

УДК 576.535

С. В. ПИНЧУК, И. Б. ВАСИЛЕВИЧ, А. В. БУТЕНКО, З. Б. КВАЧЕВА,
академик И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ

РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА КВЕРЦЕТИНА В КУЛЬТУРАХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

Поступило 31.12.2014

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из жировой ткани (МСК ЖТ), способны делиться в условиях культуры с сохранением высокой пролиферативной активности и способности к дифференцировке в разные типы клеток. Это позволяет использовать их в регенеративной медицине в качестве основы для создания трансплантатов при терапии широкого круга патологий сердечно-сосудистой системы, центральной нервной системы, печени, восстановлении костно-хрящевых структур, кожного покрова и др. [1; 2]. Эффективность клеточной терапии с использованием МСК ЖТ в значительной степени определяется устойчивостью клеток к окислительному стрессу, испытываемому ими при попадании в зоны повреждения вследствие протекания там воспалительных процессов. Для повышения качества трансплантатов в настоящее время разрабатываются протоколы культивирования МСК, обеспечивающие повышение устойчивости клеток к окислительному стрессу. С этой целью, в частности, используют культивирование МСК в присутствии антиоксидантов, увеличивающих потенциал клеток по сдерживанию окислительных повреждений их компонентов при взаимодействии с активными формами кислорода (АФК) [3].

В последние годы внимание исследователей привлекают флавоноиды как активные антиоксиданты природного происхождения [4]. В настоящей работе использовался кверцетин как добавка в питательную среду для выращивания МСК.

Кверцетин – природный флавоноид, обладающий выраженной антиоксидантной активностью. Данный полифенол способен инактивировать АФК и свободные радикалы, а также хелатировать металлы переменной валентности (медь, железо), катализирующие свободнорадикальные процессы в биологических системах [4]. На моделях *in vitro* кверцетин эффективно защищает различные типы клеток от окислительного стресса: снижает повреждение белков и липидов мембран, поддерживает функциональное состояние компонентов антиоксидантной системы (восстановленный глутатион (Г-SH), супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГПp)), снижает стресс-индуцированную гибель клеток [5–7]. Вместе с тем механизмы влияния кверцетина на клетки до конца не изучены. Так, проявление антиоксидантных свойств кверцетина в значительной степени определяется эффективностью функционирования в клетках глутатион-зависимого компонента антиоксидантной системы, включающей восстановленный глутатион и такой фермент, как глутатионпероксидаза [6; 7]. Имеются сообщения о прооксидантном и токсическом действии полифенола на клетки. Предполагается, что при определенных условиях в клетках возможна генерация АФК в результате аутоокисления кверцетина [4; 8]. Вследствие способности вступать во взаимодействие с восстановленным глутатионом и тиолами белков, продукты окисления флавоноида обладают цитотоксичностью, при этом токсичность продуктов окисления различается для кверцетина и его клеточных метаболитов [9].

На культуре серотонинергических нейрональных клеток линии SH-SY5Y показано, что кверцетин достаточно быстро проникает в клетки и накапливается в органеллах (в митохондриях он обнаруживается уже через 15 мин после добавления в среду и через 2 ч достигается его макси-

мальная концентрация), однако быстро элиминируется и через 24 ч в клетках не регистрируется. Элиминация сильно тормозится в присутствии восстановителей (аскорбиновая кислота), приводя к накоплению кверцетина и продуктов его метаболизма в клетках, указывая на то, что основным механизмом этого процесса является окисление фенола [10]. Важным свойством, обнаруженным у кверцетина, является также его способность снижать пролиферацию клеток и индуцировать апоптоз в злокачественно трансформированных клетках [11]. Все это свидетельствует о том, что результат влияния кверцетина на клетки зависит от типа и функционального состояния самих клеток, условий культивирования, концентрации полифенола и длительности инкубации с ним. Можно полагать, что использование антиоксидантов при культивировании МСК должно способствовать сохранению клетками их основных свойств – высокой пролиферативной активности и способности к дифференцировке. Вместе с тем сведений по влиянию кверцетина на функциональное состояние МСК ЖТ в настоящее время недостаточно для полноценной оценки возможности применения данного полифенола при их культивировании.

