

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.132

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

Боярская Н. В., Скорцану О. И., Докшин П. М., Успенский В. Е., Щербинин Т. С., Филиппов А. А., Пищугин А. С., Галяутдинов И. В., Малашичева А. Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Боярская Надежда Владимировна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: boyarskaya_nv@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 06.05.2024
и принята к печати 23.05.2024.

РЕЗЮМЕ

Во всем мире идет поиск терапевтического лечения кальцифицирующей болезни аортального клапана (аортального стеноза), лечение которой сейчас производится только с помощью хирургического вмешательства. Фундаментальные молекулярно-биологические исследования помогают в поиске антикальцифицирующей терапии, и нами ведутся исследования по поиску терапевтического лечения кальцификации аортального клапана. В данной работе представлено исследование флавоноидов, потенциальных веществ для антикальцифицирующей терапии.

Ключевые слова: антикальцифицирующая терапия, аортальный стеноз, ингибиторы кальцификации, кальцификация аортального клапана, сигнальный путь Notch.

Для цитирования: Боярская Н.В., Скорцану О.И., Докшин П.М. и др. Влияние флавоноидов на пролиферацию и остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток аортального клапана. Российский журнал персонализированной медицины. 2024;4(3):206-214. DOI: 10.18705/2782-3806-2024-4-3-206-214. EDN: KZPIGA

THE EFFECT OF FLAVONOIDS ON THE PROLIFERATION AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF INTERSTITIAL CELLS OF THE AORTIC VALVE

**Boyarskaya N. V., Skortsanu O. I., Dokshin P. M., Uspensky V. E.,
Shcherbinin T. S., Filippov A. A., Pishchugin A. S., Galyautdinov I. V.,
Malashicheva A. B.**

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized
Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Boyarskaya Nadezhda V.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: boyarskaya_nv@almazovcentre.ru

Received 06 May 2024; accepted 23 May
2024.

ABSTRACT

There is a worldwide search for therapeutic treatment of calcification aortic valve disease (aortic stenosis), which is currently being treated only with surgical intervention. Fundamental molecular biological research helps in the search for anticalcification therapy and we are conducting research to find a therapeutic treatment for aortic valve calcification. This paper presents a study of flavonoids, potential substances for anticalcification therapy.

Key words: anticalcification therapy, aortic stenosis, calcification inhibitors, calcification of the aortic valve, Notch signaling pathway.

For citation: Boyarskaya NV, Skortsanu OI, Dokshin PM, et al. The effect of flavonoids on the proliferation and osteogenic differentiation of interstitial cells of the aortic valve. Russian Journal for Personalized Medicine. 2024;4(3):206-214. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2024-4-3-206-214. EDN: KZPIGA

Список сокращений: ИК — интерстициальные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания занимают основное место в структуре заболеваемости в мире [1], а кальцификация сердца и сосудов является среди них достаточно распространенным состоянием. Кальцификации подвержен и аортальный клапан, что приводит к заболеванию аортальным стенозом (патологической кальцификации аортального клапана). Терапевтического лечения кальцификации на данный момент не существует, и лечение проводится только оперативным путем [2, 3].

Фундаментальные исследования процессов на клеточном и молекулярном уровнях приводят к лучшему пониманию молекулярных механизмов патологий и позволяют находить потенциальные мишени для будущего терапевтического лечения сердечно-сосудистых заболеваний и, в частности, аортального стеноза [4–8]. Сигнальный путь Notch вовлечен в управление развитием сердечно-сосудистой системы, в исследованиях показана его роль при патологических процессах в сердечно-сосудистой системе, в том числе в развитии патологической кальцификации аортального клапана [9–13]. Флавоноиды потенциально могут оказывать ингибирующее воздействие на сигнальный путь Notch [14]. Нами были проведены эксперименты с использованием культивируемых *in vitro* интерстициальных клеток аортального клапана человека (ИК) по оценке токсического и пролиферативного влияния флавоноидов. Также мы оценивали влияние флавоноидов на остеогенную дифференцировку. Интерстициальные клетки — это основные клетки, подверженные кальцификации в аорталь-

ном клапане [15], и они являются удобным модельным объектом для исследований.

