

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ В ГЕПАТОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

© С. В. Пинчук,¹ И. Б. Василевич, З. Б. Квачева, И. Д. Волотовский

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, 220072;

¹электронный адрес: *pinchuksv@mail.ru*

Показана дифференцировка мезенхимных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани человека в гепатоцитарном направлении под влиянием ростовых факторов. Дифференцировку МСК индуцировали культивированием клеток в присутствии фактора роста фибробластов 4, фактора роста гепатоцитов, онкостатина М и дексаметазона. Изучено влияние кверцетина на гепатоцитарную дифференцировку МСК. Показано, что добавление в индукционную среду кверцетина в концентрации 1 или 10 мкмоль/л усиливает проявление таких признаков гепатоцитарной дифференцировки МСК, как секреция мочевины, синтез клетками цитокератина 19 и α -фетопротейна. Показано также модулирующее влияние кверцетина на активность цитохрома P450 подсемейства CYP1A в дифференцированных клетках. МСК, дифференцированные в гепатоцитарном направлении в присутствии кверцетина, характеризуются более высокой жизнеспособностью и устойчивостью к окислительному стрессу.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, кверцетин, гепатоцитарная дифференцировка.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, ЖК — жировая ткань, ТБГП — гидроперекись трет-бутила, α -ФП — α -фетопротейн, ЦК19 — цитокератин 19.

Заболевания печени (гепатопатии) различной этиологии широко распространены и являются одной из причин инвалидизации и смертности населения. Существующие методы лечения хронических форм заболеваний печени не всегда эффективны, несут симптоматический характер и не в состоянии предотвратить последующие осложнения в виде развития цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы. В результате единственным способом спасти жизни пациентов остается проведение дорогостоящей операции по трансплантации печени, которая в свою очередь ограничена нехваткой донорских органов и трудностями подбора донора с близким иммуностаусом.

Развитие повреждений в печени, как правило, индуцирует запуск в органе регенерационных процессов, направленных на обеспечение функциональной активности существующего пула гепатоцитов, а также миграцию в зоны повреждения, пролиферацию и последующую дифференцировку в гепатоцитарном направлении собственных прогениторных стволовых клеток (овальных клеток) (Людуп и др., 2010). В связи с этим особый интерес представляет изучение возможности повышения потенциала регенерации печени с помощью клеточных технологий на основе мезенхимных стволовых клеток (МСК), выделенных из жировой ткани или костного мозга.

МСК жировой ткани (ЖТ) способны активно пролиферировать в культуре и дифференцироваться в разные типы специализированных клеток, что позволяет рассматривать их в качестве ресурса при создании клеточных продуктов для терапии широкого круга патологий

(Баранов и др., 2013; Konno et al., 2013). В отношении терапии гепатопатий интерес к использованию МСК вырос, после того как была показана возможность их дифференцировки в гепатоцитарном направлении в культуре под влиянием комбинаций различных ростовых факторов. Показано, что МСК приобретают свойства гепатоцитов при культивировании в присутствии таких цитокинов, как фактор роста фибробластов 4 (FGF4), фактор роста гепатоцитов (HGF), онкостатин М и др. (Schwartz et al., 2002; Banas et al., 2007; Dong et al., 2010; Wu, Tao, 2012). В результате МСК приобретают полигональную форму эпителиальных клеток, иммунофенотип и функциональную активность, характерные для гепатоцитов. В культурах дифференцированных МСК увеличивается синтез мочевины, гликогена, альбумина, α -фетопротейна (α -ФП), возрастает экспрессия маркеров эпителиальных клеток цитокератина 18 (ЦК18) и цитокератина 19 (ЦК19), различных изоформ цитохрома P450 (Schwartz et al., 2002; Kang et al., 2005; Dong et al., 2010). Вместе с тем протоколы гепатоцитарной дифференцировки МСК до конца не отработаны и проблемы повышения ее эффективности остаются актуальными (Wu, Tao, 2012). Так, показана высокая эффективность дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении при действии на данные клетки в условиях культуры факторов, продуцируемых звездчатыми клетками печени (Гумерова и др., 2011).

Важно отметить, что в развитии гепатопатий независимо от их этиологии определяющую роль играют окислительные повреждения в гепатоцитах, что позволяет от-

носить данный вид заболеваний к классу «свободнорадикальных» патологий (Cichoż-Lach, Michalak, 2014). Образующиеся в избыточном количестве при протекании патологических процессов в гепатоцитах свободные радикалы нарушают структурно-функциональную целостность мембран, митохондрий и других надмолекулярных структур клеток, что приводит к их гибели и снижению функциональной активности печени. В связи с этим для терапии гепатопатий широкое применение получили препараты на основе полифенолов — природных соединений, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами (Dhiman, Chawla, 2005). Применение этих соединений при экспериментальных гепатопатиях заметно снижает повреждение печени и ускоряет восстановление функционирования органа (Yoshikawa et al., 2002; Molina et al., 2003; Tang et al., 2013). Вместе с тем механизмы влияния полифенолов на гепатоциты могут не исчерпываться только их антиоксидантными свойствами. Полученные нами и имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что полифенолы способны оказывать влияние на пролиферативную активность и дифференцировку некоторых типов стволовых клеток (Zhou, Lin, 2014; Пинчук и др., 2015). Влияние полифенолов на гепатоцитарную дифференцировку МСК и функционирование коммитированных клеток до настоящего времени не изучали. Можно ожидать, что эти соединения, нормализуя регенераторные процессы в печени, будут оказывать влияние и на дифференцировку стволовых клеток в гепатоциты.

В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение влияния кверцетина — природного полифенола, обладающего выраженной антиоксидантной активностью, на функциональное состояние МСК ЖТ и процесс их дифференцировки в гепатоцитарном направлении.

Материал и методика

Выделение МСК проводили согласно методике, описанной ранее (Баранов и др., 2013), из ЖТ, полученной хирургическим путем из области пупка. ЖТ иссекали ножницами, гомогенизировали в слабо притертом гомогенизаторе и обрабатывали 0.1 %-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) (HyClone, США), pH 7.2, при 37 °C в течение 30 мин. Полученную клеточную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (диаметр пор 100 мкм), центрифугировали при 370 g в течение 10 мин. После удаления супернатанта осадок заливали полной ростовой средой ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (среда Игла, модифицированная по способу Дюльбекко; Gibco, США) и содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 mM L-глутамина (Sigma, США), 1 % базового раствора комплексного антибиотика-антимикотика (Sigma, США). Затем клетки высевали в количестве $2 \cdot 10^5$ кл./см² в культуральные флаконы (Sarstedt, Германия) и культивировали в течение 24 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при 5 % CO₂. После этого среду с неадгезированными клетками удаляли и после промывки PBS меняли на свежую. Последующую смену ростовой среды проводили каждые 72 ч. При достижении 70—80 % конfluenceности монослоя клетки переводили в суспензию, обрабатывая их раствором трипсина (0.25 %) и ЭДТА

(0.02 %) (Gibco, США), и рассеивали в количестве $5 \cdot 10^3$ кл./см² на следующий пассаж.

