

12. Politz J.C., Hogan E.M., Pederson T. MicroRNAs with a nucleolar location // RNA. – 2009. – № 15. – P. 1705-1715.

13. Tian X.S., Zhou F., Yang R. Effects of intracerebroventricular injection of delta-opioid receptor agonist TAN-67 or antagonist naltrindole on acute cerebral isch-

emia in rat // Sheng Li Xue Bao. – 2008. – Vol. 60, № 4. – P. 475-484.

14. Wei R., Zhang R., Xie Y., Shen L., Chen F. Hydrogen suppresses hypoxia/reoxygenation-induced cell death in hippocampal neurons through reducing oxidative stress // Cell Physiol. Biochem. – 2015. – Vol. 36, № 2. – P. 585-598.

Координаты для связи с авторами: Симанкова Анна Александровна – преподаватель кафедры нормальной и патологической физиологии ДВГМУ, тел. +7-962-229-12-26, e-mail: annasimmankova@mail.ru; Лебедько Ольга Антоновна – д-р мед. наук, зав. КДЛ НИИ ОМиД РАМН, e-mail: leoaf@mail.ru; Сазонова Елена Николаевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии ДВГМУ, тел. +7-924-206-34-63, e-mail: sazen@mail.ru.



УДК 612.014.4:576.355: 599.323.4-092.9

Е.Н. Сазонова^{1,2}, Д.В. Яковенко¹, О.А. Лебедько^{1,2}, И.М. Мальцева³, С.С. Тимошин¹

ЦИТОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ПУЛЬМОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,

680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²Институт охраны материнства и детства Хабаровского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН, 680022, ул. Воронежская 49, корп. 1,

тел./факс: 8-(4212)-35-63-35, 35-65-91, e-mail: iomid@yandex.ru;

³ООО «Медико-эстетический центр «Биарritz», 680000, ул. Дзержинского, 71, тел. 8-(4212)-32-38-61, г. Хабаровск

Резюме

Целью исследования было изучение характера влияния дигидрокверцетина (ДГК) на первичную культуру пульмональных фибробластов. 6-часовое воздействие ДГК (160 мкМ) на фибробласты индуцировало угнетение продукции клетками супероксид-радикала, уменьшение размеров ядер фибробластов и суммарной площади зон ядрышкового организатора на фоне стабильной пролиферативной активности культуры. 2-часовой оксидативный стресс (ОС), индуцированный воздействием раствора перекиси водорода (60мкМ), приводил к полной блокаде ДНК-синтетической активности фибробластов, при этом имело место достоверное уменьшение площади ядер фибробластов и суммарной площади зон ядрышкового организатора. На фоне ДГК имело место существенное снижение повреждающего действия ОС: интенсивность продукции супероксид радикала в культуре клеток стала достоверно ниже, была зарегистрирована ДНК-синтетическая активность фибробластов.

Ключевые слова: оксидативный стресс, фибробласты, дигидрокверцетин.

E.N. Sazonova^{1,2}, D.V. Yakovenko¹, O.A. Lebed'ko^{1,2}, I.M. Maltseva³, S.S. Timoshin¹

CYTOPROTECTIVE EFFECT OF DIHYDROQUARCELINE IN THE INITIAL CULTURE OF PULMONARY FIBROBLASTS OF ALBINO RATS EXPOSED TO OXIDATIVE STRESS

¹Far Eastern State Medical University;

²Research Institute of maternity and infancy protection;

³Medical-esthetic Center «Bioritz», Khabarovsk

Summary

The goal of the research was to study the character of dehydroquercetine (DHQ) effect on the initial culture of pulmonary fibroblasts. 6-hour exposure of DHQ (160 mkM) on fibroblasts induced suppression of products by superoxide radicals, diminish sizes of fibroblasts nucleoli and a total square of nucleoli zone organizer at the background of stable proliferation of culture activity. 2-hour exposure of oxidative stress (OS), induced by hydrogen peroxide solution (60mkM), resulted in a complete blockade of fibroblasts DNA-synthetic activity, at the same time there occurred a reliable decrease of fibroblasts' nucleoli square and a total summarized zone square of nucleoli organizer. At the background of DHQ there was evidence of dramatic diminishing of a harmful effect of OS: intensity of superoxide radical production in the cell culture became reliably low. Fibroblasts DNA-synthetic activity was registered.