МЕТОДЫ

В исследовании изучались 6 флавоноидов: пиностробин и его производные (табл. 1). Проводилась оценка влияния флавоноидов на пролиферативную активность ИК аортального клапана [1] и оценка токсического эффекта флавоноидов и влияния на остеогенную дифференцировку на эти же клетки [2].

1. Построение кривой роста клеток, обработанных 6 вариантами флавоноидов в трех типах концентраций: 5, 10, 30 мкл на 1 мл среды. Оценка пролиферативной активности проводилась на временных точках 48, 72, 96 часов.

2. Поиск смертельной дозы флавоноидов для клеток, оценка токсического эффекта в четырех типах концентраций: 5, 10, 30, 50 мкл вещества на 1 мл среды, и окраска ализариновым красным на 21-й день культивации в остеогенной среде для оценки количества кальциевых отложений.

Для исследований выбирались ИК аортального клапана с заданными характеристиками: от пациентов с трикуспидальным аортальным клапаном, болеющих аортальным стенозом, по патогистологическому исследованию без признаков эндокардита, ревматизма и без большой степени аортальной недостаточности. Клетки были выделены из тканей аортального клапана [16], полученных в Национальном медицинском исследовательском центре имени В. А. Алмазова, переданных после операций по протезированию аортального клапана. Забор операционного материала осуществлялся после подписания пациентами информированного согласия.

Клетки культивировались в обычной среде (83 % DMEM (Gibco, США), 15 % FBS (Gibco, США),

Таблица 1. Название флавоноидов и их номер в экспериментах

Table 1. Name of flavonoids and their number in experiments

Номер флавоноида в эксперименте и его название
№ 1 — пиностробин
№ 2 — оксим пиностробина
№ 3 — лактам пиностробина
№ 4 — пиностробин халкон
№ 5 — 20-гидроксиэкдизон
№ 6 — 2,5-диметоксикоричная кислота