Дифференцировку МСК в гепатоцитарном направлении проводили на культуре клеток 3-го пассажа после достижения конfluenceности монослоя 80 % в два этапа. На первом этапе клетки культивировали в течение 12 сут в полной ростовой среде в присутствии 10 нг/мл FGF4 (Gibco, США) и 20 нг/мл HGF (Gibco, США). Далее клетки культивировали в течение еще 12 сут в среде, содержащей 20 нг/мл HGF, 10 нг/мл онкостатина М (Gibco, США) и 1 мкмоль/л дексаметазона (Sigma, США).

Кверцетин (Sigma, США) растворяли в смеси ДМСО и этанола в соотношении 2:1 до концентрации 70 мкмоль/л. В экспериментах использовали свежеприготовленный раствор.

МСК делили на 4 экспериментальные группы. Группа 1: МСК культивировали в полной ростовой среде в течение 12 и 24 сут без добавления ростовых факторов. Группа 2: МСК культивировали в течение 12 и 24 сут в присутствии комбинаций ростовых факторов согласно приведенной выше схеме. Группа 3: МСК культивировали в течение 12 и 24 сут в присутствии комбинаций ростовых факторов и кверцетина в концентрации 1 мкмоль/л. Группа 4 отличается от группы 3 только концентрацией кверцетина — 10 мкмоль/л. Среду в каждой экспериментальной группе меняли каждые 72 ч, кверцетин добавляли вместе с ростовыми факторами при смене среды.

Жизнеспособность МСК определяли на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием красителей иодида пропидиума и диацетата флуоресцеина (Sigma, США) (Пинчук и др., 2015). При этом оценивали долю живых и погибших клеток по механизмам некроза и апоптоза. Анализ данных проточной цитофлуориметрии проводили с использованием программы FACSDiva 6.1 (Becton Dickinson).

Для определения иммунофенотипа МСК клетки 3-го пассажа в количестве $1 \cdot 10^5$ ресуспендировали в 100 мкл PBS, вносили в суспензию связанные с флуорофорами антитела против антигенов CD13, CD34 (флуорофор PE-Cy7 — фикоэритрин-Cy7), CD44 (флуорофор APC — алофикоцианин), CD73, CD90, CD105 (FITC — флуоресцеинизотиоцианат) и CD45 (APC-Cy7 — алофикоцианин-Cy7) в разведениях согласно инструкции фирмы-производителя (Becton Dickinson, США). Клетки инкубировали в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре, промывали 2 раза в PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре. В качестве контроля использовали МСК, не инкубированные с антителами.

Содержание в клетках ЦК19 и α -ФП оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфических к белкам антител, меченных флуорохромами (ЦК19-FITC, RD Systems, США; α -ФП-PE, Abcam, США). Клетки фиксировали в растворе 4 %-ного параформальдегида в течение 15 мин, антитела добавляли в суспензию МСК в 2 %-ном растворе сапонина и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин. В качестве контроля использовали МСК, инкубированные с меченными флуорохромами неспецифическими иммуноглобулинами того же изотипа (изотипический контроль).

Концентрацию мочевины в ростовой среде определяли диацетилмонооксидным методом согласно инструкции фирмы-производителя (НТПК Анализ Х, Беларусь) с некоторыми изменениями. Ростovou среду предвари-

тельно депротенизировали 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Для определения концентрации мочевины измеряли увеличение оптической плотности исследуемых образцов при 540 нм по отношению к контролю (ростовой среде, инкубированной без МСК). Концентрацию мочевины рассчитывали относительно увеличения оптической плотности контрольной ростовой среды, содержащей 100 мкмоль/л мочевины.

Моноксигеназную активность цитохрома P450 семейства CYP1A в МСК характеризовали по скорости о-деалкилирования 7-этоксирезорифина с образованием резорифина согласно описанному методу (Behnia et al., 2000). Монослой клеток промывали PBS, затем добавляли раствор Хэнкса, содержащий 5 мкмоль/л 7-этоксирезорифина (Sigma, США), 50 мкмоль/л дикумарола (Sigma, США), и инкубировали 60 мин при 37 °С. Далее среду отбирали и измеряли интенсивность ее флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны 560 нм и регистрации при 590 нм. Концентрацию резорифина в среде определяли по калибровочной кривой, полученной флуориметрированием раствора резорифина (Sigma, США) в диапазоне концентраций 2—20 нмоль/л в среде Хэнкса. За 1 сут до измерения моноксигеназной активности клеток в среду культивирования добавляли индуктор CYP1A бензо(а)пирен (Sigma, США) в концентрации 1 мкмоль/л.

Окислительный стресс в МСК индуцировали добавлением к суспензии клеток в среде ДМЕМ (без сыворотки и антибиотиков) гидроперекиси трет-бутила (ТБГП) в концентрации 150 мкмоль/л и последующим инкубированием образцов в термостате при 37 °С в течение 60 мин (Пинчук и др., 2015).

Результаты и обсуждение

Культивирование клеток, выделенных из ЖТ трех доноров, во всех случаях приводило к формированию монослойных культур, состоящих из клеток фибробластоподобной формы. Результаты иммунофенотипического контроля клеточной культуры 3-го пассажа, приведенные на рис. 1, свидетельствуют о наличии на поверхности клеток таких характерных для МСК маркеров, как CD13, CD44, CD73, CD90 и CD105 (Тепляшин и др., 2005; Kern et al., 2006). Доля клеток, положительно окрашенных антителами против CD13, составляла 99.5—100 %, CD44-клеток — 99.7—100, CD73-клеток — 98.8—99.4, CD90-клеток — 99.2—100 и CD105-клеток — 89.8—92.5 %. Наличие маркеров гемопоэтических клеток было незначительным (рис. 1): доля CD45-позитивных клеток составляла 0.8—1.9, CD34-клеток — 1.2—2.7 %. Эти результаты указывают на то, что используемая методика культивирования клеток из ЖТ в течение трех пассажей приводит к формированию культуры, состоящей из МСК.