Key words: oxidative stress, fibroblasts, dehydroquercetine.

Дигидрокверцетин – это растительный антиоксидант, полифенольный биофлавоноид [2]. В литературе описано антипролиферативное и цитотоксическое воздействие биологически активных веществ класса биофлавоноидов на культуры опухолевых клеток [5]. Вместе с тем, характер влияния биофлавоноида кверцетина и его аналогов на нормальные клетки может существенно отличаться от влияния на опухолевые клетки [7].

Целью исследования было изучение характера влияния дигидрокверцетина (ДГК) на первичную культуру пульмональных фибробластов на интактном фоне и в условиях оксидативного стресса.

Материалы и методы

Объектом исследования служила первичная культура пульмональных фибробластов новорожденной белой крысы линии Wistar. Биоптат правого легкого подвергали механической дезагрегации с последующей обработкой коллагеназой панкреаса краба (Биолот, Россия) – 500 ед./мл при 37 °С в течение 15 мин. После двукратной отмывки раствором Хенкса (Биолот, Россия), полученный материал высевали в культуральные флаконы. Культивирование проводили в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США) в газовой среде с 5 % содержанием CO₂. Для исследования использовали клетки 5 пассажа.

Инкубацию пульмональных фибробластов с ДГК (Sigma Aldrich, США) проводили в течение 6 часов при концентрации вещества в культуральной среде 160 мкМ (50 мг/л). Оксидативный стресс моделировали добавлением в 15 мл инкубационной среды 0,001 мл 3 % H₂O₂ (60 мкМ) с экспозицией в течение 2 часов [3]. Формировали следующие серии: 1 – «контроль»; 2 – «ДГК» (воздействие ДГК в течение 6 часов); 3 – «оксидативный стресс» (добавление в культуральную среду H₂O₂ с экспозицией в течение 2 часов); 4 – «ДГК + оксидативный стресс» (воздействие ДГК в течение 6 часов с обработкой культуры в заключительные 2 часа инкубации перекисью водорода).

Для оценки процессов генерации супероксиданион радикалов пульмональными фибробластами использовали метод люцигенин-зависимой хемилюминесценции (ХМЛ) [1]. Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER», сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы «Finlab». Фибробласты снимали с подложки с помощью раствора трипсина-Версена (Биолот, Россия) и трехкратно отмывали раствором Хенкса. Подсчет клеток в суспензии фибробластов проводили в камере Горяева. Для хемилюминесцентного анализа использовали 1×10⁶ клеток. Люцигенин (N,N'-dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate; Sigma-Aldrich) добавляли в конечной концентрации 5 мкМ. Определяли светосумму люцигенин-зависимого свечения (S_{лuc}) за 5 минут, которую выражали в относительных единицах.

ДНК-синтетическую активность пульмональных фибробластов исследовали методом автордиографии с ³H-тимидином. В течение 1 часа клеточные монослои инкубировали при 37 °С в растворе Хенкса с добавлением ³H-тимидина в концентрации 1 мкКюри/мл. После инкубации монослои тщательно промывали в

растворе Хенкса и фиксировали в 96 % этаноле. Предметные стекла с монослоем фибробластов покрывали ядерной фотоэмульсией Ilford (Великобритания) и инкубировали при 4 °С в течение 28 суток. Затем проводили обработку проявителем Д-19, фиксировали в 33 % растворе гипосульфита натрия и окрашивали гематоксилином. Индекс меченых ядер (ИМЯ) рассчитывали на основании просмотра не менее 5 000 фибробластов каждого монослоя и выражали в процентах.