Воздействие на ИК аортального клапана разными дозами флавоноидов

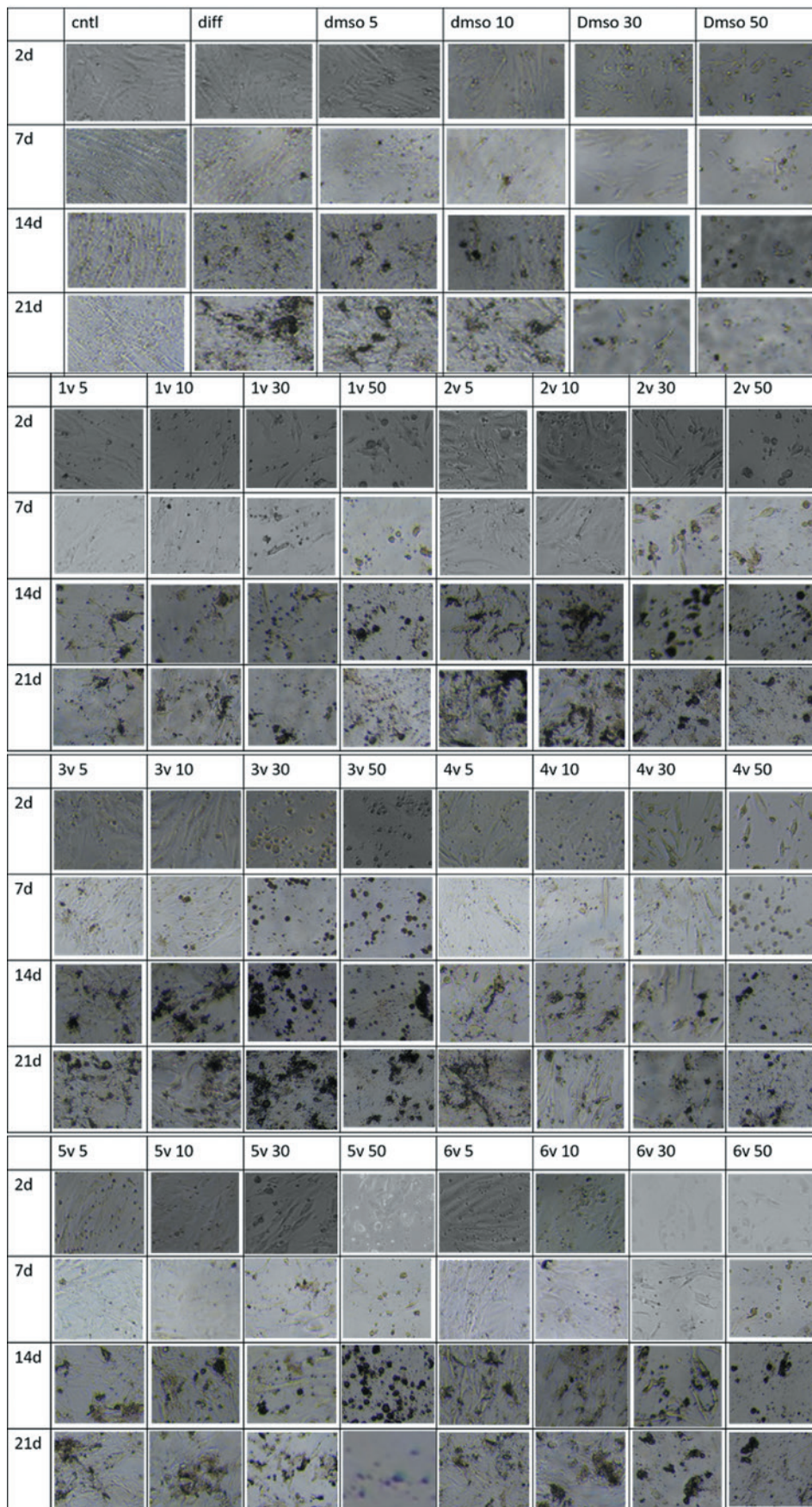


Рис. 1. Фотофиксация воздействия разных доз флавоноидов на интерстициальные клетки аортального клапана на четырех временных точках (2-й день, 7-й день, 14-й день, 21-й день с момента индукции остеодифференцировки)

Control — клетки без воздействий; diff — клетки, культивируемые в остеогенной среде; DMSO, 1v, 2v, 3v, 4v, 5v, 6v — клетки, культивируемые в остеогенной среде с добавлением перечисленных веществ в разной концентрации (5 мкл, 10 мкл, 30 мкл, 50 мкл — клетки погибли через 48–96 часов после воздействия веществ).

Figure 1. Photofixation of the effect of different doses of flavonoids on interstitial cells of the aortic valve at four time points (Day 2, day 7, day 14, day 21 from the moment of induction of osteodifferentiation)

Control cells without effects; diff cells cultured in an osteogenic medium; DMSO, 1v, 2v, 3v, 4v, 5v, 6v cells cultured in an osteogenic medium with the addition of the listed substances in different concentrations (5 μ l, 10 μ l, 30 μ l, 50 μ l — cells died after 48-96 hours after exposure to substances).

1 % пенициллин/стрептомицин (Invitrogene, США), 1 % L-глутамин (Invitrogene, США)), и для запуска остеогенной дифференцировки в остеогенной среде (88 % DMEM (Gibco, США), 10 % HyClone (Cytiva, США), 1 % пенициллин/стрептомицин (Invitrogene, США), 1 % L-глутамин (Invitrogene, США)) добавлялись факторы остеогенной дифференцировки: 0,1 мкл аскорбиновой кислоты, 0,1 мкл дексаметазона и 10 мкл β -глицеролфосфата (Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение смертельной дозы веществ

Эксперимент по оценке токсического эффекта флавоноидов проведен на ИК аортального клапана человека, отобранных по методике, указанной выше. Культивирование для контрольных клеток проводилось в обычной среде, для изучаемых клеток — в остеогенной среде с добавлением флавоноидов и DMSO (растворитель флавоноидов). Состояние клеток оценивалось на 2-й, 7-й, 14-й, 21-й дни после стартового воздействия. Использовались следующие концентрации: 5 мкл вещества на 1 мл среды, 10 мкл вещества на 1 мл среды, 30 мкл вещества на 1 мл среды, 50 мкл вещества на 1 мл среды.