Для характеристики эффективности гепатоцитарной дифференцировки МСК сравнивали концентрацию мочевины в ростовой среде, наличие в клетках белков ЦК19 и α -ФП, активность CYP1A в экспериментальных группах 1 (культивирование без факторов) и 2 (культивирование в присутствии FGF4, HGF, онкостатина М и дексаметазона). В МСК группы 1 концентрация мочевины в ростовой среде после культивирования в течение 12 или 24 сут составляет 17 мкмоль/л без динамики этого показателя во времени. В среде МСК, культивированных в индукционных средах (группа 2), концентрация мочевины возрастает через 12 сут культивирования до 42 мкмоль/л,

а после культивирования в течение 24 сут — до 130.0 мкмоль/л (рис. 2).

Как видно из результатов, представленных на рис. 3 и 4, в МСК 1-й группы содержание ЦК19 и α -ФП находится на низком уровне в течение всего периода культивирования. Анализ результатов показал, что в этой группе доля ЦК19-позитивных клеток составляет 0.4 и 1.2, α -ФП-позитивных — 3.7 и 4.5 % через 12 и 24 сут культивирования соответственно (табл. 1). В МСК, культивированных в индукционных средах, содержание исследуемых белков увеличивается (рис. 3, 4). Через 12 и 24 сут культивирования доля ЦК19-позитивных клеток составляет уже 1.5 и 6.5, а α -ФП-позитивных — 9.0 и 32.2 % соответственно (табл. 1).

Одной из основных функций гепатоцитов печени является биотрансформация различных соединений в реакциях моноксигеназного окисления с участием цитохрома P450. В клетках цитохром P450 представлен в виде суперсемейства изоформ, отличающихся субстратной специфичностью. Цитохром P450 подсемейства CYP1A играет ключевую роль в биотрансформации галогенированных и полициклических ароматических углеводородов и структурно сходных соединений. 7-этоксирезорифин является субстратом для CYP1A. Определение активности CYP1A на основе реакции о-деалкилирования 7-этоксирезорифина (ЭРОД-реакция) широко применяется для изучения функционирования моноксигеназных систем различных клеток (Behnia et al., 2000). Полученные нами результаты свидетельствуют об увеличении моноксигеназной активности в МСК после культивирования в присутствии факторов гепатоцитарной дифференцировки. Как видно на рис. 5, скорость ЭРОД-реакции в МСК 1-й группы составляет 0.20—0.25 пмоль/(мин · 10⁶ кл.) в течение всего периода культивирования. После культивирования в индукционных средах в течение 12 и 24 сут скорость возрастает до 0.7 и 1.4 пмоль/(мин · 10⁶ кл.) соответственно.

Таким образом, после культивирования МСК в течение 12 и 24 сут в ростовой среде без добавления ростовых факторов синтез клетками мочевины, экспрессия α -ФП и моноксигеназная активность не изменяются. На основании этих данных можно сделать вывод об отсутствии признаков гепатоцитарной дифференцировки МСК при культивировании клеток без факторов. Некоторое увеличение экспрессии ЦК19 может быть связано со спонтанной дифференцировкой части МСК в эпителиальном направлении при длительном культивировании, которая не связана с гепатоцитарной (Гумерова и др., 2011). Увеличение синтеза клетками мочевины, содержания белков ЦК19 и α -ФП, моноксигеназной активности после культивирования МСК в индукционных средах свидетельствует о приобретении клетками функциональных признаков гепатоцитов и о их коммитировании в гепатоцитарном направлении.

Присутствие в индукционных средах кверцетина оказывает влияние на гепатоцитарную дифференцировку МСК. Проведенные нами ранее исследования (Пинчук и др., 2015) позволили выявить следующие закономерности влияния кверцетина на МСК в отсутствие ростовых факторов. При культивировании клеток в ростовой среде в присутствии кверцетина в концентрациях 0.1, 1, 10 и 100 мкмоль/л наблюдается увеличение внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы и устойчивости клеток к окислительному стрессу, при этом влияние кверцетина на пере-