Параметры ядрышкового аппарата клеток оценивали с помощью компьютерной морфоцитометрии на анализаторе изображения «МЕКОС-Ц» в монослоях фибробластов, окрашенных азотнокислым серебром. Исследовали площадь ядер фибробластов, количество зон ядрышковых организаторов (ЯОР), суммарную площадь зон ЯОР в ядре. Площади ядер и зон ЯОР рассчитывали на основании измерения 50 клеток. Для анализа количества зон ЯОР просматривали 200 ядер фибробластов.

Результаты исследования обрабатывали с использованием программы «Statistica 6.0». Различия между контрольной и опытными сериями считали статистически достоверными при p<0,05, используя t-критерий Стьюдента. Всего в эксперименте было исследовано 24 монослоя фибробластов.

Результаты и обсуждение

Воздействие ДГК на первичную культуру пульмональных фибробластов (серия 2) индуцировало угнетение продукции супероксид-радикала: наблюдалось достоверное снижение интенсивности люцигенин-зависимой ХМЛ на 35,5 % (рис. 1). Показатель активности ДНК-синтетических процессов – индекс меченых ядер, характеризующий долю фибробластов в S-фазе клеточного цикла, – после воздействия ДГК не имел достоверных отличий от контрольного параметра (ИМЯ контроль – 30,69±3,70 %; ИМЯ ДГК – 26,33±2,90 %). Морфометрическое исследование ядер фибробластов выявило достоверное уменьшение их размеров на 9,5 % (таблица). Кроме того, мы наблюдали достоверное снижение суммарной площади зон ЯОР на 7,8 %. Количество зон ЯОР в ядрах фибробластов, подвергнутых воздействию ДГК, не отличалось от контрольного. Воздействие ДГК на размер ядер и ядрышковый аппарат фибробластов может быть обусловлено способностью биофлавоноидов ингибировать активность мембранной тирозинкиназы, необходимой для реализации эффектов ростовых факторов [8].

Таблица

Параметры ядрышкового аппарата в первичной культуре пульмональных фибробластов исследуемых экспериментальных серий

Исследуемая серия	Площадь ядра (мкм ²)	Суммарная площадь зон ЯОР (мкм ²)	Количество зон ЯОР
Контроль	218,60±4,39	17,03±0,39	3,95±0,07
ДГК	197,94±3,94*	15,70±0,37*	3,98±0,08
Оксидативный стресс	80,83±3,46*	8,24±0,46*	3,11±0,10*
ДГК + оксидативный стресс	126,07±5,91***	12,99±0,47*. **	3,35 ± 0,10*

Примечание. * – p<0,05 по отношению к серии «контроль»; ** – p<0,05 по отношению к серии «оксидативный стресс».

Воздействие на культивируемые пульмональные фибробласты среды с 60 мкМ перекиси водорода (серия 3 – «оксидативный стресс») индуцировало достоверное повышение интенсивности люцигенин-зависимой ХМЛ в культуре на 78,3 % (рисунок). Выраженная активация процессов свободнорадикального окисления в культуре сопровождалась практически полным блоком ДНК-синтетических процессов в культуре: в монослоях клеток, подвергнутых воздействию оксидативного стресса, встречались лишь единичные меченые ядра, с минимальной интенсивностью метки. По мнению Davies K.J. (1999), при оксидативном стрессе происходит блокада синтеза ДНК с целью защиты генетического аппарата от оксидативного повреждения.

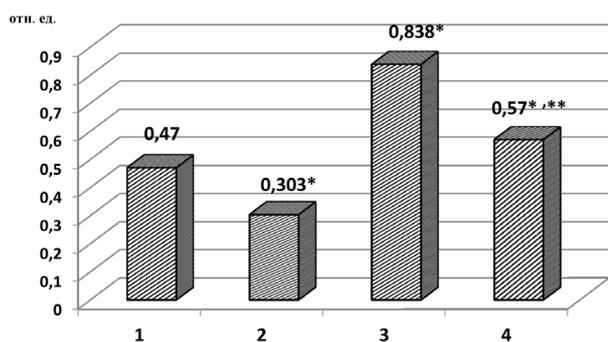


Рис. Интенсивность люцигенин-зависимой ХМЛ в суспензированной культуре пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс: 1 – контроль; 2 – ДГК; 3 – оксидативный стресс; 4 – ДГК + оксидативный стресс

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к серии «контроль»; ** – $p < 0,05$ по отношению к серии «оксидативный стресс».