На этапе 48 часов (2 дня) после воздействия клетки при концентрации 50 мкл веществ погибли, при концентрации 30 мкл снизилась пролиферация клеток, концентрации 5 мкл и 10 мкл не оказали заметного влияния на пролиферацию и фенотип клеток. На временной точке 7 и 14 дней концентрация 30 мкл все так же снижала пролиферацию клеток и приводила к их гибели, концентрации 5 мкл и 10 мкл не оказали заметного влияния на пролиферацию и фенотип клеток. На 21-й день концентрация 30 мкл привела к значительной, но не тотальной гибели клеток (рис. 1), концентрации 5 мкл и 10 мкл не оказали заметного влияния на пролиферацию и фенотип клеток. На 21-й день была проведена окраска клеток Ализариновым красным, фотофиксация и спектрофотометрический анализ окрашенных клеток. Окраска клеток при концентрациях 5 и 10 мкл находится на схожих уровнях интенсивности, однако окраска клеток при концентрации 30 мкл значительно ниже, что объясняется малым количеством выживших клеток, продуцирующих отложения кальция (рис. 2).

Оценка пролиферации клеток под воздействием флавоноидов

На ИК аортального клапана было проведено 6 экспериментов с 6 веществами, указанными в таблице 1. Клетки культивировались в обычной и остеогенной средах с добавлением разных кон-

центраций веществ: 5 мкл вещества на 1 мл среды, 10 мкл вещества на 1 мл среды, 30 мкл вещества на 1 мл среды, 50 мкл вещества на 1 мл среды. Подсчет клеток производился на временных точках 48, 72, 96 часов на камере Ньюбауэра. Данные вносились в таблицу Microsoft Excel и обрабатывались с помощью GraphPad Prism. Анализ показал значительное снижение (в 2–3 раза) пролиферации клеток при концентрации 30 мкл на 1 мл среды всех веществ, кроме пиностробина, на всех временных точках, но особенно к сроку 96 часов. Пролиферация клеток при внесении пиностробина снизилась меньше (~ в 1,5 раза), чем в остальных случаях, и была равномерной на всех временных точках (рис. 3).

ВЫВОДЫ

Наименьший токсический эффект на клетки произвел пиностробин в концентрациях 5 мкл и 10 мкл на 1 мл среды. И при фотофиксации, и при оценке пролиферации, клетки под его воздействием сохраняли стабильную жизнеспособность. Также при окраске на соединения кальция было показано некоторое снижение интенсивности окраски при культивировании клеток с концентрацией пиностробина 10 мкл на 1 мл среды. Остальные флавоноиды или обладали токсическим эффектом на клетки, или не влияли на отложение кальция. Таким образом, для дальнейших исследований наиболее перспективен пиностробин.

Флавоноиды — это ароматические аминокислоты, которые широко распространены в растениях. Они обладают широким спектром полезных для здоровья свойств, включая антибактериальные, противовирусные, противомикробные, противоопухолевые, антимуtagenные, противовоспалительные, противоаллергические, иммуномодулирующие, сосудорасширяющие и кардиопротекторные свойства. В настоящее время они считаются незаменимыми соединениями в здравоохранении, пищевой, фармацевтической, косметической и биотехнологической промышленности [17]. В настоящее время изучают их свойства в лечении онкологических заболеваний [18–20], кожных заболеваний [21], болезни Альцгеймера [22] и некоторых других [23]. Полученные нами данные указывают на то, что флавоноиды могут являться одной из мишеней для поиска терапии, препятствующей патологической кальцификации.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

