются каспазы и белки семейства Bcl. Экспрессию проапоптотических белков используют как маркер оксидативного стресса, вызываемого окислителями. Наиболее важными маркерами при этом являются белки семейства Bcl-2, играющие ключевую роль в регуляции апоптоза (Bcl-2, Bax, Bcl-xL), митоген-активированные протеинкиназы (p42/44MAPK, p38MAPK) и другие протеинкиназы (phospho-Chk2), каспазы 2,3,7 и 12.

Чен с соавт. [24] исследовали антиоксидантные свойства куркумина на клеточной линии HepG2 при индукции СРО перекисью водорода. Отмечено, что куркумин снижает интенсивность СРО и экспрессию Bax, Bcl-2, Bcl-xL, и p38MAPK, повышает уровень phospho-p38MAPK, p42/44MAPK и phospho-p42/44MAPK и не оказывает достоверного влияния на митохондриальный потенциал клеток при окрашивании клеток красителем JC-1 и фрагментацию ДНК. В совокупности эти данные свидетельствуют об антиоксидантном и антиапоптотическом действии куркумина.

Гибель клеток приводит к высвобождению в культуральную среду цитозольных белков. Одним из маркеров клеточной гибели является цитозольный фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ), уровень которого в культуральной среде определяется спектрофотометрически широко доступными промышленными наборами [25].

Рубиоло и Вега [26] определяли антиоксидантную активность резвератрола на первичной культуре гепатоцитов крысы. Было показано, что резвератрол достоверно снижает клеточную гибель и выброс ЛДГ в культуральную среду по сравнению с контролем, где использовалось воздействие на клетки гидропероксида.

Эндогенные антиоксидантные ферменты клетки защищают биомолекулы от повреждающего действия свободных радикалов [27]. Так, фермент супероксиддисмутаза превращает супероксиданион кислорода в менее реакционно способный и более гидрофобный пероксид водорода. Каталазы и глутатионзависимые пероксидазы катали-

зируют превращение пероксида водорода в молекулу воды.

Повышение уровня эндогенных антиоксидантных ферментов является одним из важнейших маркеров СРО [28]. При этом важен баланс между скоростью генерации АФК и способностью системы антиоксидантной защиты их эффективно обезвреживать. Генерация ряда АФК протекает с участием прооксидатных ферментов (НАДФ-оксидаза, ксантиноксидаза, индуцибельная NO-синтетаза, миело- и лактопероксидаза и др.) При этом показано, что уровень прооксидантных ферментов повышается в крови пациентов при различных заболеваниях [29].

Мендис с соавт. [30] определяли антиоксидантную активность ферментированного гидролизата желатина из кожи рыб на культивируемых клетках гепатомы человека линии Hep3В. После воздействия на культуру различными концентрациями гидролизата получали клеточные лизаты, в которых определяли активность каталазы, глутатион пероксидазы, супероксиддисмутазы. Показано, что гидролизаты обладают антиоксидантной активностью, выражающейся в повышении уровней активностей ферментов системы антиоксидантной защиты.

Глутатион-S-трансферазы представляют собой семейство изоферментов, играющих важнейшую роль как в метаболизме ксенобиотиков, так в процессе антиоксидантной защиты, катализируя реакцию превращения пероксида водорода в воду. Глутатион-S-трансфераза является одним из маркеров оксидативного стресса. Показано снижение ферментов в образцах крови и тканях при различных заболеваниях [31].

Джанг с соавт. [32] изучали антиоксидантные свойства изокверцитина из растения *Thuja orientalis* при воздействии перекиси водорода на клеточную линию ганглиев сетчатки линии RGC-5. Показано, что изокверцитин снижает уровень глутатиона, каталазы и глутатионпероксидазы-1 в культуральной среде по сравнению с таковой без воздействия изокверцитина.

Супероксид-анион радикал активирует NO-синтазу, которая образует в тканях нитрозил-радикал, обладающий широким спектром биологических эффектов, важнейшим из которых является регуляция сокращения стенок кровеносных сосудов. Нитрозил-радикал является токсичным для клеток и способен индуцировать апоптоз, что продемонстрировано на макрофагах и астроцитах [33].

Уровень нитрозил-радикала является биомаркером СРО в клетке, и определяется по концентрации продуктов его реакции с кислородом и супероксид-радикалом в клетке – нитритов и нитратов. Разработан целый ряд методов для

Таблица 3. Некоторые клеточные модели для оценки антиоксидантного действия биологически активных соединений

Клеточная модель	Оцениваемый параметр	Источник	Антиоксидант	Источник
Сасо-2 рак кишечника	Ингибирование СРО	Красные апельсины	Фенольные соединения, вит. С, антоцианины	[81]
MRC5 фибробласты человека	Снижение оксидативно- го повреждения ДНК	—	Ресвератрол	[82]
3Т3 (NIH) мышинные эмбриональные фибробласты	Снижение уровня апоптоза клеток при воздействии индукторов СРО	Экстракт <i>Spirulina platensis</i>	Фикоцианин, β-каротин, то- коферол, γ-линоленовая кис- лота, фенольные соединения	[83]
HPF-1 фибробласты человека	Снижение уровня апоптоза клеток при воздействии индукторов СРО	Экстракт чая пу-эр	Полифенолы	[84]
MCF-7 рак молочной железы	Снижение уровня апоптоза клеток при воздействии индукторов СРО	Экстракт черного тмина <i>N. sativa</i> L.	Не идентифицированы	[85]

определения уровня нитритов и нитратов, включая колориметрический (реакция Грисса), хроматографический (ВЭЖХ) и флуоресцентный анализы. Среди них наибольшее распространение нашла реакция Грисса, которая позволяет определять концентрацию нитрита в различных биологических жидкостях, клеточных экстрактах и культуральной среде [34].

Эгучи с соавт. [35] проводили оценку антиоксидантной активности экстрактов моркови, имбиря, лука и чеснока на культивируемых клетках линии RAW264.7 по продукции оксида азота, индуцированной липополисахаридом и гамма-интерфероном. Показано, что многие БАВ обладают ингибиторным действием на продукцию нитрита в клетках, причем экстракт моркови обладал дозозависимым эффектом. Авторы заключают, что данная методика является удобной модельной системой для оценки антиоксидантного эффекта композиций, содержащих БАВ.

Некоторые культуральные тест-системы и методы оценки СРО в культуре приведены в табл. 3.

В заключение раздела необходимо сказать, что использование культуральных тест-систем является весьма перспективной областью и в настоящее время широко используется для оценки антиоксидантных свойств БАВ. Вместе с тем, результаты, получаемые на культуральных тест-системах, необходимо интерпретировать с осторожностью и в сочетании с данными, полученными в результате проведения других *in vivo* и *in vitro* исследований, что обусловлено различными причинами.

Во-первых, рост клеток в культуре сопровождается повышением оксидативного стресса. Так, описано, что так называемый “предел Хейфлика” для фибробластов в значительной степени обу-

словлен повышением интенсивности оксидативного стресса в культуре [36]. Наряду с этим, в ряде работ отмечено, что культивируемые клетки могут подавлять генерацию свободных радикалов в среде [3].

Во-вторых, клетки культивируют в среде, которая может оказывать собственное действие как на биохимические процессы в клетке, так и на исследуемое вещество. Так, многие авторы отмечают, что исследование антиоксидантного эффекта аскорбиновой кислоты и полифенолов (например, флавоноидов) может приводить к артефактам в результате окисления данных соединений в культуральной среде [37]. Кроме того, в культуральных средах DMEM, McCoy's 5A и RPMI-1640 показано образование пероксида водорода при добавлении в них флавоноидов, галловой кислоты, катехинов, кверцетина [37].

В-третьих, к настоящему моменту не существует идеального маркера СРО в клетках. Методики оценки антиоксидантных свойств соединений на культивируемых клетках многочисленны и при выборе конкретной методики в каждом отдельном случае необходимо учитывать механизм антиоксидантного действия исследуемых соединений и ограничения используемого метода. Кроме того, необходимо принимать во внимание, что многие БАВ, включая и те, что обладают функциональными свойствами, подвергаются гидролизу в ЖКТ и метаболизму под действием печеночных ферментов, таким образом, могут изменяться их биологические свойства.