В фибробластах, подвергнутых воздействию перекиси водорода, по сравнению с контролем, наблюдалось достоверное значительное (на 63 %) уменьшение показателя площади ядер фибробластов; снижение (на 51,6 %) суммарной площади зон ядрышковых организаторов, а также достоверное уменьшение количества зон ЯОР в ядрах фибробластов (таблица). По данным Mayer C., Grummt I. (2005) и Wnuk M., et al. (2008), оксидативный стресс угнетает синтез рибосомальной РНК, что выражается в отклонении параметров ядрышкового аппарата.

Выраженность изменений в первичной культуре фибробластов, индуцированных воздействием перекиси водорода, была несколько меньше в монослоях, предварительно инкубированных с ДГК (серия 4). Интенсивность люцигенин-зависимой ХМЛ в этих образцах культуры оставалась достоверно выше кон-

трольного параметра (на 21,3 %), однако была достоверно (на 32 %) ниже аналогичного параметра группы «оксидативный стресс» (рисунок).

Аналогичная закономерность наблюдалась и при анализе размеров ядер и состояния ядрышкового аппарата у фибробластов, подвергнутых действию оксидативного стресса на фоне ДГК. Так, показатель площади ядер фибробластов и суммарной площади ядрышек клеток серии «ДГК+оксидативный стресс» был достоверно ниже контрольных параметров, однако, достоверно выше аналогичных показателей серии «оксидативный стресс» (таблица).

Особенно отчетливо цитопротективный эффект ДГК был замечен при анализе процессов синтеза ДНК в культуре фибробластов. Если в серии монослоев, подвергнутых воздействию перекиси водорода, мы наблюдали практически полное исчезновение ДНК-синтетической активности, то предварительное воздействие ДГК восстанавливало индекс меченых ядер культуры фибробластов до $6,56 \pm 1,50$ %.

Результаты проведенного исследования в условиях первичной клеточной культуры указывают на наличие у растительного биофлавоноида дигидрокверцетина собственного прямого цитопротективного эффекта, реализующегося в условиях оксидативного стресса. Аналогичные по характеру эффекты были зарегистрированы Braganhol E., et al (2006) при исследовании влияния кверцетина на культуру нейронов гиппокампа [4]. Молекулярные механизмы цитопротективного влияния дигидрокверцетина в условиях оксидативного стресса требуют дальнейшего исследования.

Выводы

1. Влияние 160 мкМ ДГК на первичную культуру пульмональных фибробластов индуцирует угнетение продукции супероксид-радикала, достоверное уменьшение размеров ядер фибробластов и суммарной площади зон ЯОР.

2. Воздействие на культивируемые пульмональные фибробласты 60 мкМ перекиси водорода вызывает достоверную активацию продукции супероксид-радикала в культуре, блокаду ДНК-синтетической активности клеток и достоверное снижение площади ядер и суммарной площади зон ЯОР.

3. На фоне действия ДГК имеет место существенное снижение цитотоксического действия оксидативного стресса: уменьшается продукция супероксид-радикала, происходит частичное восстановление пролиферативной активности клеточной культуры.

Литература

1. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
 2. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – С. 556.
 3. Самохвалов В.А., Сметанина М.Д., Мусейкина Н.Ю. и др. Влияние низкой концентрации перекиси водорода на метаболизм клеток крови // Биомедицинская химия. – 2003. – Т. 2. – С. 122-127.