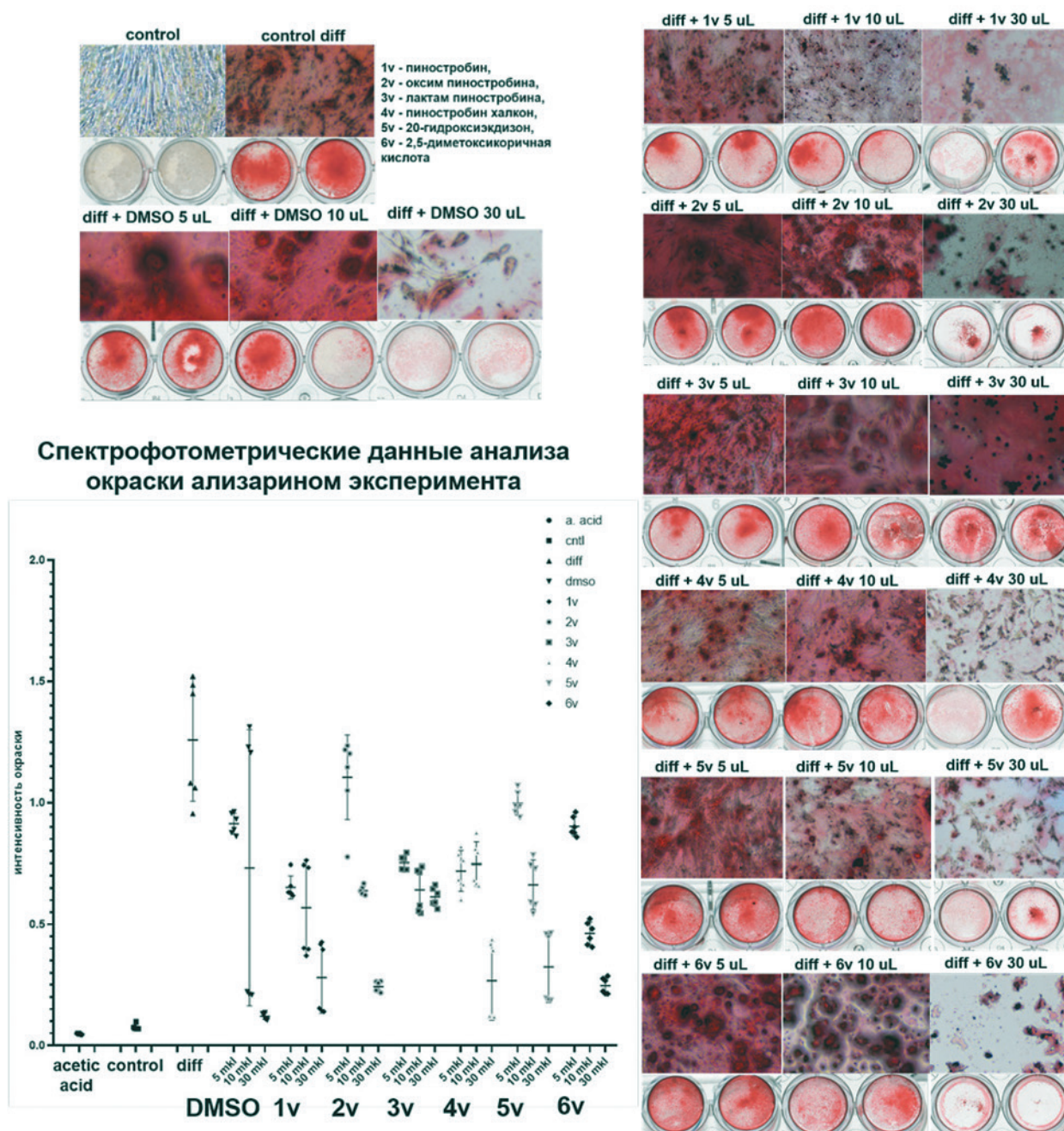


Рис. 2. Фотофиксация воздействия разных доз флавоноидов на интерстициальные клетки аортального клапана после окраски Ализариновым красным, спектрофотометрический анализ окраски Ализариновым красным клеток эксперимента