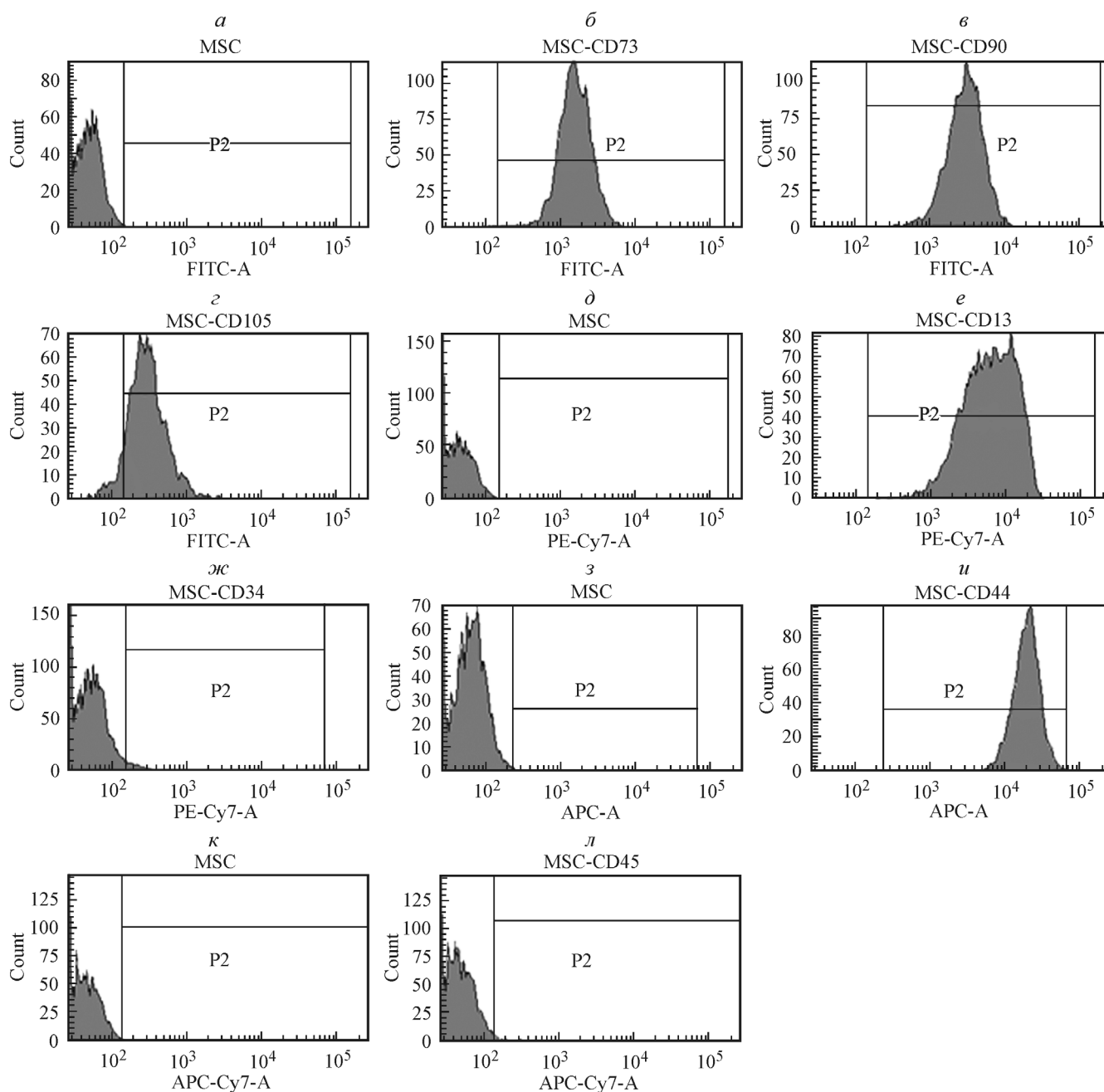


Рис. 1. Гистограммы распределения по интенсивности флуоресценции МСК 3-го пассажа до (а, д, з, к) и после инкубации с анти-телами против CD73 (б), CD90 (в), CD105 (г), CD13 (е), CD34 (ж), CD44 (и), CD45 (л). Проточная цитометрия.

По вертикали — число событий; по горизонтали — интенсивность флуоресценции указанного флуорохрома, связанного с соответствующими анти-телами, отн. ед.

численные эффекты возрастает с увеличением его концентрации в среде роста. Однако если при концентрациях кверцетина 0.1 и 1 мкмоль/л пролиферативная активность и иммунофенотип МСК оставались без изменений, то при увеличении концентрации до 10 мкмоль/л пролиферативная активность МСК снижалась (на 35 %), изменялась экспрессия таких маркеров МСК, как CD44 и CD90.

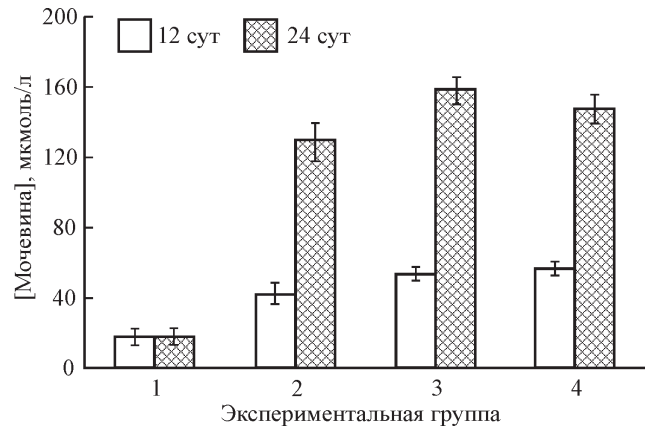
При концентрации кверцетина 100 мкмоль/л МСК не пролиферировали вовсе, а изменение иммунофенотипа было еще более выраженным. Важно отметить, что во всем диапазоне концентраций кверцетина доля клеток в культуре в состоянии некроза или апоптоза не изменялась, т. е. кверцетин в данных условиях не проявлял ток-

сического действия на МСК. Эти результаты позволили предположить, что кверцетин в высоких концентрациях (более 1 мкмоль/л) может индуцировать в МСК процессы, направленные на их дифференцировку. В связи с этим изучение влияния кверцетина на гепатоцитарную дифференцировку МСК проведено при двух концентрациях: 1 мкмоль/л — максимальная концентрация, при которой кверцетин не вызывает изменения пролиферативной активности и иммунофенотипа клеток (группа 3), и 10 мкмоль/л — концентрация, при которой кверцетин индуцирует эти изменения (группа 4).

Как видно из результатов, представленных на рис. 2, после культивирования в течение 12 и 24 сут концентра-

Рис. 2. Концентрация мочевины в среде роста МСК в экспериментальных группах 1—4 после культивирования клеток в течение 12 и 24 сут.

Здесь и на рис. 3—6: группа 1 — полная ростовая среда без добавления ростовых факторов; группа 2 — присутствие в ростовой среде FGF4 и HGF в течение первых 12 сут, а последующих 12 сут — HGF, онкостатина М и дексаметазона; группы 3 и 4 — условия 2-й группы, но добавлен кверцетин в концентрации 1 (группа 3) или 10 (группа 4) мкмоль/л.



ция мочевины в среде МСК 3-й и 4-й групп выше, чем в среде МСК, дифференцированных в индукционных средах без кверцетина. Поскольку контрольные эксперименты показали, что кверцетин в отсутствие ростовых факторов не оказывает влияния на содержание мочевины в среде роста, полученные результаты позволяют предполагать усиление гепатоцитарной дифференцировки МСК в его присутствии. Следует отметить, что концентрация мочевины в среде роста была максимальной (158 мкмоль/л) при использовании кверцетина в концентрации 1 мкмоль/л. Об усилении гепатоцитарной дифференцировки МСК в присутствии кверцетина указывают и представленные на рис. 3 и 4 данные о содержании в клетках 3-й и 4-й групп ЦК19 и α-ФП. После 24 сут культивирования МСК доля ЦК19-позитивных и α-ФП-позитивных

клеток в 3-й группе составляет 17.5 и 67.2 % соответственно (табл. 1), что выше, чем в случае дифференцировки МСК в индукционных средах без кверцетина. При большей концентрации кверцетина (10 мкмоль/л) доля ЦК19-позитивных и α-ФП-позитивных клеток также была более высокой по сравнению с МСК 2-й группы, однако его влияние на эффективность коммитирования снижалось, что согласуется с представленными выше данными

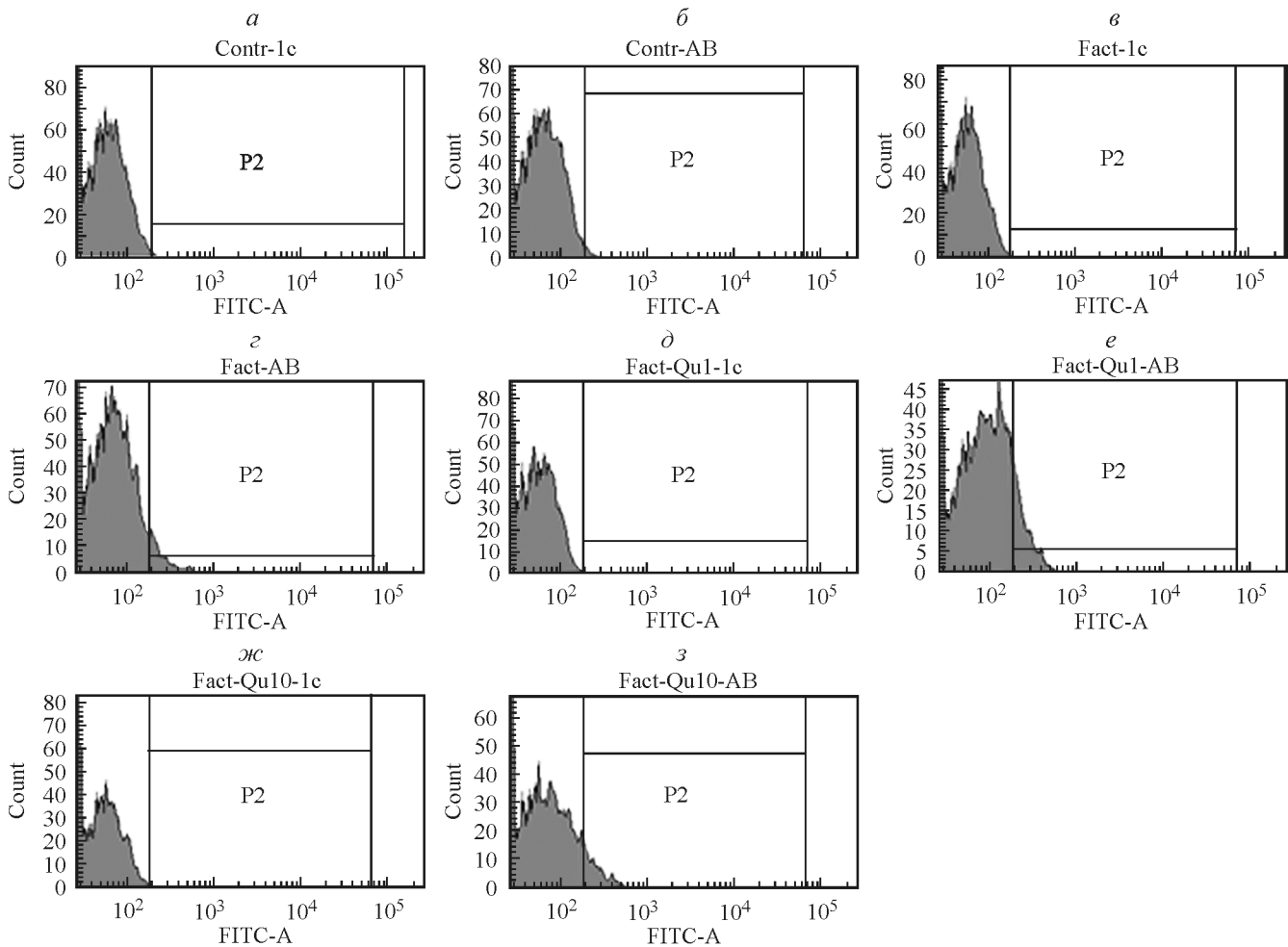


Рис. 3. Гистограммы распределения по интенсивности флуоресценции МСК, инкубированных с изотипическим контролем (а, в, д, ж) или антителами против ЦК19 (б, г, е, з), в экспериментальных группах 1 (а, б), 2 (в, г), 3 (д, е) и 4 (ж, з).

По вертикали — число событий; по горизонтали — интенсивность флуоресценции в канале FITC проточного цитофлуориметра, отн. ед. P2 — область интенсивности флуоресценции ЦК19-позитивных клеток. МСК культивировали в течение 24 сут.

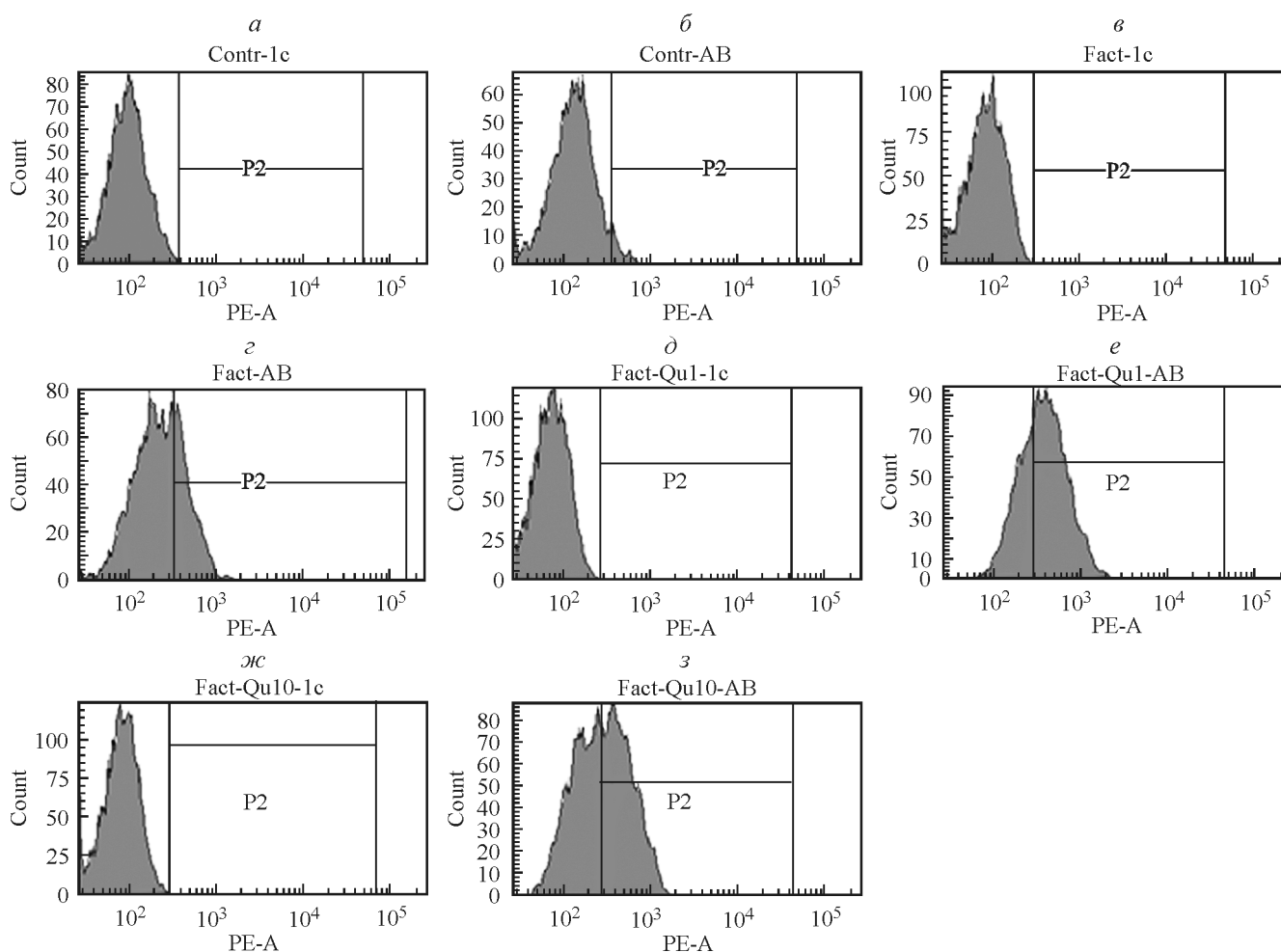


Рис. 4. Гистограммы распределения по интенсивности флуоресценции МСК, инкубированных с изотипическим контролем (а, в, д, ж) или антителами против α -ФП (б, г, е, з), в экспериментальных группах 1 (а, б), 2 (в, г), 3 (д, е) и 4 (ж, з).

По вертикали — число событий; по горизонтали — интенсивность флуоресценции в канале PE протоочного цитофлуориметра, отн. ед. P2 — область интенсивности флуоресценции α -ФП-положительных клеток. МСК культивировали в течение 24 сут.

ми по содержанию мочевины в среде роста. В отсутствие факторов дифференцировки кверцетин не оказывал влияния на экспрессию исследуемых белков в МСК.

Особый интерес представляет изучение влияния кверцетина на сопряженную с гепатоцитарной дифференцировкой монооксигеназную активность в МСК. Известно, что полифенолы способны оказывать модулирующее

влияние на активность монооксигеназной системы в гепатоцитах. Показано, что кверцетин снижает активность CYP1A и других изоформ цитохрома P450, а также индукцию этой активности ксенобиотиками (Chatuphonprasert et al., 2010; Tang et al., 2013). Измерение активности CYP1A показало, что после дифференцировки МСК в присутствии кверцетина скорость деалкилирования

Таблица 1

Доля ЦК19- и α -ФП-положительных МСК в экспериментальных группах 1—4 после культивирования клеток в течение 12 и 24 сут

МСК	Группа МСК							
	1		2		3		4	
	12 сут	24 сут	12 сут	24 сут	12 сут	24 сут	12 сут	24 сут
ЦК19 ⁺ , %	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.3	6.5 ± 0.8	1.6 ± 0.2	17.5 ± 0.8	1.5 ± 0.3	11.0 ± 1.5
α -ФП ⁺ , %	3.7 ± 0.7	4.5 ± 1.1	9.0 ± 1.5	32.2 ± 3.5	12.2 ± 2.1	67.2 ± 7.1	12.0 ± 1.2	48.5 ± 3.8

Примечание. Здесь и в табл. 2 группы: 1 — полная ростовая среда без добавления ростовых факторов; 2 — присутствие в ростовой среде FGF4 и HGF в течение первых 12 сут, а последующих 12 сут — HGF, онкостатин М и дексаметазона; 3 и 4 — условия 2-й группы, но добавлен кверцетин в концентрации 1 (группа 3) или 10 (группа 4) мкмоль/л.

7-этоксирезорифина клетками снижается (рис. 5). Наиболее выражен данный эффект в 4-й группе МСК (10 мкмоль/л кверцетина) через 24 сут культивирования. Эти результаты свидетельствуют о том, что механизмы влияния кверцетина на монооксигеназную активность в коммитированных в гепатоцитарном направлении МСК близки к таковым для зрелых гепатоцитов.

Рассматривая возможные механизмы влияния кверцетина на гепатоцитарную дифференцировку МСК необходимо отметить тот факт, что при этой дифференцировке в клетках увеличиваются содержание активных форм кислорода и окислительная модификация белков и липидов (Khajeniazi et al., 2013; Esmaeli et al., 2014). Очевидно, что такого рода процессы могут отрицательно сказаться на функциональном состоянии клеток, в частности на эффективности дифференцировки (Mateos et al., 2013; Sun et al., 2013). В свою очередь снижение окислительных повреждений клеточных компонентов может положительно сказаться на эффективности дифференцировки МСК.

Окрашивание витальными красителями (табл. 2) показало снижение доли жизнеспособных клеток и увеличение доли клеток, находящихся в состоянии апоптоза и некроза, в культуре МСК 2-й группы по сравнению с МСК 1-й группы. В то же время после культивирования МСК в индукционных средах, содержащих кверцетин, доля жизнеспособных клеток в культуре была более высокой (табл. 2). Эти результаты свидетельствуют в пользу интенсификации окислительных повреждений в МСК при их коммитировании в гепатоцитарном направлении и протекторном действии кверцетина от развития в клетках окислительного стресса.

Для оценки устойчивости дифференцированных МСК к окислительному стрессу его моделировали инкубированием суспензий клеток в среде ДМЕМ в присутствии 150 мкмоль/л ТБГП в течение 60 мин. В этих условиях происходит гибель МСК по механизму некроза и апоптоза (Пинчук и др., 2015). Инкубация МСК 2-й экспериментальной группы, культивированных в течение 24 сут, приводит к снижению доли жизнеспособных клеток до 37 % и увеличению доли некротических и апоптотических до 55 и 8 % соответственно (рис. 6). В суспензиях МСК, дифференцированных в присутствии кверцетина, гибель клеток снижается. Так, в суспензии МСК 3-й группы (1 мкмоль/л кверцетина) доля жизнеспособных клеток составляет 56, а в состоянии некроза и апоптоза — 34 и 10 % соответственно. Для МСК 4-й группы (10 мкмоль/л кверцетина) эти же показатели составляют 65, 20 и 15 % (рис. 6). Таким образом, кверцетин увеличивает устойчивость к окислительному стрессу МСК, дифференцированных в гепатоцитарном направлении, что (можно предполагать) лежит в основе повышения эф-

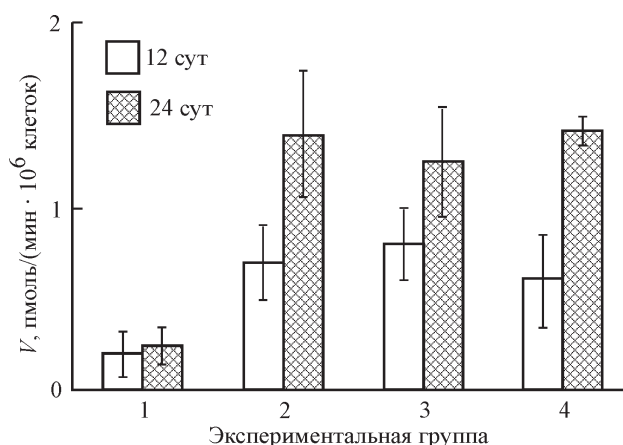


Рис. 5. Скорость (V) о-деалкилирования 7-этоксирезорифина МСК в экспериментальных группах 1—4 после культивирования клеток в течение 12 и 24 сут.

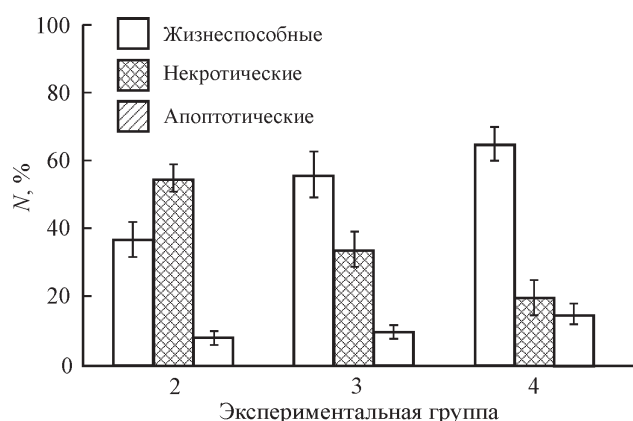


Рис. 6. Влияние окислительного стресса на долю (N) жизнеспособных, некротических и апоптотических МСК в экспериментальных группах 2—4 после культивирования клеток в течение 24 сут.

фективности гепатоцитарной дифференцировки МСК в его присутствии.

Вместе с тем эффективность гепатоцитарной дифференцировки МСК в присутствии кверцетина в концентрации 10 мкмоль/л оказалась ниже, чем в случае 1 мкмоль/л кверцетина, несмотря на более высокую устойчивость клеток к окислительному стрессу в случае 10 мкмоль/л кверцетина. Вероятно, это связано с тем, что при высоких концентрациях кверцетин может выступать в качестве индуктора дифференцировки МСК в других направлени-

Таблица 2

Доля жизнеспособных, апоптотических и некротических МСК в экспериментальных группах 1—4 после культивирования клеток в течение 24 сут

МСК, %	Группа МСК			
	1	2	3	4
Жизнеспособные	94.2 ± 1.1	90.3 ± 1.5	93.2 ± 1.1	93.7 ± 1.2
Апоптотические	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.6	1.7 ± 0.5	2.0 ± 0.5
Некротические	4.1 ± 0.7	7.7 ± 0.9	5.1 ± 0.6	4.3 ± 0.7

ях. Так, в культурах МСК, культивированных в присутствии кверцетина в микромолярных концентрациях (без добавления ростовых факторов), регистрируется увеличение активности щелочной фосфатазы, синтеза коллагена I типа и остеокальцина, являющихся признаками остеогенной дифференцировки клеток (Li et al., 2015). При этом наибольший эффект наблюдается при использовании кверцетина в концентрации 10 мкмоль/л, тогда как при снижении концентрации до 1 мкмоль/л индукция остеогенеза МСК значительно уменьшается. Очевидно, изменения внутриклеточных процессов в сторону остеогенеза составляют конкуренцию гепатоцитарной дифференцировке МСК и снижают эффективность последней при высокой концентрации кверцетина.

В целом полученные результаты свидетельствуют о дифференцировке МСК человека в гепатоцитарном направлении при их культивировании в присутствии FGF4, HGF, онкостатина М и дексаметазона, проявляющейся в увеличении секреции клетками мочевины, синтеза белков ЦК19 и α -ФП и активности монооксигеназной системы. Наличие в индукционной среде кверцетина в концентрации 1 или 10 мкмоль/л усиливает проявление таких признаков гепатоцитарной дифференцировки МСК, как секреция мочевины, синтез ЦК19 и α -ФП. Концентрация кверцетина 1 мкмоль/л наиболее оптимальна для усиления гепатоцитарной дифференцировки МСК. Дифференцированные в гепатоцитарном направлении в присутствии кверцетина МСК характеризуются более высокой жизнеспособностью и устойчивостью к окислительному стрессу. Представленные данные свидетельствуют о возможности использования кверцетина для оптимизации гепатоцитарной дифференцировки МСК ЖТ человека в культуре с целью получения биомассы тканеспецифических клеток с высокими функциональными характеристиками.

Список литературы

- Баранов Е. В., Третьяк С. И., Василевич И. Б., Лобанок Е. С., Волотовский И. Д. 2013. Клинические возможности применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия (Гены и клетки). 8 (2): 78—83. (Baranov E. V., Tretyak S. I., Vasilevich I. B., Lobanok E. S., Volotovskiy I. D. 2013. The clinical application of autologous mesenchymal stem cells isolated from fat tissue for the treatment of patients with trophic ulcers of lower extremities. Genes and Cells. 8 (2): 78—83.)
- Гумерова А. А., Шафигуллина А. К., Трондин А. А., Газизов И. М., Андреева Д. И., Калигин М. С., Ризванов А. А., Киясов А. П. 2011. Звездчатые клетки печени стимулируют дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысы в гепатоциты *in vitro*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия (Гены и клетки). 6 (4): 72—81. (Gumerova A. A., Shafigullina A. K., Trondin A. A., Gazizov I. M., Andreeva D. I., Kaligin M. S., Rizvanov A. A., Kiasov A. P. 2011. Hepatic stellate cells stimulate hepatocyte differentiation of rat's bone marrow derived mesenchymal stem cells *in vitro*. Genes and Cells. 6 (4): 72—81.)
- Лундуп А. В., Онищенко Н. А., Шагидулин М. Ю., Крашенинников М. Е. 2010. Стволовые/прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени. Вестн. трансплантология и искусственных органов. 12 (2): 100—107. (Lundup A. V., Onishchenko N. A., Shagidulin M. Y., Krashennnikov M. E. 2010. Liver and bone marrow stem/progenitor cells as regulators of reparative regeneration of damaged liver. Russ. J. Trans. Artificial Organs. 12 (2): 100—107.)
- Пинчук С. В., Василевич И. Б., Бутенко А. В., Квачева З. Б., Волотовский И. Д. 2015. Регуляторные свойства кверцетина в культурах мезенхимальных стволовых клеток. Докл. НАН Беларуси. 59 (1): 90—95. (Pinchuk S. V., Vasilevich I. B., Butenko A. V., Kvacheva Z. B., Volotovskiy I. D. 2015. Regulatory properties of quercetin in the cultures of mesenchymal stem cells. Doklady Nat. Acad. Sci. of Belarus. 59 (1): 90—95.)
- Тепляшин А. С., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Чурикова Н. И., Ростовская М. С., Савченкова И. П. 2005. Характеристика мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. Цитология. 47 (2): 130—135. (Teplishin A. S., Korzhikova S. V., Sharifullina S. Z., Tchupikova N. I., Rostovskaya M. S., Savchenkova I. P. 2005. Characteristics of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. Tsitologiya. 47 (2): 130—135.)
- Banas A., Teratani T., Yamamoto Y., Tokuhara M., Takeshita F., Quinn G., Okochi H., Ochiya T. 2007. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. Hepatology. 46: 219—228.
- Behnia K., Bhatia S., Jastromb N., Balis U., Sullivan S., Yarmush M., Toner M. 2000. Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. Tissue Eng. 6: 467—479.
- Chatuphonprasert W., Kondo S., Jarukamjorn K., Kawasaki Y., Sakuma T., Nemoto N. 2010. Potent modification of inducible CYP1A1 expression by flavonoids. Biol. Pharm. Bull. 33: 1698—1703.
- Cichoz-Lach H., Michalak A. 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World J. Gastroenterol. 20: 8082—8091.
- Dhiman R. K., Chawla Y. K. 2005. Herbal medicines for liver diseases. Digestive Dis. Sci. 50: 1807—1812.
- Dong X. J., Zhang H., Pan R. L., Xiang L. X., Shao J. Z. 2010. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. World J. Gastroenterol. 16: 3267—3278.
- Esmali S., Allameh A., Soleimani M., Rahbarizadeh F., Frouzandeh-Moghadam M. 2014. The role of albumin and PPAR- α in differentiation-dependent change of fatty acid profile during differentiation of mesenchymal stem cells to hepatocyte-like cells. Cell Biochem. Funct. 32: 410—419.
- Kang X. Q., Zang W. J., Song T. S., Xu X. L., Yu X. J., Li D. L., Meng K. W., Wu S. L., Zhao Z. Y. 2005. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes *in vitro*. World J. Gastroenterol. 11: 3479—3484.
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells. 24: 1294—1301.
- Khajeniazi S., Allameh A., Soleimani M., Mortaz E. 2013. Changes in COX-2 and oxidative damage factors during differentiation of human mesenchymal stem cells to hepatocyte-like cells is associated with downregulation of P53 gene. Biol. Chem. 394: 1213—1222.
- Konno M., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Fukusumi T., Nishikawa S., Ohta K., Kano Y., Ozaki M., Noguchi Y., Sakai D., Kudoh T., Kawamoto K., Eguchi H., Satoh T., Tanemura M., Nagano H., Doki Y., Mori M., Ishii H. 2013. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. Develop. Growth Differ. 55: 309—318.
- Li Y., Wang J., Chen G., Feng S., Wang P., Zhu X., Zhang R. 2015. Quercetin promotes the osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells via mitogen-activated protein kinase signaling. Exp. Ther. Med. 9: 2072—2080.
- Mateos J., De la Fuente A., Lesende-Rodriguez I., Fernandez-Pernas P., Arufe M. C., Blanco F. J. 2013. Lamin A deregulation in human mesenchymal stem cells promotes an impairment in their chondrogenic potential and imbalance in their response to oxidative stress. Stem Cell Res. 11: 1137—1148.
- Molina M. F., Sanchez-Reus I., Iglesias I., Benedi J. 2003. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. Biol. Pharm. Bull. 26: 1398—1402.

Schwartz R. E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W. S., Verfaillie C. M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109 : 1291—1302.

Sun N., Yang L., Li Y., Zhang H., Chen H., Liu D., Li Q., Cai D. 2013. Effect of advanced oxidation protein products on the proliferation and osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.* 32 : 485—491.

Tang Y., Tian H., Shi Y., Gao C., Xing M., Yang W., Bao W., Wang D., Liu L., Yao P. 2013. Quercetin suppressed CYP2E1-dependent ethanol hepatotoxicity via depleting heme pool and releasing CO. *Phytomedicine.* 20 : 699—704.

Wu X. B., Tao R. 2012. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 11 : 360—371.

Yoshikawa M., Ninomiya K., Shimoda H., Nishida N., Matsuda H. 2002. Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 25 : 72—76.

Zhou C., Lin Y. 2014. Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells promoted by quercetin. *Cell Prolif.* 47 : 124—132.

Поступила 22 XII 2015

THE INFLUENCE OF QUERCETIN ON THE HEPATIC DIFFERENTIATION OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

S. V. Pinchuk,¹ I. B. Vasilevich, Z. B. Kvacheva, I. D. Volotovskii

Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072;

¹ e-mail: pinchuksv@mail.ru

The human adipose-derived mesenchymal stem cells was shown to be hepatic differentiated under influence of inductor factors. The differentiation of MSCs was induced by fibroblast growth factor-4, hepatocyte growth factor, oncostatin M and dexamethasone. The influence of quercetin on the hepatic differentiation of MSCs in culture was investigated. The adding quercetin into induction medium (1 or 10 $\mu\text{mol/l}$) enhanced the manifestation of signs of hepatic differentiation MSCs such as urea secretion, cytokeratin 19 and α -fetoprotein synthesis. Quercetin modulating action on the CYP1A — cytochrome P450 activity in differentiated cells was found. MSCs which was differentiated in the presence of quercetin had a higher viability and resistance to oxidative stress.

Key words: mesenchymal stem cells, quercetin, hepatic differentiation.