4. Braganhol E., Zamin L.L., Canedo D., et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line // Anti-Cancer Drugs. – 2006. – Vol. 17 (6). – P. 663-671.
 5. Csokay B., Prajda N., Weber G., Olah E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin // Life Sciences. – 1997. – Vol. 60 (24). – P. 2157-2163.
 6. Davies K.J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress // IUBMB Life. – 1999. – Vol. 48 (1). – P. 41-70.

7. Kim H.S., Quon Michael J., Kim Jeonga. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate // *RedoxBiology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 187-195.

8. Liang Y.C., Lin-shiau S.Y., Chen C.F., Lin J.K. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by(-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells // *J. Cell. Biochem.* – 1997. – Vol. 67. – P. 55-65.

9. Mayer C., Grummt I. Cellular stress and nucleolar function // *Cell Cycle*. – 2005. – Vol. 4 (8). – P. 1036-1038.

10. O'Donnell V.B., Azzi A. High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme // *Biochem J.* – 1996. – Vol. 318 (Pt 3). – P. 805-812.

11. Wnuk M., Lewinska A., Bugno M., Bartosz G., Slota E. Oxidant-induced decrease of the expression of nucleolar organizer regions in pig lymphocytes can be useful for monitoring the cellular effects of oxidative stress // *Mutat Res* – 2008. – Vol. 653 (1-2). – P. 124-129.

Literature

1. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free Radicals and Cell Chemiluminescence // *Advances in Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 49. – P. 341-388.

2. Menshikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., et al. Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants. – M.: Slovo, 2006. – P. 556.

3. Samokhvalov V.A., Smetanina M.D., Museikina N.Yu., et al. Influence of low hydrogen peroxide concentration on blood cells metabolism // *Biomedical Chemistry*. – 2003. – Vol. 2. – P. 122-127.

4. Braganhol E., Zamin L.L., Canedo D., et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line // *Anti-Cancer Drugs*. – 2006. – Vol. 17 (6). – P. 663-671.

5. Csokay B., Prajda N., Weber G., Olah E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin // *Life Sciences*. – 1997. – Vol. 60 (24). – P. 2157-2163.

6. Davies K.J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress // *IUBMB Life*. – 1999. – Vol. 48 (1). – P. 41-70.

7. Kim H.S., Quon Michael J., Kim Jeonga. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate // *RedoxBiology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 187-195.

8. Liang Y.C., Lin-shiau S.Y., Chen C.F., Lin J.K. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by(-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells // *J. Cell. Biochem.* – 1997. – Vol. 67. – P. 55-65.

9. Mayer C., Grummt I. Cellular stress and nucleolar function // *Cell Cycle*. – 2005. – Vol. 4 (8). – P. 1036-1038.

10. O'Donnell V.B., Azzi A. High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme // *Biochem J.* – 1996. – Vol. 318 (Pt 3). – P. 805-812.

11. Wnuk M., Lewinska A., Bugno M., Bartosz G., Slota E. Oxidant-induced decrease of the expression of nucleolar organizer regions in pig lymphocytes can be useful for monitoring the cellular effects of oxidative stress // *Mutat Res* – 2008. – Vol. 653 (1-2). – P. 124-129.

Координаты для связи с авторами: Сазонова Елена Николаевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии ДВГМУ, тел. +7-924-206-34-63, e-mail: sazen@mail.ru; Яковенко Дарья Валерьевна – преподаватель кафедры нормальной и патологической физиологии ДВГМУ, тел. +7-924-115-65-18, e-mail: yakovenkodariya@ya.ru; Лебедько Ольга Антоновна – д-р мед. наук, зав. лабораторией комплексных методов исследований бронхолегочной и перинатальной патологии Хабаровский филиал ФГБУ «Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания» СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства; Мальцева Ирина Михайловна – главный врач ООО «Медико-эстетический центр «Биарриц»; Тимошин Сергей Серафимович – д-р мед. наук, профессор, заведующий ЦНИЛ ДВГМУ.