Control — клетки без воздействий; diff — клетки, культивируемые в остеогенной среде; DMSO, 1v, 2v, 3v, 4v, 5v, 6v — клетки, культивируемые в остеогенной среде с добавлением перечисленных веществ в разной концентрации (5 мкл, 10 мкл, 30 мкл, 50 мкл — клетки погибли через 48–96 часов после воздействия веществ, в окраске не участвовали).

Figure 2. Photofixation of the effect of different doses of flavonoids on interstitial cells of the aortic valve after Alizarin red staining, spectrophotometric analysis of Alizarin red staining of experimental cells

Control cells without effects; diff cells cultured in an osteogenic medium; DMSO, 1v, 2v, 3v, 4v, 5v, 6v cells cultured in an osteogenic medium with the addition of the listed substances in different concentrations (5 μ l, 10 μ l, 30 μ l, 50 μ l — cells died after 48–96 hours after exposure to substances, they did not participate in the coloring).

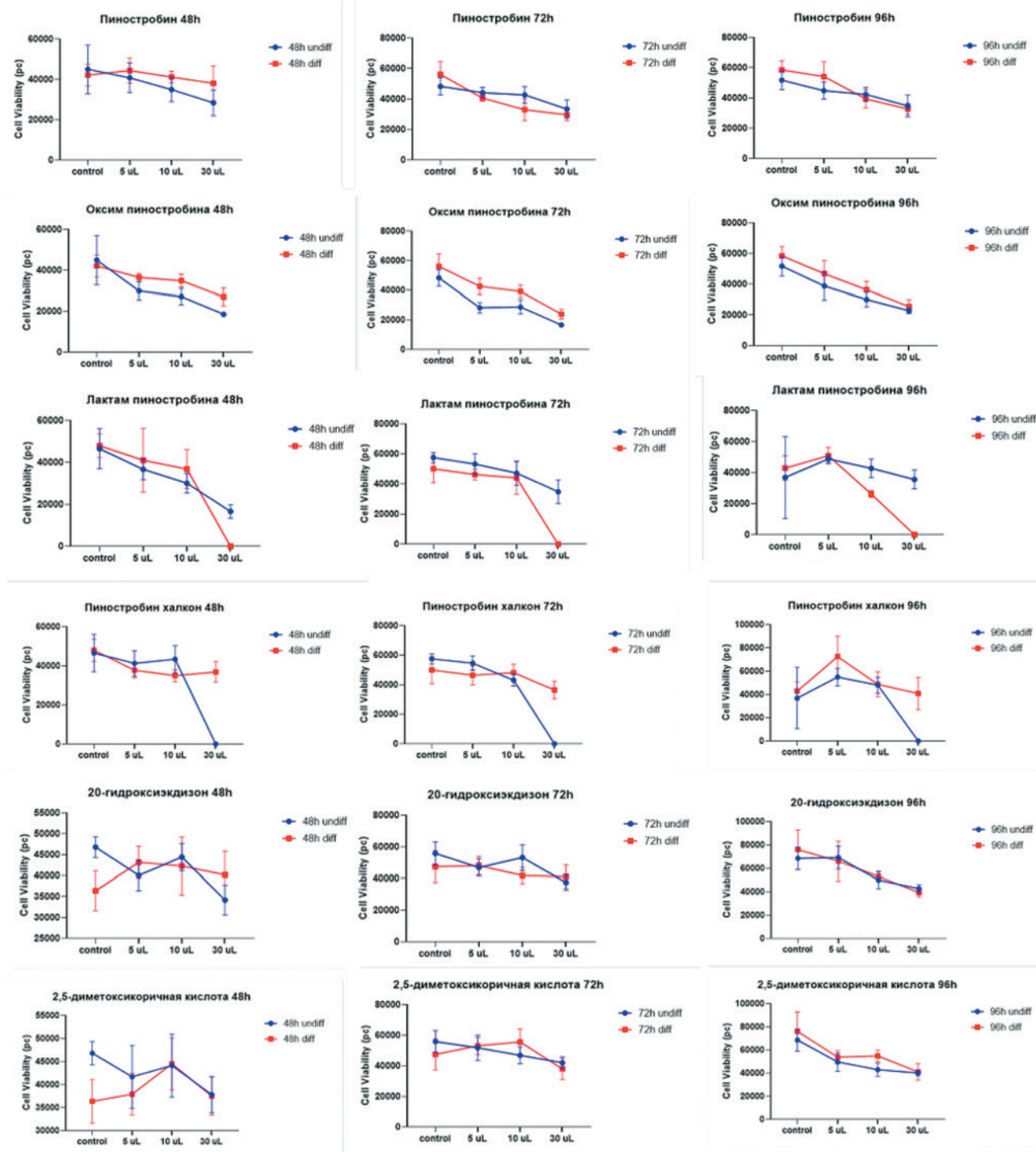


Рис. 3. Анализ жизнеспособности клеток в зависимости от внесенного вещества и его концентрации

Undiff — клетки, культивируемые в обычной среде (синие точки); diff — клетки, культивируемые в остеогенной среде (красные точки); control — клетки без воздействия флавоноидов; 5 uL, 10 uL, 30 uL — концентрация соответствующего флавоноида в мкл вещества на 1 мл среды.

Figure 3. Analysis of cell viability depending on the introduced substance and its concentration