В обзоре Лотито и Фрай [38] отмечается, что биодоступность наиболее интенсивно изучаемой группы антиоксидантов – флавоноидов из растительных источников – достаточно низкая, так же как и их концентрация в крови после добавления в диету богатой флавоноидами пищи. Кроме того,

большинство флавоноидов подвергается интенсивному метаболизму под действием микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), что может значительно изменять их антиоксидантные свойства [38]. Таким образом, важным этапом изучения свойств БАВ в качестве потенциальных компонентов функциональных пищевых продуктов является определение их биодоступности и модификации свойств при переваривании в ЖКТ и метаболизме.

Кроме того, зачастую БАВ при употреблении внутрь попадают в кровь в достаточно малых концентрациях. Так, показано, что биодоступность антиоксиданта куркумина в ЖКТ человека достаточно низкая, а после приема внутрь в плазме крови детектируется не само соединение, а его метаболиты – глюкурониды и сульфаты куркумина, которые обладают более низкой противовоспалительной активностью, а также неактивный метаболит гексагидрокурукумин [39, 40]. Кроме того, показано, что куркумин не детектируется в крови при приеме доз ниже 4 г в сутки. При этом концентрация его метаболитов через час после приема внутрь 3.6 г составила всего 10 нМоль/л [41].

Подводя итоги вышесказанному, необходимо отметить, что использование культуральных моделей для оценки БАВ может предоставлять большой объем информации об их биологическом действии непосредственно на клетки млекопитающих и человека, но результаты данных исследований должны быть интерпретированы в совокупности с другими методами оценки антиоксидантной активности.

Иммуномодулирующая активность. Важнейшую роль в поддержании здоровья организма играет нормальное функционирование иммунной системы. Это становится особенно очевидным в последние два десятилетия, когда в развитых и развивающихся странах отмечается все возрастающее количество иммуно-опосредованных заболеваний, таких как рассеянный склероз, диабет 1 типа, различные аллергические заболевания [42]. Эти изменения обусловлены, в первую очередь, негенетическими факторами, такими как неблагоприятные изменения в окружающей среде и диете, а также побочными эффектами медикаментозной терапии.

В то же время, рост распространенности таких патологий, как астма и аллергические заболевания, в последнее время связывают с резким снижением контактов человека с микроорганизмами, что ведет к неполноценности иммунной системы человека [42]. В связи с этим все большее внимание привлекают биологически активные компоненты, корректирующие состав микрофлоры кишечника (про- и пребиотики) и нарушения

в иммунном статусе, обладающие мягким воздействием и способные к неспецифической защите организма.

Данная концепция привела к появлению термина “иммунопитание” (“immunonutrition”), обозначающего специфические компоненты пищи, обладающие иммуномодуляторным действием, например, специфические аминокислоты (аргинин, глутамин), витамины А, С, D, Е, металлы (цинк, селен), нуклеотиды, ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты и полисахариды [42].

Иммуномодулирующие компоненты могут влиять как на врожденный, так и на приобретенный иммунитет. Врожденный иммунитет обеспечивается функционированием фагоцитарных (нейтрофилы, макрофаги), воспалительных (базофилы, тучные клетки), дендритных клеток и естественных киллеров (NK-клетки), барьерной резистентностью кожи и слизистых оболочек, а также синтезом многообразных про- и противовоспалительных цитокинов, факторов комплемента и белков острой фазы.

Приобретенный иммунитет выражается в пролиферации различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток – Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающих клеточный иммунный ответ [43]. В настоящее время отмечена иммуномодулирующая активность у различных БАВ и микроорганизмов, входящих в состав пищевых продуктов. Так, иммуномодулирующая активность была показана для коровьего β -лактоглобулина и α -лактальбумина, входящих в состав коровьего молока, выражающаяся в стимуляции синтеза *de novo* IL-1Ra нейтрофилами человека и высвобождении некоторых других противовоспалительных молекул [44]. Целая группа иммуномодулирующих белков описана в грибах (иммуномодулирующие грибные белки – ИГБ), включая *Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea* и др. Кроме того, показан иммуномодулирующий эффект различных β -глюканов, выделенных из бактерий, грибов, морских водорослей и хлебных злаков, вероятно, в результате их воздействия на макрофаги и NK-клетки [42].

Для анализа иммуномодулирующей активности используются многообразные *in vivo* и *in vitro* модели, включая лабораторных животных и культивируемые клетки человека и млекопитающих.

Для тестирования иммуномодулирующей активности широко используют *in vivo* модели – иммунизированных лабораторных мышей, которым в рацион вводят тестируемые БАВ. От животных получают культуру спленоцитов для оценки уровня продукции специфических антител (реагиновые антитела IgE-изотипа) и цитокинов [45].

Таблица 4. Наиболее распространенные *in vitro* модели для оценки иммуномодулирующей активности, использующие культивируемые клетки

Клеточная линия	Биологически активные соединения/композиции	Метод оценки	Источник
RAW264.7	Диоскорин из ямса (<i>Dioscorea alata L.</i>)	Генерация оксида азота, синтез ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α	[86]
THP-1	Полисахариды из грибов <i>Agaricus bisporus</i> и <i>A. brasiliensis</i>	Продукция ИЛ-1 β , ФНО- α , циклооксигеназы-2	[87]
U937	Бычий гликомакропептид	Пролиферация клеток, фагоцитарная активность	[88]
HL-60	Тимопентин (пептид из 5 а.о.)	Ингибирование пролиферации клеток	[89]
J774A.1	Экстракт прополиса и его флавоны (кризин, галангин, кемпферол, кверцетин)	Экспрессия мРНК ИЛ-1 β , индуцибельной NO-синтазы (iNOS), продукция оксида азота	[90]
JURKAT E6-1	Кампестерол (стерол растительного происхождения)	Продукция ИЛ-2, 4, 10, ИФН- γ	[91]
HEK293	Бактериальные и синтетические олигонуклеотиды	Экспрессия рецептора TLR9	[92]
Mono Mac 6	Фракция с массой более 20 кДа из натурального меда	Продукция ИЛ-6	[93]

Таблица 5. Методики определения иммуномодулирующей активности *in vitro* на культивируемых клетках

Оцениваемый параметр	Метод	Методика определения
Оценка пролиферативного ответа	БрдУ	Определение количества пролиферирующих клеток методом ИФА по инкорпорации дромдезоксигуанидина в ДНК
	МТТ, ХТТ	Определение количества метаболически активных клеток по метаболизму растворимых солей формазана в клетке
	CFSE	Пролиферация Т-хелперов (CD4+ cells) методом проточной цитометрии
Дифференцировка клеток и цитокиновый ответ	ELISPOT	Распознавание и подсчет антиген-специфических Т-лимфоцитов (Th1, Th2) методом проточной цитометрии
	ICS	Выявление цитокин-продуцирующих клеток методом проточной цитометрии
	ИФА (ELISA)	Определение уровня про- и противовоспалительных цитокинов в культуральной жидкости
	СВА (Cytometric Bead Array)	Определение экспрессии цитокинов (ИФН- γ /ИЛ-2/ИЛ-4/ИЛ-5/ИЛ-10/ФНО- α) методом проточной цитометрии

Традиционными *in vitro* моделями для тестирования иммуномодулирующих свойств являются одноклеточные макрофаги периферической крови, выделенные из крови человека и млекопитающих [46]. Из периферической крови получают одноклеточные клетки, которые культивируют в присутствии исследуемого вещества. Параметры, по которым оценивают иммуномодулирующий эффект, включают продукцию цитокинов, а также активацию различных иммунокомпетентных клеток — естественных киллеров (CD56+), Т-лимфоцитов (CD3+), цитотоксических Т-клеток (CD8+) и CD4+ Т-клеток. Активацию регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) определяют по внутриклеточному содержанию белка Foxp3, являющегося

маркером клеток с данным типом дифференцировки.

Для оценки иммуномодуляторной активности разработаны многочисленные культуральные модели, использующие культивируемые макрофаги и лимфоциты человека и мыши, как правило, опухолевого происхождения (табл. 4).

Иммуномодуляторная активность, изучаемая на *in vitro* клеточных моделях, базируется на оценке пролиферативного и метаболического ответа клеток иммунной системы и экспрессии цитокинов (табл. 5). Пролиферативный ответ оценивают как прямым подсчетом клеток в гемоцитометре, так и посредством наборов, определяющих количество метаболически активных клеток (тесты с МТТ (3-

(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) или ХТТ (внутренняя соль 2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2*H*-тетразолий-5-карбоксамид)) и интенсивности синтеза ДНК в клетках и др. Активацию иммунных клеток оценивают по экспрессии цитокинов: интерлейкинов (ИЛ-1 β , 6, 8, 10), ФНО- α , а также синтезу оксида азота.

Уровень экспрессии различных цитокинов играет ключевую роль в развитии иммунных реакций. Так, ИЛ-1 β участвует в воспалительных реакциях, врожденном иммунитете, иммуномодуляции; ИЛ-6 играет ключевую роль в иммунном ответе, в том числе, синтезе белков острой фазы, поддержании гомеостаза, и действует как про- и противовоспалительный цитокин. ИЛ-12 является фактором, стимулирующим созревание наивных Т-лимфоцитов в Т-хелперы, а также индуцирует продукцию гамма-интерферонов (ИФН- γ), фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) из Т-лимфоцитов и НК-клеток.

Моноцитами, макрофагами и нейтрофилами генерируется оксид азота, который имеет ключевое значение при иммунном ответе. Различные изоформы NO-синтазы катализируют образование оксида азота, активируемое липополисахаридами и различными цитокинами Т-хелперов, включая ИФН- γ и ФНО- α . Снижение индуцируемой липополисахаридами продукции NO в культуральной среде клеток под действием исследуемых БАВ, определяется с использованием реагента Грисса и является маркером иммуномодулирующего действия [47].

Линия клеток RAW264.7 макрофагов крысы является удобной моделью для оценки иммунного ответа. С использованием данной модели Лиу с соавт. [48] было показано, что экзополисахариды некоторых штаммов пробиотических бактерий *Lactobacillus* обладают иммуномодулирующим эффектом, выражающимся в дозо-зависимом повышении экспрессии цитокинов ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-1 β .

В заключение раздела необходимо отметить, что, несмотря на то, что использование культуральных тест-систем для оценки иммуномодулирующего действия БАВ играет лишь второстепенную роль, их применение представляется весьма перспективным, поскольку они позволяют выявлять действие на отдельные пути иммунного ответа, например, на синтез отдельных цитокинов. Несмотря на это, анализ результатов данных исследований необходимо проводить во взаимосвязи с результатами исследований *in vivo*, поскольку иммунный ответ представляет собой сложный многокомпонентный процесс, обеспечивающийся функционированием разнообразных иммунокомпетентных клеток с вовлечением целого кас-

када цитокинов с обратными связями, не сводящийся только к активации или подавлению синтеза различных субпопуляций лимфоцитов.

Оценка пре- и пробиотической активности. В связи с высокой распространенностью воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в последнее десятилетие особое внимание исследователей привлекают про- и пребиотики. Пробиотики (лактобактерии, бифидобактерии) и пребиотики (олигосахариды) активно используются для создания продуктов, имеющих направленное благотворное действие на пищеварительную систему и снижающих частоту воспалительных желудочно-кишечных заболеваний.

Согласно ВОЗ, термин “пробиотик” определяет “живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают положительное влияние на здоровье организма хозяина”. Основные регулирующие руководящие принципы для тестирования пробиотической активности были разработаны ВОЗ в 2002 г. Согласно им, пробиотик должен быть устойчивым к воздействию желудочного сока и желчных кислот, адгезироваться к слизи и/или эпителиальным клеткам человека и ингибировать рост и колонизацию болезнетворными микроорганизмами [49].

Изучение одного из главных свойств пробиотиков – устойчивость к воздействию желудочного сока и желчных кислот, проводят на разнообразных *in vitro* моделях. Такие *in vitro* модели позволяют проводить оценку устойчивости бактерий к действию соляной кислоты желудка и желчных кислот в условиях, имитирующих желудочное содержимое (рН 1–3, длительная инкубация до 3 ч, инкубация с пепсином) или содержимое тонкой кишки (рН 7, инкубация с панкреатином, тауродезоксихолевой кислотой) [50].

Несмотря на широкое использование, *in vitro* модели кишечника имеют и несомненные недостатки, в том числе, невозможность моделировать разнообразные биологические реакции в ходе переваривания питательных веществ [51]. Развитие культуральных моделей кишечника позволило преодолеть некоторые из ограничений *in vitro* моделей и позволило расширить возможности *in vitro* исследований про- и пребиотиков.

Типичные культуральные *in vitro* модели представляют собой культивируемые клетки эпителия кишечника, чаще всего, опухолевого происхождения. Наиболее частыми *in vitro* моделями являются культуральные клеточные модели, использующие линии эпителиальных клеток кишечника человека Caco-2, HT-29, HT29-MTX и свиньи I-407, IPES-J2 (табл. 6) [49]. Они позволяют определять такие важнейшие характеристики новых потенциальных пробиотиков, как адгезию и колонизацию,

Таблица 6. Основные свойства пробиотиков и некоторые *in vivo* и *in vitro* модели для их оценки

Свойство пробиотика	Модель		Оцениваемый параметр	Источник
Устойчивость к действию кислот	<i>in vitro</i>		Количество жизнеспособных клеток после инкубации при кислых и щелочных значениях pH, с пепсином и панкреатином с желчными кислотами	[94]
Адгезия и колонизация	<i>in vivo</i>	Гнотобиотические свиньи	Колонизация кишечника <i>E. coli</i> после предварительной колонизации <i>Lactobacillus</i>	[95]
	<i>in vitro</i>	Сасо-2 (линия аденокарциномы кишечника человека)	Количество адгезировавшихся бактерий после инкубации с исследуемыми штаммами <i>Lactobacillus</i> и последующей отмывки	[96]
Подавление роста патогенной микрофлоры	<i>in vitro</i>		Ингибирование суспензией роста <i>H. pylori</i> при культивировании на агаризованной среде	[97]
	<i>in vitro</i>	C2BBe1 (линия аденокарциномы кишечника человека)	Ингибирование адгезии <i>E. coli</i> на клетках после преинкубации с штаммами <i>Lactobacillus</i>	[98]
Иммуномодуляторные	<i>in vivo</i>	Лабораторные мыши, в рацион которых вводили <i>Lactobacillus</i> из ферментированной растительной пищи	Увеличение популяции Т- и В-лимфоцитов, продукция цитокинов	[99]
	<i>in vitro</i>	Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) от больных с аллергией на пыльцу	Снижение продукции ИЛ-12, ИФН- γ , ФНО- α при инкубации клеток с штаммами <i>Lactobacillus</i>	[100]
	<i>in vitro</i>	RAW264.7	Ингибирование штаммами <i>Lactobacillus</i> экспрессии ИЛ-6 в клетках после стимуляции липополисахаридом	[101]

подавление роста патогенной микрофлоры, а также иммуномодуляторную активность.

Адгезия к слизи, гликопротеинам и эпителиальным клеткам, а также колонизация в ЖКТ хозяина является основополагающими характеристиками микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами. *In vivo* оценку адгезии и колонизации проводят на гнотобиотических лабораторных крысах и свиньях. Животным добавляют в рацион исследуемые штаммы бактерий и оценивают колонизацию различных отделов кишки [52].

Адгезию бактерий в клеточной модели оценивают по стандартной методике, включающей культивирование клеток в культуральной среде, содержащей известное количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизма (как правило, около 1–2 ч), с последующей аспирацией среды и отмывкой клеток от неадгезированных бактерий и подсчетом адгезировавшихся на клетках микроорганизмов по отношению к первоначальной численности микроорганизмов. В качестве положительного контроля адгезии, как правило, используют штаммы *E. coli*, связывание которых с эпителиальными клетками достигает значения 50%.

Мараккоудакиза с соавт. [50] определяли адгезивные свойства различных штаммов пробиотических лактобактерий из молочных продуктов к клеткам Сасо-2. Была показана высокая адгезивная способность некоторых штаммов, в том числе *L. plantarum* ACA-DC 146, достигающая 25.5%, в то время как адгезия штамма *E. coli* TG-1 составила 48.3% [50].

Важным свойством пробиотических бактерий является ингибирование роста патогенных микроорганизмов. Методика оценки ингибирования роста штамма в культивируемых клетках эпителия кишечника, среди которых наибольшее распространение имеет Сасо-2, включает предварительную инкубацию клеток с исследуемым штаммом, их отмывку и последующую инкубацию со штаммом патогенного микроорганизма (*E. coli*, *S. typhimurium*, *H. pylori* и др.). Подсчет количества адгезировавшихся патогенов оценивают по сравнению с контролем – клетками, не инкубированными с исследуемыми пробиотическими микроорганизмами.

Лиин с соавт. [53] определяли бактерицидное действие на *Helicobacter pylori* десяти штаммов лактобактерий, выделенных из различных пищевых продуктов, на культуре клеток желудочного

Таблица 7. Классы пребиотиков и их эффекты

Пребиотик	Доказанный эффект	Источник
Олигосахариды		
Фруктоолигосахариды (ФОС) Фруктоолигосахариды Олигофруктоза Инулин	Бифидогенность Подавление патогенной флоры	[102]
Галактоолигосахариды	Бифидогенность Подавление патогенной флоры	[103]
Олигосахариды сои	Бифидогенность	[104]
Олигосахариды неусвояемые, но ферментируемые в кишечнике Лактулоза	Бифидогенность Подавление патогенной флоры	[105]
Олигосахариды неусвояемые, но ферментируемые в кишечнике Лактосукроза Глюкоолигосахариды Ксилоолигосахариды Изомальтоолигосахариды Мальтоолигосахариды Циклодекстрины	Бифидогенность Бифидогенность Бифидогенность Бифидогенность Подавление патогенной флоры Бифидогенность	
Хитоолигосахариды	Антимикробный	
Полисахариды		
Крахмал, гемицеллюлоза, пектины	Бифидогенность	[106]

эпителия линии AGS [53]. Антагонистическую активность супернатанта культуры лактобактерий определяли по содержанию органических кислот методом HPLC. Кроме того, бактерицидную активность супернатанта на клеточной линии AGS определяли по снижению адгезии *H. pylori* на клетках. Авторами показано, что органические кислоты, выделяемые некоторыми штаммами лактобактерий, обладают ингибирующим действием на адгезию *H. pylori* к клеткам эпителия желудка.

Способность пребиотиков снижать проницаемость эпителия кишечника для патогенных микроорганизмов легла в основу разработанного Клинбергом с соавт. [54] метода для оценки пробиотической активности. Данный метод основывается на измерении трансэпителиального сопротивления (ТЭС) поляризованного монослоя клеток Caco-2 после воздействия пребиотика. Авторами было отмечено, что штаммы *Lactobacillus plantarum* MF1298 и *Lactobacillus salivarius* DC5 вызывают наибольшее повышение значения ТЭС, в то время как патоген *L. monocytogenes* снижает данную величину. Таким образом, измерение ТЭС может быть удобным методом оценки способности пребиотика повышать межклеточные контакты, предотвращающие проникновение патогенов в кровеносное русло [54].

В настоящее время известно, что пробиотические микроорганизмы обладают иммуномодулирующим действием, обеспечиваемым различными механизмами [49]. Пробиотические микроорганизмы методом трансцитоза проникают через кишечный эпителий и захватываются макрофагами и дендритными клетками, вызывая индукцию иммунного ответа и секрецию различных цитокинов, включая IL-10, 12 и ФНО- α способствуют развитию гуморального иммунитета хозяина.

Оценку иммуномодулирующего эффекта пребиотиков проводят с использованием как *in vivo*, так и *in vitro* моделей. Так, Матсумото с соавт. показали, что некоторые штаммы *Lactobacillus* ингибируют липополисахарид-индуцированную экспрессию ИЛ-6 в клеточной линии RAW264.7 [55].

Термин “пребиотик” характеризует БАВ, которые вызывают специфические изменения в составе и/или активности желудочно-кишечной микрофлоры, что оказывает благотворное влияние на самочувствие и здоровье хозяина [56]. На основании данного определения пробиотическим, или бифидогенным, действием может обладать БАВ со следующими свойствами.

1) Неусвояемость в ЖКТ: отсутствие изменений в структуре соединения под действием желудочного сока и ферментов ЖКТ. Для оценки данных свойств используются как *in vitro*, так и *in vivo*

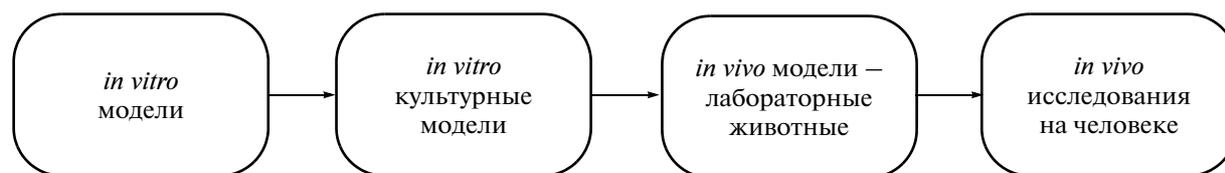


Рис. 1. Стратегия исследований про- и пребиотической активности БАВ.

модели, включая крыс после антибиотикотерапии, проктоколэктомии, илеостомии для выявления непереваренных пребиотиков в кале, дистальном отделе подвздошной кишки или содержанием тонкой кишки, соответственно [49].

2) Ферментация под действием кишечной микрофлоры. Для оценки данной характеристики используются *in vitro* модели, в которых под действием бактерий происходит ферментирование исследуемого углевода, и *in vivo* модели — лабораторные крысы, в кишечник которых заселяют микрофлору, по составу приближенную к микрофлоре кишечника человека. Пребиотик в составе питья или корма добавляют в рацион питания лабораторных животных, а получаемое кишечное содержимое и кал исследуют на состав микрофлоры [49].

3) Селективная стимуляция роста и активности кишечных бактерий. Данные параметры достаточно сложно оценить в *in vitro* экспериментах, поскольку состав кишечной микрофлоры характеризуется сложностью и вариациями в течение времени. Наилучшей *in vitro* моделью для оценки данных параметров является количественный подсчет бактерий в образце фекалий до и после кормления пребиотиком. Основные классы пребиотиков и их доказанные свойства суммированы в табл. 7.

Оценка пребиотического действия БАВ на *in vitro* клеточных моделях имеет к настоящему времени лишь фундаментальное значение для изучения механизмов антиадгезивной, ингибирующей рост бактерий и иммуномодулирующей активности пребиотиков и является перспективным направлением для дальнейшего развития.

Шоав с соавт. [57] исследовали способность коммерчески доступных пребиотиков к ингибированию связывания энтеропатогенных штаммов *E. coli* на двух клеточных моделях. Связывание *E. coli* с рецепторами на клетках HEp-2 и Caco-2 в присутствии фруктоолигосахаридов, инулина, галактоолигосахаридов (ГОС), лактулозы и раффинозы оценивали методом подсчета колоний при микроскопии. Было отмечено, что ГОС обладают наиболее выраженным дозо зависимым ингибирующим эффектом на связывание *E. coli* с клетками HEp-2 и Caco-2, снижая взаимодействие бак-

терий на 65 и 70%, соответственно. Кроме того, показано выраженное снижение количества бактерий в колониях (с 14 до 4 на колонию). Таким образом, было предположено, что модуляция роста и активности кишечной микрофлоры, оказываемые пребиотиками, вероятно, связаны с их антиадгезивной активностью и их способностью к конкурентному взаимодействию с сайтами связывания патогенов на поверхности эпителиальных клеток кишечника.

К настоящему времени отмечено, что пребиотики играют важнейшую роль в снижении воспалительных реакций ЖКТ. Этот иммуномодулирующий эффект, вероятно, имеет бактериальное происхождение. Существуют, однако, предположения, что этот эффект может быть реализован непосредственно олигосахаридами.

Ценхом с соавт. [58] исследовали противовоспалительный эффект двух олигосахаридов (α 3-сиаиллактозы и ФОС), обладающих пребиотическим действием, на клеточной модели Caco-2. Противовоспалительный эффект определяли по уровню экспрессии генов белков PGlyRP3 и PPAR γ , интерлейкинов и ядерного фактора NF- κ B в культивируемых клетках. Отмечено, что данные олигосахариды имеют противовоспалительный эффект, выражающийся в снижении синтеза белка IL-12 и экспрессии генов, кодирующих IL-12p35, IL-8, ФНО- α и NF- κ B. Данные олигосахариды также индуцируют продукцию PGlyRP3 и PPAR.

Таким образом, несмотря на активное совершенствование *in vitro* моделей, к настоящему времени не представляется возможным полностью заменить *in vivo* исследования потенциальных про- и пребиотиков на исследования *in vitro*. Исследования на лабораторных животных остаются альтернативой исследованиям на человеке. Тем не менее, остается дискуссионным вопрос об экстраполяции результатов исследований, полученных на лабораторных животных, на человека из-за физиологических различий метаболизма животных и человека. В то же время, проведение исследований на человеке ограничено социальными и этическими аспектами, и, как правило, включает только копрологический анализ.

Исследование функциональных свойств про- и пребиотиков должно включать комбинацию *in*

Таблица 8. Некоторые культуральные модели для оценки химиопрофилактического действия биологически активных веществ

Заболевание	Клеточные модели	Химиопрофилактическое соединение	Механизм действия и некоторые молекулярные мишени	Источник
Рак печени	HepG2	Фукоксантин	Активация апоптоза, антипролиферативный эффект ↑p53, ↑Bax, ↓Bcl-2, ↓COX-2, ↓STAT1,3,5 ↓AKT, ↓CyclinD1	[107]
Рак молочной железы	MCF-7 AMCF-7/TH	Фитоэстрогены	Активация апоптоза, антипролиферативный эффект ↑p53, ↓COX-2, ↓Bcl-2, ↓CyclinE, ↓IL-1,6,8, ↑Caspases	[108]
Рак кишечника	HT-29 HCT116 SW480	Фронданол А5 из <i>Cucumaria frondosa</i>	Активация апоптоза, антипролиферативный эффект ↓Cdc25c, ↑p21, фосфорилирование H2AX	[109]
Рак легкого	A549 H1299 NCI-H209	Апигенин	Ингибирование ангиогенеза ↓AKT, ↓p70S6K1, ↓VEGF	[110]
Миелоидная лейкемия	HL-60	Кверцетин	Активация апоптоза ↑Bax, фосфорилирование Bcl-2, фрагментация ДНК	[67]

in vitro и *in vivo* методик, каждая из которых позволяет получать определенные результаты и, при совместном использовании, позволяет всесторонне изучить биологические характеристики исследуемого объекта. Схематически стратегия данного анализа представлена на рис. 1.

Химиопрофилактические свойства. Опухолевые заболевания в структуре смертности в развитых странах занимают 3 место после ишемической болезни сердца и цереброваскулярных заболеваний. По данным статистики РФ за 2010 г., смертность от злокачественных новообразований составляет 14.4% от всех причин. В связи с этим поиск новых методов профилактики онкозаболеваний приобретает важное медико-социальное значение [59].

Под химиопрофилактическим действием (англ. “chemoprevention”) понимают использование натуральных или синтетических соединений для замедления или остановки процесса канцерогенеза до того, как опухолевые клетки инвазируют окружающие ткани и/или дадут метастазы в отдаленные органы [59]. Химиопрофилактические соединения предотвращают трансформацию клеток в опухолевые за счет остановки молекулярных каскадов, которые, в конечном счете, активируют канцерогенез. Эффект химиопрофилактических агентов на опухолевые клетки или клетки в предопухолевом состоянии включает супрессию трансформации и пролиферации, а также индукцию апоптоза клеток [60].

По данным Долла и Пето, в среднем, 35% всех смертей от опухолевых заболеваний ассоциировано с алиментарными факторами [61]. Эпидемиологические исследования, показывающие снижение риска развития различных онкологических заболеваний при употреблении в пищу некоторых фруктов и овощей, способствовали активному изучению входящих в них химиопрофилактических соединений. К настоящему времени различные химиопрофилактические соединения и их молекулярные мишени установлены для пищевых ингредиентов и лекарственных растений [62]. Национальным институтом злокачественных новообразований США (National Cancer Institute) отмечено около 35 растений, употребляемых в пищу, которые содержат БАВ с химиопрофилактическим действием: чеснок, соевые бобы, имбирь, лук, томаты, брюссельская капуста и др. [63].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый за последние десятилетия в изучении химиопрофилактических соединений, поиск новых БАВ остается весьма актуальным. Химиопрофилактические агенты должны удовлетворять следующим требованиям: низкая токсичность для нормальных клеток; высокая эффективность действия против различных опухолевых клеток; пригодность для приема внутрь; известный механизм действия; низкая стоимость; признание широкими массами людей [64].

Механизм действия некоторых соединений уже открыт, других – продолжает активно изучаться. Уже известно, что химиопрофилактические

ский эффект является результатом аддитивного действия множества различных молекулярных процессов: снижения СРО, противовоспалительной активности, подавления пролиферации и индукции апоптоза и др. (табл. 8).

Для исследования новых химиопрофилактических агентов проводят анализ эпидемиологических данных и эксперименты на лабораторных животных. Однако, поиск и характеристика молекулярных мишеней химиопрофилактических соединений неразрывно связаны с развитием клеточных *in vitro* моделей. Применение моделей культивируемых опухолевых клеток позволяет не только оценивать эффективность и токсичность БАВ, но и определять молекулярные каскады их биологического действия (табл. 8).

Различные культивируемые клетки опухолевого происхождения используются для определения химиопрофилактических свойств, среди которых наибольшее распространение получила линия клеток НерG2 [65]. Выбор данной клеточной модели определяется тем, что метаболизм поступающих с пищей ксенобиотиков происходит в гепатоцитах. Линия клеток НерG2, имеющая печеночное происхождение, сохраняет многие характеристики гепатоцитов, включая индукцию ферментов фаз I и II и метаболизм ксенобиотиков [66]. Таким образом, данная модель позволяет оценивать не только эффекты различных соединений на клетки, но и оценивать происходящие с ними изменения в ходе метаболизма печеночными клетками.

В связи с различными молекулярными мишенями и механизмами действия химиопрофилактических соединений на клетки методики оценки биологических свойств на культуральных моделях многочисленны. Химиопрофилактическое действие изучают на уровне клеток (подавление пролиферации, индукция апоптоза, арест клеточного цикла), белков (экспрессия противовоспалительных, проапоптотических белков, белков клеточного цикла и репарации ДНК) и нуклеиновых кислот (изменение экспрессии генов). Примеры использования культуральных тест-систем для оценки химиопрофилактического действия пищевых компонентов представлены в табл. 8.

Так, для кверцетина, флавонола из различных растительных источников, показано химиопрофилактическое действие на различных клеточных моделях — линиях рака кишечника (HT-29, SW480), молочной железы (MCF-9), предстательной железы (LNCaP, PC-3), легкого (A549, H1299). Показано, что кверцетин повышает экспрессию и в клетках проапоптотических белков и белков клеточного цикла (Вах, p53, p21, p27), снижает экспрессию антиапоптотических белков

(Bcl-2), что, в конечном итоге, приводит к аресту клеточного цикла, инициации апоптоза, ингибированию пролиферации клеток [67].

В целом, тест-системам, использующим культивируемые опухолевые клетки человека, принадлежит ключевая роль в оценке на доклиническом этапе новых потенциальных химиопрофилактических соединений. Показано, что многие из экспериментов *in vitro* подтверждаются в дальнейших клинических испытаниях. Так, Вольтер с соавт. [68] исследовали химиопрофилактическое действие резвератрола на культуре клеток аденокарциномы кишечника человека линии Сасо-2. Было показано, что резвератрол характеризуется дозо-зависимым ингибирующим эффектом на рост опухолевых клеток. Данные исследования согласуются с данными Шнайдер с соавт. [69] на мышцах линии Min, генетически предрасположенных к развитию опухолей кишечника за счет наличия мутации в гене Арс. При введении мышам в рацион этанольного экстракта резвератрола в течение семи недель было показано, что у опытной группы по сравнению с контрольной на 70% снижается риск возникновения опухолей кишечника.

Таким образом, исследования, проводимые на культивируемых клетках, позволяют не только отбирать из большого количества потенциально значимых веществ наиболее биологически активные, но и определять мишени их биологических эффектов, что дает ключ к пониманию механизма их химиопрофилактического действия.

Трехмерные клеточные модели. Используемые в настоящее время клеточные культуры представляют собой двумерные модели (2D модели), которые извлечены из естественных условий — живой ткани. В то же время, клетки в ходе своего роста и дифференцировки *in vivo* приобретают их естественную трехмерную структуру, которая оптимальна для их нормального роста и выполнения функций. Кроме того, клетки поддержаны сложной трехмерной внеклеточной матрицей, которая облегчает взаимодействие между клетками посредством как прямых контактов, так и в результате экспрессии цитокинов и ростовых факторов.

Многие из этих факторов изменяются при извлечении клеток из живых тканей и создании 2D моделей. При этом способность клеток приобретать естественную морфологию или взаимодействовать между собой резко снижается. Так, известно, что форма клетки и межклеточные контакты влияют на цитоскелет, который, в свою очередь, может регулировать экспрессию белков и, следовательно, функции клетки. Таким образом, общепризнанным является тот факт, что отсутствие естественных трехмерных взаимодей-

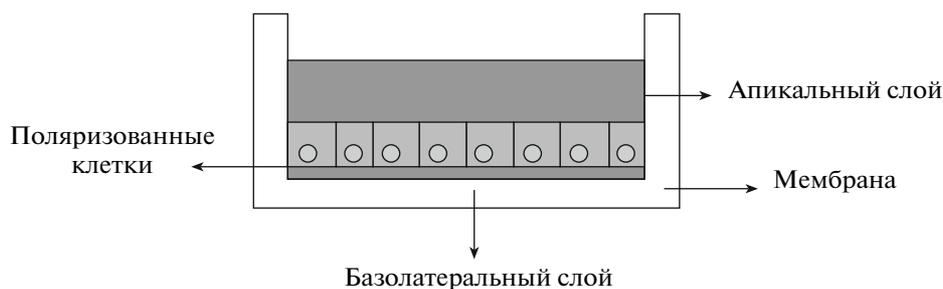


Рис. 2. Трехмерная модель кишечной стенки для изучения биодоступности БАВ.

ствий влияет на результаты исследований, полученных на 2D клеточных моделях [70].

В связи с этим все большее внимание в настоящее время привлекают трехмерные клеточные модели (3D), представляющие собой двумерные культуры, растущие в трехмерном пространственном микроокружении. Имеются работы, которые показывают преимущество растущих в 3D культуральных условиях клеток по сравнению с обычными 2D культурами [71]. Так, было отмечено, что рост и функция клеток в трехмерных структурах существенно отличаются от характеристик роста 2D культур. Кроме того, разработка микроокружения культивируемых клеток для создания условий роста, которые более адекватно моделируют естественные условия тканей, является существенным шагом для того, чтобы улучшить точность прогнозов тест-систем при исследовании биологических эффектов различных препаратов.

В настоящее время предполагается, что создание трехмерного пространственного микроокружения клеток позволит преодолеть некоторые ограничения, возникающие при проведении экспериментов на 2D моделях. Такие модели учитывают сложные взаимодействия между несколькими типами клеток и являются более адекватными для изучения биологических эффектов БАВ.

Как следствие, существенные усилия в настоящее время направлены на развитие технологий, позволяющих создавать трехмерное пространство для роста клеток, которое объединит 2D модель с ее микроокружением.

3D модели на основе культивируемых клеток разнообразны и могут быть классифицированы на органотипические культуры, клеточные сфериды (гомотипические — представленные только одним клеточным типом, и гетеротипические — состоящие из различных типов клеток одной ткани), клетки, растущие на микроносителях (так называемые “microcarrier cell cultures”), тканевые модели, полученные методом инженерии [70].

В настоящее время наиболее широкое распространение приобретают клеточные модели, растущие на матрице. Они позволяют создать макропористые структуры, которые используются для поддержания роста трехмерных моделей из клеточных культур [72].

В качестве матрицы используются натуральные материалы, полусинтетические и синтетические полимеры. Для создания натуральных матриц используют соли альгиновой кислоты — полисахарида, полученного из водоросли, который используется в качестве естественной основы для роста клеток [73]. Другим широко распространенным материалом, используемым для поддержания роста 3D моделей из клеток различного происхождения, является гидрогель [74]. Он изготавливается из натуральных материалов, таких как агароза, коллаген, фибрин или гиалуроновая кислота. Гидрогели создают трехмерную матрицу и, кроме того, в них можно включать различные молекулы для изменения физических параметров матрицы, таких как проницаемость.

Синтетические матрицы представляют собой микропористые мембраны, изготавливаемые из инертных недеградируемых материалов, таких как полистирол. Матрицы из полистирола обладают такими преимуществами, как простота производства и дешевизна, что делает их удобными для создания 3D клеточных культур [70].

Одной из широко применяемых 3D моделей при исследовании БАВ является модель эпителия кишечной стенки, которая представляет собой культуру клеток эпителия кишечника, растущую на пористой синтетической матрице (рис. 2). В ходе роста клеток происходит поляризация клеток с формированием апикального и базолатеральной поверхностей, имитирующих эпителий кишечной стенки. Данная модель активно используется для определения биодоступности БАВ из кишечника [75].

Активно разрабатываются 3D модели для изучения взаимодействия между клетками, например, вклада стромальных клеток при канцероген-

незе эпителиальных опухолей [76], взаимодействия патогенов с организмом хозяина [77]. Также разрабатываются 3D культуральные модели для экспериментов в области токсикологии [78], химиопрофилактики [79], биодоступности и иммуномодулирующих свойств [75].

Уже разработаны 3D модели, в которых наряду с эпителиальными клетками представлены лимфоидные клетки, имитирующие лимфоидную ткань эпителиальной стенки кишечника, к которым возможно добавить кишечные бактерии. В целом, такие 3D культуры полностью моделируют процессы *in vivo* [75].

Суммируя все вышесказанное, можно сказать, что трехмерные клеточные культуры являются перспективными моделями, которые по сравнению с двумерными более полно отражают процессы *in vivo*. Вместе с тем, технология создания 3D моделях находится на начальном этапе своего развития, и еще только предстоит оценить воспроизводимость и сопоставимость результатов тестирования на 3D моделях с *in vivo* условиями. Трехмерные модели имеют широкое поле для дальнейшего применения, включая биотехнологию функциональных продуктов питания.

Современные тенденции и актуальность использования культуральных моделей для характеристики БАВ.

Перспективность исследований в области культуральных моделей в промышленности функциональных пищевых продуктов можно продемонстрировать библиометрическим анализом научных публикаций за период 2001–2011 гг. с использованием базы данных Thompson Scientific (www.isiknowledge.com). В период с 2001 по 2011 гг. отмечено двукратное увеличение числа публикаций в области применения культуральных моделей для тестирования биологически активных веществ и функциональных пищевых продуктов. Одним из главных направлений развития в области культуральных клеточных моделей являются 3D модели. О перспективности исследований в области 3D культуральных клеточных моделей свидетельствует более чем шестикратное увеличение числа публикаций по данной тематике в период с 2001 по 2011 гг. При этом рост публикационной активности в сфере применения культуральных моделей для тестирования БАВ сопровождается стремительным увеличением числа цитирований с практически 0 в 2001 г. до почти 6000 в 2011 г.

Возрастающий интерес к 3D моделям вполне объясним, поскольку они могут использоваться для решения широкого круга задач, в том числе, при производстве функциональных продуктов питания. Примером применения данной техно-

логии являются 3D модели опухолей человека и предопухолевых состояний для исследования потенциальных химиопрофилактических свойств, как например, полученная Чу с соавт. [80] 3D модель гиперплазии простаты, растущей на полимерной матрице.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта № 02.522.11.2143 от 01 марта 2011 года “Разработка методов создания функциональных продуктов и кормов для домашних животных из малоценного сырья животного происхождения” в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Waris G., Ahsan H.* // J. Carcinog. 2006. V. 5. P. 14.
2. *Ames B.N.* // Science. 1983. V. 221. № 4617. P. 1256–1264.
3. *Halliwel B.* // FEBS Lett. 2003. V. 540. P. 3–6.
4. *Elisia I., Kitts D.D.* // Mol. Cell. Biochem. 2008. V. 312. P. 139–145.
5. *Samaranayaka A.G., Kitts D.D., Li-Chan E.C.* // J. Agric. Food. Chem. 2010. V. 58. № 3. P. 1535–1542.
6. *Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N.* // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2005. V. 15. № 4. P. 316–328.
7. *Montuschi P., Barnes P.J., Roberts L.J.* // FASEB J. 2004. V. 18. P. 1791–1800.
8. *Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P.* // Clin. Chem. 1997. V. 43. P. 1209–1214.
9. *Mendes R., Cardoso C., Pestana C.* // Food Chem. 2009. V. 112. P. 1038–1045.
10. *Hwang E.S., Bowen P.E.* // Biofactors. 2005. V. 23. № 2. P. 97–105.
11. *Shi S., Zhang Z., Zhu Z., Zhang M.* // J. Med. Plant. Res. 2011. V. 5. № 6. P. 885–889.
12. *Milne G.L., Musiek E.S., Morrow J.D.* // Biomarkers. 2005. V. 10 Suppl. 1. S. 10–23.
13. *Milatovic D., Yin Z., Gupta R.C., Sidoryk M., Albrecht J., Aschner J.L., Aschner M.* // Toxicol. Sci. 2007. V. 98. № 1. P. 198–205.
14. *Loke W.M., Proudfoot J.M., McKinley A.J., Croft K.D.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 345. № 3. P. 1039–1043.
15. *Higuchi Y.* // Biochem. Pharmacol. 2003. V. 66. № 8. P. 1527–1535.
16. *Miller M.J., Angeles F.M., Reuter B.K., Bobrowski P., Sandoval M.* // BMC Complement. Altern. Med. 2011. V. 1. P. 11.
17. *Pierce G.B., Parchment R.E., Lewellyn A.L.* // Differentiation. 1991. V. 46. P. 181–186.
18. *Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F.* // Apoptosis. 2000. V. 5. № 5. P. 415–418.

19. *Watson W.H., Cai J., Jones D.P.* // *Annu. Rev. Nutr.* 2000. V. 20. P. 485–505.
20. *Willingham M.C.* // *J. Histochem. Cytochem.* 1999. V. 47. № 9. P. 1101–1109.
21. *Kook D., Wolf A.H., Yu A.L., Neubauer A.S., Priglinger S.G., Kampik A., Welge-Lüssen U.C.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. V. 49. № 4. P. 1712–1720.
22. *Gottlieb E., Armour S.M., Harris M.H., Thompson C.B.* // *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. P. 709–717.
23. *Cottet-Rousselle C., Ronot X., Lerverve X., Mayol J.F.* // *Cytometry A.* 2011. V. 79. № 6. P. 405–425.
24. *Chen X., Zhong Z., Xu Z., Chen L., Wang Y.* // *Pharmacol. Rep.* 2011. V. 63. № 3. P. 724–732.
25. *Haslam G., Wyatt D., Kitos P.A.* // *Cytotechnol.* 2000. V. 32. № 1. P. 63–75.
26. *Rubiolo J.A., Vega F.V.* // *Biomed. Pharmacother.* 2008. V. 62. № 9. P. 606–612.
27. *Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J.* // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. V. 17. P. 235–248.
28. *Naito Y., Lee M.C., Kato Y., Nagai R., Yonei Y.* // *Anti-Aging Med.* 2010. V. 7. № 5. P. 36–44.
29. *Buczynski A., Wachowicz B., Kedziorakornatowska K., Tkaczewski W., Kedziora J.* // *Atherosclerosis.* 1993. V. 100. P. 223–228.
30. *Mendis E., Rajapakse N., Kim S.-K.* // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. № 3. P. 581–587.
31. *Noeman S.A., Hamooda H.E., Baalash A.A.* // *Diabetol. Metab. Syndr.* 2011. V. 3. № 1. P. 17.
32. *Jung S.H., Kim B.J., Lee E.H., Osborne N.N.* // *Neurochem. Int.* 2010. V. 57. № 7. P. 713–721.
33. *Albina J.E., Cui S., Mateo R.B., Reichner J.S.* // *J. Immunol.* 1993. V. 150. № 11. P. 5080–5085.
34. *Egami F., Taniguchi S., Bergmeyer H.U.* *Methods of Enzymatic Analysis* / Ed. H.U. Bergmeyer. N.Y.: Acad. Press, 1974. 2260 p.
35. *Eguchi A., Murakami A., Ohigashi H.* // *Free Radic. Res.* 2005. V. 39 № 12. P. 1367–1375.
36. *Wright W.E., Shay J.W.* // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 7. P. 682–688.
37. *Long L.H., Clement M.V., Halliwell B.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 273. № 1. P. 50–53.
38. *Lotito S.B., Frei B.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 41. № 12. P. 1727–1746.
39. *Lao C.D., Ruffin M.T. 4th, Normolle D., Heath D.D., Murray S.I., Bailey J.M., Boggs M.E., Crowell J.* // *BMC Complement. Altern. Med.* 2006. V. 6. P. 10.
40. *Ireson C., Orr S., Jones D.J., Verschoyle R., Lim C.K., Luo J.L., Howells L., Plummer S.* // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 3. P. 1058–1064.
41. *Sharma R.A., Euden S.A., Platton S.L., Cooke D.N., Shafayat A., Hewitt H.R., Marczylo T.H., Morgan B.* // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. № 20. P. 6847–6854.
42. *Wichers H.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. № 1. P. 37–45.
43. *El-Gamal Y.M., Elmasry O.A., El-Ghoneimy D.H., Soliman I.M.* // *Egypt J. Pediatr. Allergy Immunol.* 2011. V. 9. № 1. P. 3–13.
44. *Rusu D., Drouin R., Pouliot Y., Gauthier S., Poubelle P.E.* // *J. Nutr.* 2009. V. 140. № 2. P. 382–391.
45. *Kyo E., Uda N., Kasuga S., Itakura Y.* // *J. Nutr.* 2001. V. 131. 1075S–9S.
46. *Friberg D., Bryant J., Shannon W., Whiteside T.L.* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994. V. 1. № 3. P. 261–268.
47. *Amano F., Noda T.* // *FEBS Lett.* 1995. V. 368. P. 425–428.
48. *Liu C.F., Tseng K.C., Chiang S.S., Lee B.H., Hsu W.H., Pan T.M.* // *J. Sci. Food Agric.* 2011. V. 91. № 12. P. 2284–2291.
49. *Dicks L.M., Botes M.* // *Benef. Microbes.* 2010. V. 1. № 1. P. 11–29.
50. *Maragkoudakisa P.A., Zoumpopoulou G., Miarisa C., Kalantzopoulou G., Potb B., Tsakalidou E.* // *Int. Dairy J.* 2006. V. 16. № 3. P. 189–199.
51. *Payne A.N., Zihler A., Chassard C., Lacroix C.* // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. № 1. P. 17–25.
52. *Kabir A.M., Aiba Y., Takagi A., Kamiya S., Miwa T., Koga Y.* // *Gut.* 1997. V. 41. № 1. P. 49–55.
53. *Lin W.H., Lin C.K., Sheu S.J., Hwang C.F., Ye W.T., Hwang W.Z., Tsen H.Y.* // *J. Food Sci.* 2009. V. 74. № 6. P. 225–230.
54. *Klingberg T.D., Pedersen M.H., Cencic A., Budde B.B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 11. P. 7528–7530.
55. *Matsumoto S., Hara T., Hori T., Mitsuyama K., Nagaoaka M., Tomiyasu N., Suzuki A., Sata M.* // *Clin. Exp. Immunol.* 2005. V. 140. № 3. P. 417–426.
56. *Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B.* // *Br. J. Nutr.* 2010. V. 104. Suppl. S2.
57. *Shoaf K., Mulvey G.L., Armstrong G.D., Hutkins R.W.* // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. № 12. P. 6920–6928.
58. *Zenhom M., Hyder A., de Vrese M., Heller K.J., Roeder T., Schrezenmeir J.* // *J. Nutr.* 2011. V. 141. № 5. P. 971–977.
59. *Sporn M.B., Suh N.* // *Carcinogenesis.* 2000. V. 21. № 3. P. 525–530.
60. *D'Agostini F., Izzotti A., Balansky R.M., Bencicelli C., De Flora S.* // *Mutat. Res.* 2005. V. 591. P. 173–186.
61. *Doll R., Peto R.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 1981. V. 66. P. 1191–1308.
62. *de Kok T.M., van Breda S.G., Manson M.M.* // *Eur. J. Nutr.* 2008. V. 47 Suppl. 2. P. 51–59.
63. *Surh Y.J.* // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. № 10. P. 768–780.
64. *Aziz M.H., Kumar R., Ahmad N.* // *Int. J. Oncol.* 2003. V. 23. № 1. P. 17–28.
65. *Goya L., Martin M.A., Ramos S., Mateos R., Bravo L.* // *Curr. Nutr. Food Sci.* 2009. V. 5. № 1. P. 56–64.
66. *Cai J., Wang M., Li B., Wang C., Chen Y., Zuo Z.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2009. V. 22. P. 1582–1587.

67. Duraj J., Zazrivcova K., Bodo J., Sulikova M., Sedlak J. // *Neoplasma*. 2005. V. 52. № 4. P. 273–279.
68. Wolter F., Akoglu B., Clausnitzer A., Stein J. // *J. Nutr.* 2001. V. 131. P. 2197–2203.
69. Schneider Y., Duranton B., Gosse F., Schleiffner R., Seiler N., Raul F. // *Nutr. Cancer*. 2001. V. 39. P. 102–107.
70. Haycock J.W. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 695. P. 1–15.
71. Sun T., Jackson S., Haycock J.W., MacNeil S. // *J. Biotechnol.* 2006. V. 122. № 3. P. 372–381.
72. Carletti E., Motta A., Migliaresi C. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 695. P. 17–39.
73. Frampton J.P., Hynd M.R., Shuler M.L., Shain W. // *Biomed. Mater.* 2011. V. 6. № 1. P. 1–16.
74. Tibbitt M.W., Anseth K.S. // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. V. 103. № 4. P. 655–663.
75. Langerholc T., Maragkoudakis P.A., Wollgast J., Gradisnik L., Cencik A. // *Trends Food Sci. Technol.* 2011. V. 22. Supl. 1. P. S11–S20.
76. Li L., Lu Y. // *J. Cancer*. 2011. V. 2. P. 458–66.
77. Barrila J., Radtke A.L., Crabbé A., Sarker S.F., Herbst-Kralovetz M.M., Ott C.M., Nickerson C.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. P. 791–801.
78. Leite S.B., Teixeira A.P., Miranda J.P., Tostões R.M., Clemente J.J., Sousa M.F., Carrondo M.J., Alves P.M. // *Toxicol. In Vitro*. 2011. V. 25. № 4. P. 825–832.
79. Hudson E.A., Fox L.H., Luckett J.C., Manson M.M. // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006. V. 21. № 2. P. 204–214.
80. Chu J.H., Yu S., Hayward S.W., Chan F.L. // *Prostate*. 2009. V. 69. № 4. P. 428–442.
81. Tarozzi A., Hrelia S., Angeloni C., Morroni F., Biagi P., Guardigli M., Cantelli-Forti G., Hrelia P. // *Eur. J. Nutr.* 2006. V. 45. № 3. P. 152–158.
82. Giovannelli L., Pitozzi V., Jacomelli M., Mulinacci N., Laurenzana A., Dolara P., Mocali A.J. // *Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2011. V. 66. № 1. P. 9–18.
83. Chu W.L., Lim Y.W., Radhakrishnan A.K., Lim P.E. // *BMC Complement. Altern. Med.* 2010. V. 10. P. 53.
84. Jie G., Lin Z., Zhang L., Lv H., He P., Zhao B. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. № 21. P. 8058–8064.
85. Farah I.O. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2005. V. 2. P. 411–419.
86. Liu Y.W., Shang H.F., Wang C.K., Hsu F.L., Hou W.C. // *Food Chem. Toxicol.* 2007. V. 45. № 11. P. 2312–2318.
87. Smiderle F.R., Ruthes A.C., van Arkel J., Chanput W., Iacomini M., Wichers H.J., Van Griensven L.J. // *BMC Complement. Altern. Med.* 2011. V. 11. P. 58.
88. Li E.W., Mine Y. // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. № 9. P. 2704–2708.
89. Fan Y.Z., Chang H., Yu Y., Liu J., Zhao L., Yang D.J., Wang R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1763. № 10. P. 1059–1066.
90. Blonska M., Bronikowska J., Pietsz G., Czuba Z.P., Scheller S., Krol W. // *J. Ethnopharmacol.* 2004. V. 91. № 1. P. 25–30.
91. Aherne S.A., O'Brien N.M. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2008. V. 52. № 6. P. 664–673.
92. Kandimalla E.R., Bhagat L., Li Y., Yu D., Wang D., Cong Y.P., Song S.S., Tang J.X. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 19. P. 6925–6930.
93. Timm M., Bartelt S., Hansen E.W. // *Cytokine*. 2008. V. 42. № 1. P. 113–120.
94. Maragkoudakisa P.A., Zoumpopoulou G., Miarisa C., Kalantzopoulou G., Potb B., Tsakalidou E. // *Int. Dairy J.* 2006. V. 16. № 3. P. 189–199.
95. Bomba A., Nemcová R., Kastel R., Herich R., Pataky J., Cízek M. // *Vet. Med. (Praha)*. 1996. V. 41. № 5. P. 155–158.
96. Gaudana S.B., Dhanani A.S., Bagchi T. // *Br. J. Nutr.* 2010. V. 103. № 11. P. 1620–1628.
97. Rokka S., Pihlanto A., Korhonen H., Joutsjoki V. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2006. V. 43. № 5. P. 508–513.
98. Hirano J., Yoshida T., Sugiyama T., Koide N., Mori I., Yokochi T. // *Microbiol. Immunol.* 2003. V. 47. № 6. P. 405–409.
99. Won T.J., Kim B., Oh E.S., Bang J.S., Lee Y.J., Yoo J.S., Yu H., Yoon J. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2011. V. 89. № 6. P. 429–434.
100. Vissers Y.M., Snel J., Zuurendonk P.F., Kleerebezem M., Wichers H.J., Savelkoul H.F. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011. V. 61. № 1. P. 28–40.
101. Matsumoto S., Hara T., Hori T., Mitsuyama K., Nagaoka M., Tomiyasu N., Suzuki A., Sata M. // *Clin. Exp. Immunol.* 2005. V. 140. № 3. P. 417–426.
102. Sabater-Molina M., Larqué E., Torrella F., Zamora S. // *J. Physiol. Biochem.* 2009. V. 65. № 3. P. 315–328.
103. Sangwan V., Tomar S.K., Singh R.R., Singh A.K., Ali B. // *J. Food. Sci.* 2011. V. 76. № 4. P. R103–11.
104. Smiricky-Tjardes M.R., Grieshop C.M., Flickinger E.A., Bauer L.L., Fahey G.C. Jr. // *J. Anim. Sci.* 2003. V. 81. № 10. P. 2535–2545.
105. Ketabi A., Dieleman L.A., Gänzle M.G. // *J. Appl. Microbiol.* 2011. V. 110. № 5. P. 1297–1306.
106. Ramnani P., Chitarrari R., Tuohy K., Grant J., Hotchkiss S., Philp K., Campbell R., Gill C., Rowland I. // *Anaerobe*. 2012. V. 18. № 1. P. 1–6.
107. Das S.K., Hashimoto T., Kanazawa K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1780. № 4. P. 743–749.
108. Waite K.A., Sinden M.R., Eng C. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 11. P. 1457–1463.
109. Janakiram N.B., Mohammed A., Zhang Y., Choi C.I., Woodward C., Collin P., Steele V.E., Rao C.V. // *Cancer. Prev. Res. (Phila)*. 2010. V. 3. № 1. P. 82–91.
110. Liu L.Z., Fang J., Zhou Q., Hu X., Shi X., Jiang B.H. // *Mol. Pharmacol.* 2005. V. 68. № 3. P. 635–643.

Analysis of Functional Properties of Biologically Active Substances Using Eukaryotic Cell Models (Review)

K. V. Lisitskaya, I. V. Nikolaev, A. A. Torkova, V. O. Popov, and O. V. Koroleva

Bakh Biochemistry Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: koroleva@inbi.ras.ru, lisksenia@mail.ru

Received March 19, 2012

Abstract—This work presents an analysis of current data on the investigation into the functional properties of biologically active substances in model systems based on cultivated human cells. The knowledge regarding the practical application of cell cultures for the analysis of functional properties of bioactive substances is summarized, including antioxidant, immunomodulating, pro- and prebiotics, and chemoprevention properties. The most promising directions in cell culture model development for the investigation of functional properties, including three-dimensional models, are discussed.