Цель работы – изучение устойчивости к окислительному стрессу, пролиферативной активности, стабильности иммунофенотипа и способности к дифференцировке в адипогенном направлении МСК ЖТ крыс в разные сроки после инкубации клеток в присутствии кверцетина в широком диапазоне его концентраций.

Материалы и методы исследования. Работа проведена на МСК из ЖТ крысы. Для выделения МСК была проведена ферментативная обработка гомогената жировой ткани 0,25 %-ным раствором коллагеназы в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), рН 7,2 при 37 °С в течение 30 мин. Полученную клеточную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (диаметр пор – 100 мкм), центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. После удаления супернатанта осадок заливали полной ростовой средой ДМЕМ (среда Игла модифицированная по способу Дульбекко), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 0,01 мл базового раствора комплексного антибиотика-антимикотика. Затем клетки высевали в количестве $8 \cdot 10^4$ кл/мл в культуральные флаконы (Sarstedt, Германия), культивировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере при постоянном давлении 5 % CO₂. Полную смену ростовой среды проводили каждые 72 ч. При достижении 70–80 % конfluenceности монослоя клетки переводили в суспензию, обрабатывали их раствором трипсина (0,25 %) и ЭДТА (0,02 %) (Gibco, США) и рассевали в соотношении 1 : 3 на следующий пассаж. Клетки 2 пассажа растили в полной ростовой среде в течение 5 сут. при посевной плотности 4 тысячи клеток на 1 см² поверхности культурального флакона, после этого отбирали в эксперимент.

Кверцетин растворяли в смеси ДМСО/этанол в соотношении 2 : 1 до концентрации 70 мМ. В экспериментах использовали свежеприготовленный раствор. Полифенол добавляли в ростовую среду через сутки после посева. Через 48 ч ростовую среду меняли на свежую с добавлением кверцетина и продолжали культивирование в течение 48 ч. Общая продолжительность культивирования с полифенолом составила 4 сут.

Пролиферативную активность клеток характеризовали по индексу пролиферации, равному отношению количества клеток в среде после 5 сут. культивирования к количеству клеток при посеве.

Жизнеспособность МСК определяли на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием красителей пропидиум иодида и флуоресцеин диацетата [3]. При этом оценивалась доля живых и погибших клеток по механизмам некроза и апоптоза. Для определения фенотипа МСК клетки в количестве $1 \cdot 10^5$ ресуспендировали в 100 мкл ФСБ, вносили в суспензию меченые флуорофорами антитела к антигенам CD29 (FITC, флуоресцеинизоцианат), CD44 (FITC), CD90 (PE, фикоэритрин), в разведениях согласно инструкциям фирм-производителей (CD29, CD44 – Thermo Scientific, CD90 – RD Systems). Образцы инкубировали в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре, отмывали центрифугированием 2 раза ФСБ (1500 об/мин × 10 мин), ресуспендировали в 300 мкл ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре. Для каждого антигена анализу подвергалось не менее 10000 клеток.

Для определения внутриклеточного содержания H₂O₂ в МСК использовали флуоресцентный зонд CM-H₂DCFDA [3]. В суспензию МСК вносили 8 мкМ CM-H₂DCFDA, инкубировали в тем-

ноте в течение 15 мин при 37 °С и отмывали клетки 2 раза от несвязавшегося зонда в ФСБ (1500 об/мин, 10 мин). За это время молекула CM-H₂DCFDA гидролизовалась внутриклеточными эстеразами до не проникающего через плазматическую мембрану полярного соединения CM-H₂DCF, которое после взаимодействия с H₂O₂ приобретает способность к флуоресценции с максимумом при λ = 530 нм (возбуждение – λ = 488 нм). Интенсивность флуоресценции нагруженных зондом МСК измеряли на проточном цитофлуориметре. Для анализа выбирали *g₀* жизнеспособных клеток, отрицательных по PI. Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции анализировали с помощью программного обеспечения DIVA-6,1 (Becton Dickinson, США).

Содержание небелковых SH-групп, представленных в основном восстановленным глутатионом, оценивали с использованием реактива Элмана, принимая коэффициент молярной экстинкции окрашенного продукта при λ = 412 нм как $1,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность супероксиддисмутазы определяли по степени торможения реакции окисления кверцетина [12], активность глутатионпероксидазы определяли по методу Моина [13].

Окислительный стресс индуцировали добавлением в суспензию МСК в питательной среде гидроперекиси трет-бутила (ТБГП) в концентрации 150 мкМ и последующим инкубированием клеток в темноте при 37 °С в течение 90 мин [14].

Результаты и их обсуждение. Полученные нами ранее данные свидетельствуют, что ТБГП в концентрации 150 мкМ эффективно индуцирует развитие окислительного стресса в суспензиях МСК, что проявляется в повреждении клеточных белков, развитии ПОЛ мембран, увеличении количества апоптотических и некротических клеток, снижении количества жизнеспособных [3; 14]. Большое количество жизнеспособных МСК ЖТ после культивирования с кверцетином указывает на увеличение устойчивости клеток к окислительному стрессу, индуцированному экзогенной перекисью. Как видно на рис. 1 выраженное защитное действие полифенола проявляется при концентрациях 100 нМ – 100 мкМ: подавление жизнеспособности клеток под влиянием окислительного стресса значительно уменьшается по сравнению с контролем (без кверцетина). При концентрации кверцетина 10 нМ эффективность защиты незначительна. В то же время при добавлении кверцетина в суспензии контрольных МСК ЖТ непосредственно (за 15 мин) перед индукцией окислительного стресса защитное действие полифенола проявляется при концентрациях 10–100 мкМ, тогда как в присутствии 10 нМ – 1 мкМ полифенола эффект практически отсутствует (рис. 1, В). Такая разница влияния времени контакта клеток с кверцетином на их устойчивость к окислительному стрессу указывает на то, что в период культивирования МСК с полифенолом изменяется функциональное состояние клеток и, прежде всего, связанное с активностью системы антиоксидантной защиты. Так, установлен рост активности фермента ГПр

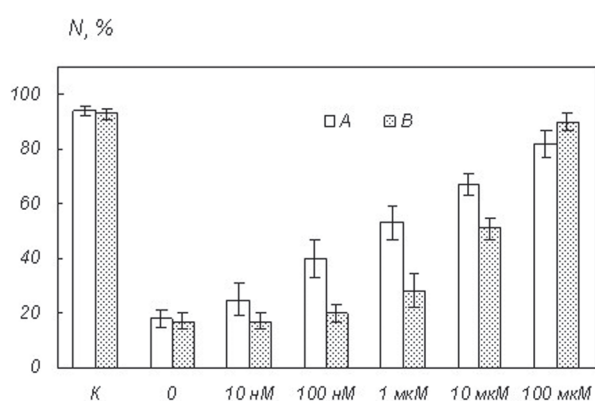


Рис. 1. Влияние кверцетина на жизнеспособность МСК ЖТ, подвергнутых окислительному стрессу. Время культивирования в присутствии кверцетина: А – 4 сут., В – 15 мин. Окислительный стресс индуцировали в клетках добавлением ТБГП (150 мкМ, 90 мин). N – количество жизнеспособных клеток. К – контроль (инкубация клеток без ТБГП)

и значительное увеличение внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона в МСК, культивированных в присутствии кверцетина (табл. 1) при его концентрациях 100 нМ – 100 мкМ. Активность СОД в МСК при этом соответствовала контролю.

Изучение экспансии МСК в присутствии кверцетина показало, что в зависимости от концентрации в среде роста данный полифенол оказывает разнонаправленное действие на пролиферативную активность клеток. Так, при концентрации 10–100 нМ наблюдается увеличение количества клеток в культуре после культивирования в течение 4 сут. В присутствии 10 мкМ полифенола пролиферативная активность МСК значительно снижается, а 100 мкМ – клетки не пролиферируют (рис. 2). Количество апоптотических и некротических клеток в культурах

Т а б л и ц а 1. Влияние кверцетина (10 нМ – 100 мкМ, 4 сут.) в среде культивирования МСК ЖТ крысы на внутриклеточное содержание восстановленного глутатиона (Г-SH), супероксиддисмутазную (СОД), глутатионпероксидазную (ГПр) активность и маркерную активность клеток: CD29, CD44, CD90

Показатель	Контроль	Кверцетин 10 нМ	Кверцетин 100 нМ	Кверцетин 1 мкМ	Кверцетин 10 мкМ	Кверцетин 100 мкМ
Г-SH, нмоль/мг белка	31,5 ± 2,2	33,7 ± 2,5	38,4 ± 3,1	41,7 ± 3,0	45,2 ± 3,5	44,4 ± 3,2
СОД, ед/мг белка	1,55 ± 0,12	1,57 ± 0,14	1,59 ± 0,11	1,56 ± 0,15	1,58 ± 0,16	1,54 ± 0,17
ГПр, мкмоль/(мин·мг белка)	0,36 ± 0,06	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,06	0,42 ± 0,05	0,40 ± 0,05
I _{фл} CD29, отн. ед.	1,0	1,02 ± 0,03	0,99 ± 0,04	1,01 ± 0,03	0,99 ± 0,04	0,85 ± 0,10
I _{фл} CD44, отн. ед.	1,0	1,01 ± 0,04	1,02 ± 0,02	1,04 ± 0,03	1,10 ± 0,04	1,41 ± 0,20
I _{фл} CD90, отн. ед.	1,0	1,01 ± 0,03	0,98 ± 0,03	1,02 ± 0,04	0,97 ± 0,04	0,80 ± 0,15

МСК после культивирования в присутствии полифенола во всем диапазоне концентраций практически соответствовало контролю, т. е. кверцетин не проявлял токсического действия на клетки даже в дозах, приводящих к значительному снижению их пролиферации (рис. 3).

Учитывая антиоксидантные свойства кверцетина и тот факт, что АФК способны оказывать стимулирующее действие на деление клеток, снижение пролиферативной активности МСК при высоких концентрациях полифенола, возможно, связано со значительным снижением внутриклеточной концентрации АФК, участвующих во внутриклеточной сигнализации. Для оценки внутриклеточного содержания АФК в МСК ЖТ после культивирования с полифенолом было проведено измерение интенсивности флуоресценции зонда CM-H₂DCF-DA, обладающего свойством увеличения квантового выхода флуоресценции после окисления, которое контролируется АФК (в основном H₂O₂). Оказалось, что при всех концентрациях кверцетина в среде роста (10 нМ – 100 мкМ) зонд в клетках не окислялся, тогда как в контроле регистрировалось увеличение интенсивности флуоресценции зонда (в 1,25 раза), т. е. его окисление. Эти данные свидетельствуют об очень низкой концентрации АФК в МСК ЖТ после культивирования с кверцетином как при микромолярных концентрациях, приводящих к торможению деления клеток, так и при наномолярных концентрациях, когда МСК активно пролиферируют. Представленные результаты указывают на то, что снижение пролиферации МСК в присутствии микромолярных концентраций кверцетина, вероятно, обусловлено существованием и других механизмов действия полифенола на клетки. В пользу этого свидетельствуют данные определения уровня экспрессии поверхностных маркеров МСК CD29, CD44 и CD90 после культивирования с кверцетином. Данные белки стойко экспрессируются в мультипотентных МСК и участвуют в реализации таких процессов, как межклеточные контакты, адгезия и миграция клеток.

Как видно из данных табл. 1 при концентрациях кверцетина (10 мкМ – 100 мкМ), приводящих к снижению пролиферации клеток, наблюдается изменение профиля иммунофенотипа кле-

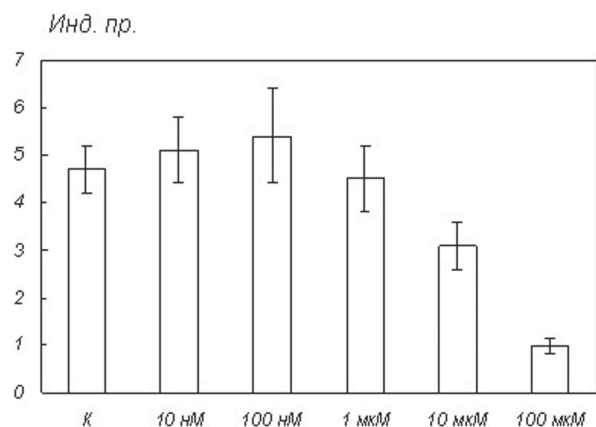


Рис. 2. Индекс пролиферации МСК ЖТ, культивированных в течение 4 сут. в присутствии кверцетина. К – контроль

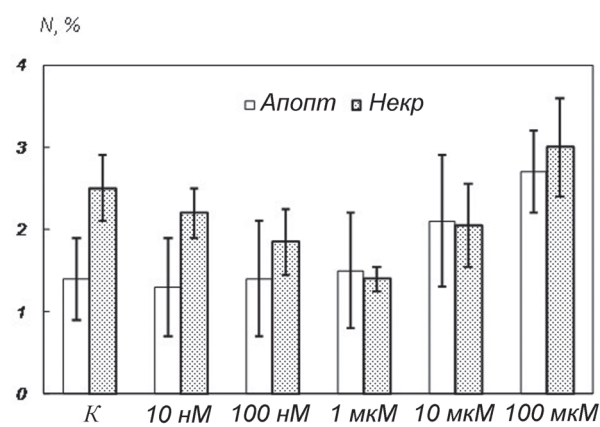


Рис. 3. Количество (N) апоптотических и некротических клеток в культурах МСК ЖТ, культивированных в течение 4 сут. в присутствии кверцетина. К – контроль

ток: снижается экспрессия CD29 и CD90 и увеличивается экспрессия CD44. При концентрациях кверцетина, при которых наблюдается активная пролиферация МСК (10 нМ – 1 мкМ), иммунофенотип клеток не изменяется. Изменение профиля иммунофенотипа МСК при микромолярных концентрациях кверцетина указывает на возможную модуляцию полифенолом процесса дифференцировки в МСК. Мы исследовали влияние кверцетина на адипогенную дифференцировку и иммунофенотип МСК ЖТ под действием дексаметазона. Культивирование МСК ЖТ в течение 21 сут. в присутствии 1 мкМ дексаметазона приводит к появлению в культуре клеток, содержащих внутри шарообразные жировые включения, которые специфически окрашиваются красителем масляным красным. О дифференцировке МСК свидетельствуют также данные об изменении профиля иммунофенотипа клеток уже в ранние сроки (6 сут.) культивирования в присутствии дифференцирующего агента.

Как видно из данных табл. 2 в МСК регистрируется значительное снижение экспрессии белка CD44 (в 3 раза) и увеличение экспрессии CD29 (в 1,9 раза). Присутствие кверцетина в дифференцировочной среде не влияло на изменение уровня экспрессии CD29, но увеличивало снижение экспрессии белка CD44, что подтверждает модулирующее влияние полифенола на коммитирование клеток. Окрашивание МСК ЖТ после дифференцировки в адипоцитарном направлении масляным красным с последующей экстракцией красителя 70 %-ным раствором этанола и фотометрированием при 504 нм показало, что кверцетин в концентрациях 1–100 мкМ подавляет адипогенную дифференцировку клеток: оптическая плотность раствора снижалась в 5–10 раз по сравнению с дифференцировкой в среде, содержащей только дексаметазон. Следует отметить, что дексаметазон является компонентом ростовых сред для коммитирования МСК не только в адипогенном направлении, но и совместно с другими добавками в остеогенном, хондрогенном, гепатогенном направлениях. Так, имеются данные о стимулирующем действии кверцетина на остеогенную дифференцировку МСК [15]. Возможно, обнаруженное нами снижение адипогенной дифференцировки МСК ЖТ в присутствии кверцетина является следствием стимулирования дифференцировки клеток в сторону остеогенеза.

Т а б л и ц а 2. Влияние дексаметазона (1 мкМ) и кверцетина (10 нМ – 100 мкМ, 6 суток) в среде культивирования МСК ЖТ крысы на маркерную активность клеток: CD29, CD44, CD90

Показатель	К	К + Дексаметазон	Декс + 10 нМ	Декс + 100 нМ	Декс + 1 мкМ	Декс + 10 мкМ	Декс + 100 мкМ
I _{фл} CD29	1,0	1,90 ± 0,07	1,85 ± 0,08	1,84 ± 0,05	1,91 ± 0,08	1,93 ± 0,07	1,88 ± 0,10
I _{фл} CD44	1,0	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02
I _{фл} CD90	1,0	1,01 ± 0,03	1,01 ± 0,04	0,98 ± 0,03	1,02 ± 0,04	0,97 ± 0,05	0,95 ± 0,05

Заключение. Таким образом, культивирование МСК ЖТ в присутствии 100 нМ – 100 мкМ кверцетина увеличивает активность системы антиоксидантной защиты и устойчивость клеток к окислительному стрессу, снижает внутриклеточное содержание АФК (перекись водорода) и ингибирует дифференцировку клеток в адипогенном направлении. В концентрациях 10–100 нМ полифенол оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность МСК ЖТ и не влияет на иммунофенотип клеток, при концентрациях 10–100 мкМ наблюдается снижение пролиферативной активности и изменение экспрессии маркеров мультипотентных МСК CD29, CD44 и CD90. Полученные результаты позволяют заключить, что для оптимизации культивирования МСК и накопления биомассы мультипотентных клеток с высокими функциональными характеристиками использование кверцетина в концентрациях 100 нМ – 1 мкМ оправдано. При использовании кверцетина в концентрациях более 10 мкМ можно ожидать модуляции полифенолом дифференцировки МСК.

Литература

1. Konno M., Hamabe A., Hasegawa S. et al. // Dev. Growth Differ. 2013. Vol. 55, N 3. P. 309–318.
2. Баранов Е. В., Третьяк С. И., Василевич И. Б. и др. // Клеточ. транспл. ткан. инж. 2013. Т. VIII, № 2. С. 78–83.
3. Василевич И. Б., Пинчук С. В., Лобанок Е. С., Волотовский И. Д. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2014. № 2. С. 82–88.

4. Костюк В. А., Потапович А. И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск, 2004. – 179 с.
5. Wang L., Lin S. Q., He Y. L. et al. // Biomed. Environ. Sci. 2013. Vol. 26, N 4. P. 258–267.
6. Nagata H., Takekoshi S., Takagi T. et al. // Tokai J. Exp. Clin. Med. 1999. Vol. 24, N 1. P. 1–11.
7. Rosenblat M., Volkova N., Khatib S. et al. // Free Radic. Res. 2014. Vol. 48, N 12. P. 1462–1472.
8. Yen G. C., Duh P. D., Tsai H. L., Huang S. L. // Biosci. Biotech. Biochem. 2003. Vol. 67, N 6. P. 1215–1222.
9. Moalin M., van Strijdonck G. P., Bast A., Haenen G. R. // J. Agric Food Chem. 2012. Vol. 60, N 36. P. 9292–9297.
10. Bandaruk Y., Mukai R., Terao J. // Toxicology Reports. 2014. Vol. 1. P. 639–649.
11. Duo J., Ying G. G., Wang G. W., Zhang L. // Mol. Med. Rep. 2012. Vol. 5, N 6. P. 1453–1456.
12. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. // Вопр. мед. хим. 1990. Т. 36, № 2. С. 88–91.
13. Моин В. М. // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 725–728.
14. Пинчук С. В., Лобанок Е. С., Волотовский И. Д. // Докл. НАН Беларуси. 2013. Т. 57, № 2. С. 79–83.
15. Zhou C., Lin Y. // Cell Proliferation. 2014. Vol. 47, N 2. P. 124–132.

S. V. PINCHUK, I. B. VASILEVICH, A. V. BUTENKO, Z. B. KVACHEVA, I. D. VOLOTOVSKY

pinchuksv@mail.ru

REGULATORY PROPERTIES OF QUERCETIN IN THE CULTURES OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Summary

The resistance to the oxidative stress, the proliferative activity, the immunophenotype stability, and the ability to differentiate in the adipogenic direction of MSCs from adipose tissue of rats after the incubation of cells in the presence of quercetin has been investigated. The cultivation of MSCs in the presence of 100 nM – 100 mM quercetin enhances the antioxidant defense system activity and the resistance of cells to the oxidative stress, decreases the intracellular ROS content (hydrogen peroxide), and inhibits the adipogenic differentiation of cells. At concentrations of 10–100 nM, polyphenol has a stimulating effect on the proliferative activity of MSCs and does not affect the immunophenotype of cells. At concentrations of 10–100 mM, quercetin decreases the proliferative activity of the cells and changes the expression of markers of multipotent MSCs CD29, CD44, and CD90.