Undiff cells cultured in a normal medium (blue dots); diff cells cultured in an osteogenic medium (red dots); control cells without exposure to flavonoids; 5 uL, 10 uL, 30 uL — concentration of the corresponding flavonoid in ml of substance per 1 ml of medium.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 26 Jan 2016;133(4):e38–360.
2. Kanwar A, Thaden JJ, Nkomo VT. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis. *Mayo Clin Proc*. Apr 2018;93(4):488–508.
3. Lee G, Chikwe J, Milojevic M, et al. ESC/EACTS vs. ACC/AHA guidelines for the management of severe aortic stenosis. *Eur Heart J*. 7 Mar 2023;44(10):796–812.
4. Kachanova O, Lobov A, Malashicheva A. The Role of the Notch Signaling Pathway in Recovery of Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci*. 19 Oct 2022;23(20):12509.
5. Kostina A, Bjork H, Ignatieva E, et al. Notch, BMP and WNT/ β -catenin network is impaired in endothelial cells of the patients with thoracic aortic aneurysm. *Atheroscler Suppl*. Sep 2018;35:e6–13.
6. Kostina A, Shishkova A, Ignatieva E, et al. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 2018;114:211–9.
7. Kozyrev I, Dokshin P, Kostina A, et al. Dysregulation of Notch signaling in cardiac mesenchymal cells of patients with tetralogy of Fallot. *Pediatr Res*. Jul 2020;88(1):38–47.
8. Malashicheva A, Kostina A, Kostareva A, et al. Notch signaling in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysms: A bridge between embryonic and adult states. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1 Mar 2020;1866(3):165631.
9. de Oliveira Sá MPB, Cavalcanti LRP, Perazzo ÁM, et al. Calcific Aortic Valve Stenosis and Atherosclerotic Calcification. *Curr Atheroscler Rep*. 7 Jan 2020;22(2):2.
10. Garg V. Notch Signaling in Aortic Valve Development and Disease. B: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H, editors. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology* [Интернет]. Tokyo: Springer; 2016 [цитируется по 27 февраль 2024 г.]. Доступно на: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500291/>
11. Irtyuga O, Malashicheva A, Zhiduleva E, et al. NOTCH1 Mutations in Aortic Stenosis: Association with Osteoprotegerin/RANK/RANKL. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6917907.
12. Lee A, Wei S, Schwertani A. A Notch more: Molecular players in bicuspid aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol*. Sep 2019;134:62–8.
13. Semenova D, Bogdanova M, Kostina A, et al. Dose-dependent mechanism of Notch action in promoting osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. Jan 2020;379(1):169–79.
14. Singh AK, Kumar S. Flavonoids as emerging notch signaling pathway modulators in cancer. *J Asian Nat Prod Res*. Dec 2023;25(12):1155–67.
15. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc*. 14 Sep 2017;6(9):e006339.
16. Boyarskaya NV, Shishkova AA, Saprankov VL, et al. Features of collecting biological material in the study of pathological calcification of the heart and blood vessels. *jour*. 13 Jul 2022;2(3):111–8.
17. Chiorcea-Paquim AM. Electrochemistry of Flavonoids: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. 27 Oct 2023;24(21):15667.
18. Gupta M, Ahmad J, Ahamad J, et al. Flavonoids as promising anticancer therapeutics: Contemporary research, nanoantioxidant potential, and future scope. *Phytother Res*. Nov 2023;37(11):5159–92.
19. Luiz-Ferreira A, Pacifico T, Cruz ÁC, et al. TRAIL-Sensitizing Effects of Flavonoids in Cancer. *Int J Mol Sci*. 22 Nov 2023;24(23):16596.
20. Hassani S, Maghsoudi H, Fattahi F, et al. Flavonoids nanostructures promising therapeutic efficiencies in colorectal cancer. *Int J Biol Macromol*. 30 Jun 2023;241:124508.
21. Ma EZ, Khachemoune A. Flavonoids and their therapeutic applications in skin diseases. *Arch Dermatol Res*. Apr 2023;315(3):321–31.
22. Kothawade SM, Buttar HS, Tuli HS, Kaur G. Therapeutic potential of flavonoids in the management of obesity-induced Alzheimer's disease: an overview of preclinical and clinical studies. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. Nov 2023;396(11):2813–30.
23. Chen S, Wang X, Cheng Y, et al. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules*. 25 Jun 2023;28(13):4982.

Информация об авторах:

Боярская Надежда Владимировна, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Скорцану Ольга Игоревна, лаборант-исследователь НИО аритмологии, НИЛ нейромодуляции, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Докшин Павел Михайлович, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Успенский Владимир Евгеньевич, д.м.н., заведующий НИЛ заболеваний аорты и аортального кла-

пана Института сердца и сосудов, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Щербинин Тимофей Сергеевич, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Филиппов Алексей Александрович, к.м.н., младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Пищугин Александр Сергеевич, врач по рентгенэндоваскулярным диагностике и лечению отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Галютдинов Ильгиз Васимович, помощник генерального директора ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России по сопровождению научных проектов;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., руководитель группы НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, НЦМУ «Центр персонализированной медицины».

Authors information:

Boyarskaya Nadejda V., junior researcher, Laboratory of diseases with excessive calcification, Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Skortsanu Olga I., laboratory assistant researcher, Neuromodulation Laboratory, Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Dokshin Pavel M., junior researcher, Laboratory of diseases with excessive calcification, Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Uspensky Vladimir E., D. of Sc., Head Laboratory of Aortic and Aortic Valve Diseases of the Institute of Heart and Blood Vessels, Almazov National Medical Research Centre;

Shcherbinin Timofey S., junior researcher, Laboratory of diseases with excessive calcification, Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Filippov Aleksey A., junior researcher, Laboratory of diseases with excessive calcification, Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Pishchugin Aleksander S., Laboratory of diseases with excessive calcification, Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Galyautdinov Ilgiz V., Assistant to the General Director of the Almazov National Medical Research Centre for the support of scientific projects;

Malashicheva Anna B., Leading scientist, D. of Sc., Laboratory of diseases with excessive calcification, Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine.