

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Демьяненко Е.В.¹

¹ГУ «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки», Луганск, e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua

В качестве альтернативной терапии различных заболеваний, в том числе и заболеваний почек, активно изучается возможность применения клеток с высоким пролиферативным потенциалом. Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга является перспективным методом клеточных технологий. В статье рассмотрены вопросы влияния мезенхимальных стволовых клеток на динамику свободнорадикальных процессов и состояние антиоксидантной системы в сыворотке крови и в ткани почек крыс при остром иммобилизационном стрессе. Исследование проведено с использованием 208 самцов нелинейных белых крыс массой 200–250 граммов. Эффективность клеточной терапии оценивали по динамике маркера перекисного окисления липидов – малонового диальдегида, - а также компонентов антиоксидантной защиты (восстановленного глутатиона, супероксиддисмутазы и каталазы) в сыворотке крови и в гомогенатах почек на протяжении 30 суток после моделирования стрессового состояния и применения корректоров. Опытным путем доказано, что при остром стрессе активизируются свободнорадикальные процессы и возникает оксидантный стресс, что подтверждается интенсификацией перекисного окисления липидов, а также угнетением активности как ферментативных, так и неферментных компонентов антиоксидантной системы. Применение аллогенных МСК при остром иммобилизационном стрессе способствовало более быстрому восстановлению показателей антиоксидантной системы в сыворотке крови и в почечной ткани крыс опытной группы по сравнению с контролем.

Ключевые слова: стресс, мезенхимальные стволовые клетки, антиоксидантная система, свободнорадикальные процессы.

EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE PARAMETERS OF PEROXIDATIVE OXIDATION OF LIPIDS AND ANTIOXIDANT PROTECTION OF BLOOD SERUM AND RENAL TISSUE OF RATS WITH ACUTE IMMOBILIZATION STRESS

Demianenko E.V.¹

¹State Institution "Lugansk State Medical University named after St. Luke", Lugansk, e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua

As an alternative therapy for various diseases, including kidney diseases, the possibility of using cells with high proliferative potential is being actively studied. The use of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) is a promising method of cellular technology. The article discusses the effects of mesenchymal stem cells on the dynamics of free radical processes and the state of the antioxidant system in the blood serum and in the kidney tissue of rats during acute immobilization stress. The study was conducted using 208 males of non-linear white rats weighing 200-250 grams. The effectiveness of cell therapy was assessed by the dynamics of the lipid peroxidation marker - malonic dialdehyde - as well as antioxidant protection components (reduced glutathione, superoxide dismutase and catalase) in blood serum and kidney homogenates for 30 days after modeling the stress state and using correctors. It has been experimentally proven that during acute stress free radical processes are activated and oxidative stress occurs, which is confirmed by the intensification of lipid peroxidation, as well as by the inhibition of the activity of both enzymatic and non-enzymatic components of the antioxidant system. The use of allogenic MSCs in acute immobilization stress contributed to a more rapid recovery of the antioxidant system in the serum and in the renal tissue of rats of the experimental group compared to the control.

Keywords: stress, mesenchymal stem cells, antioxidant system, free radical processes.

Стресс-реакция – важнейший универсальный защитно-приспособительный комплекс биохимических и физиологических процессов, направленный на мобилизацию сил организма

[1]. Известно, что при острой иммобилизации во внутренних органах нарушается микроциркуляция и возникает ишемия [2; 3]. Гипоксия почечной паренхимы является ведущим механизмом ее повреждения и одним из самых сложно корректируемых звеньев патологических процессов [3; 4]. В ответ на активацию свободнорадикальных процессов и изменение соотношения компонентов прооксидантно-антиоксидантной системы развивается оксидантный стресс [3-5]. Последний способствует активации нитрозергической системы и гиперпродукции монооксида азота [2; 6]. Именно интенсификация перекисного окисления липидов, цитотоксические и проапоптотические эффекты монооксида азота являются главными факторами, повреждающими структуры нефрона при стрессовом воздействии, что может привести к развитию нефропатий [4-7]. Ввиду того что почки являются важнейшими компонентами системы адаптации к действиям различных факторов, целесообразным является изучение состояния различных функциональных систем почечной ткани при острой иммобилизации для оценки адаптивных возможностей организма. На современном этапе развития медицинской науки клеточная терапия рассматривается как альтернативный метод лечения различных патологических состояний [8; 9]. При этом наиболее перспективными считаются костномозговые мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [10]. Однако биохимические механизмы подавления мезенхимальными стволовыми клетками окислительного стресса за счет изменения активности компонентов антиоксидантной защиты при экстремальном воздействии физических факторов до конца не выяснены.

Цель исследования: изучить влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на динамику содержания малонового диальдегида (МДА), как маркера перекисного окисления липидов, компонентов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы и восстановленного глутатиона) на фоне 24-часового острого иммобилизационного стресса.

Материал и методы исследования. Эксперимент выполнен с использованием 208 самцов беспородных белых крыс массой 225 ± 25 граммов. Костномозговые мезенхимальные стволовые клетки извлекали из полостей бедренных и большеберцовых костей половозрелых лабораторных крыс путем промывания их питательной средой «ИГЛА MEM» («Биолот», Россия). Полученные клетки культивировали 14 суток в питательной среде «ИГЛА-MEM» («Биолот», Россия), обогащенной L-глутамином, с добавлением 10% жидкой эмбриональной телячьей сыворотки и двух антибиотиков при 37 °С в условиях CO₂-инкубатора HF15UV (Neal Force, Китай) со сменой среды каждые 5 дней. Жизнеспособность клеток оценивали тестом с трипановым синим. Клеточную культуру фенотипировали непрямым иммунофлюоресцентным методом с помощью специфических маркеров к МСК: моноклональные антитела к CD 73, CD 105, CD 44, CD 90 и CD 54. В качестве модели

острого стресса применяли однократную иммобилизацию животных в течение 24 часов в индивидуальных фиксирующих камерах, исключающих возможность каких-либо активных движений. Животные были разделены на группы: № 1 – интактные крысы; № 2 – крысы, подвергнувшиеся действию острого иммобилизационного стресса (контроль), № 3 – крысы, получавшие МСК после иммобилизации (экспериментальная группа). Через 1 час после действия стрессора животным группы № 2 внутривенно вводили по 1 мл физиологического раствора, группы № 3 – по $5 \cdot 10^6$ МСК. Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 14, 21 и 30-е сутки наблюдения путем цервикальной дислокации спинного мозга в шейном отделе под легким эфирным наркозом. Производили забор крови для получения сыворотки. Выделяли почки, гомогенизировали их в сахарозной среде выделения. Активность перекисного окисления липидов в сыворотке крови и в гомогенатах почечной ткани оценивали по уровню малонового диальдегида, который определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра СФ-46 (длина волны 532 нм) после реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой в кислой среде. Состояние неферментного звена антиоксидантной системы оценивали по содержанию восстановленного глутатиона в сыворотке крови и в почечной ткани, уровни которого определяли реакцией Элмана с последующей спектрофотометрией при длине волны 400 нм. О состоянии ферментативного звена антиоксидантной защиты судили по изменению активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), которые определяли спектрофотометрически ($\lambda=410$ нм и $\lambda=347$ нм) с помощью реакции с солями молибдена и реакции аутоокисления адреналина. Статистическую обработку данных проводили пакетом программ Statistica 10.0. Для сравнения результатов между исследуемыми группами использовали критерий Манна-Уитни. Результаты расценивались как достоверные при $p < 0,05$. Данные представлялись в виде медианы и интерквартильного размаха.

Результаты исследования и их обсуждение. Опытным путем доказано, что показатели сыворотки крови и почечной ткани, характеризующие степень окислительного стресса, зависят от срока наблюдения в послестрессовом периоде и значительно изменяются под действием мезенхимальных стволовых клеток.

При анализе показателей малонового диальдегида было установлено его резкое повышение как в сыворотке крови, так и в почечной ткани животных, подвергнувшихся иммобилизационному стрессу (таблица).

Содержание малонового диальдегида в сыворотке крови и в почечной ткани после 24- часового иммобилизационного стресса и введения МСК

Группа животных	Срок наблюдения	МДА в сыворотке крови (мкмоль/л)	МДА в почечной ткани (нмоль/г ткани)
Интактная (n=28)	-	2,45 (1,96; 2,71)	14,85 (13,86; 15,55)
Контрольная (n=90)	1-е сутки	6,79 ** (6,41; 7,06)	33,578 ** (32,622; 34,631)
	3-и сутки	7,42 ** (6,85; 7,83)	46,95 ** (45,73; 48,11)
	7-е сутки	6,12 ** (5,72; 6,41)	37,51 ** (35,58; 38,88)
	14-е сутки	4,19 ** (3,67; 4,56)	26,319 ** (25,154; 27,215)
	21-е сутки	2,91 * (2,54; 3,15)	17,284 ** (15,476; 18,572)
	30-е сутки	2,45 (2,19; 2,64)	15,66 (14,05; 16,81)
Экспериментальная (n=90)	1-е сутки	6,85 ** (6,52; 7,11)	32,831 ** (30,823; 33,919)
	3-и сутки	7,24 ** (6,84; 7,59)	46,067 ** (44,462; 47,152)
	7-е сутки	4,81 **,### (4,61; 4,96)	31,085 **,### (29,282; 32,441)
	14-е сутки	2,91 *,### (2,53; 3,18)	19,19 **,### (18,19; 19,92)
	21-е сутки	2,5 # (2,2; 2,71)	15,664 # (14,237; 16,681)
	30-е сутки	2,39 (2,22; 2,51)	14,69 # (13,68; 15,41)

Примечание: n – количество наблюдений в группе;

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$ – относительно интактных значений;

- $p < 0,05$; ### - $p < 0,001$ – относительно контрольных значений.

Так, уровень малонового диальдегида в сыворотке крови в 1-е и 3-и сутки постиммобилизационного периода возрос в контрольной группе на 177,14% и 202,8% соответственно ($p < 0,001$), в экспериментальной группе – на 179,6% и 195,5% соответственно ($p < 0,001$) по сравнению с интактными значениями. В группе № 2 на 7-е сутки показатели МДА достоверно превышали интактные цифры на 149,8% ($p < 0,001$), на 14-е – на 71,02% ($p < 0,001$), на 21-е – на 18,7% ($p < 0,001$). У крыс, получавших в качестве терапии МСК, концентрация малонового диальдегида в сыворотке крови на 7, 14, 21 и 30-е сутки наблюдения была ниже контрольных показателей соответственно на 21,4% ($p < 0,001$), 30,5% ($p < 0,001$), 14,09% ($p < 0,001$) и 2,45% ($p < 0,05$).

В гомогенатах почечной ткани также отмечалось достоверное повышение уровня МДА относительно начальных значений на 1-е и 3-и сутки наблюдения в контрольной группе на 126,1% ($p < 0,001$) и 216,16% соответственно ($p < 0,001$), в экспериментальной группе – на 121,08% ($p < 0,001$) и 210,2% ($p < 0,001$) соответственно. В последующие сутки наблюдения у крыс группы контроля наблюдалось постепенное снижение цифр

исследуемого показателя, однако на 7-е сутки они были достоверно выше интактных значений на 152,6% ($p < 0,001$), на 14-е – на 77,23% ($p < 0,001$), на 21-е – на 16,4% ($p < 0,001$). К концу периода наблюдения содержание малонового диальдегида статистически не отличалось от показателей интактных животных. У крыс, получавших клеточную терапию, концентрация МДА на 7, 14, 21 и 30-е сутки достоверно снизилась по сравнению с показателями группы контроля на 17,13% ($p < 0,001$), 27,08% ($p < 0,001$), 9,4% и 6,2% ($p < 0,05$) соответственно. Полученные результаты могут быть обусловлены активизацией свободнорадикальных процессов в ответ на гипоксию при иммобилизационном стрессе [2; 3; 5].

При изучении динамики восстановленного глутатиона в сыворотке крови крыс были получены следующие результаты: на 1-е и 3-и сутки наблюдения его значения снизились относительно интактных цифр как в контрольной (на 29,3% и 54,5%, $p < 0,001$), так и в опытной (на 30,4% и 46,7%, $p < 0,001$) группах. В группе № 2 данный показатель был достоверно меньше интактных значений на 7-е сутки на 43,4%, на 14-е сутки – на 26,1%, на 21-е сутки – на 11,9% ($p < 0,001$). В группе № 3 отмечалось статистически значимое повышение уровня восстановленного глутатиона относительно контроля, однако его значения были достоверно ниже интактных цифр ($p < 0,001$).

Что касается показателей восстановленного глутатиона в почечной ткани, то на 1-е и 3-и сутки исследования его уровень значительно снизился относительно интактных значений как во второй (на 35% и 53% соответственно, $p < 0,001$), так и в третьей (на 35% и 51,3% соответственно, $p < 0,001$) группах. В контрольной группе цифры восстановленного глутатиона были ниже интактных значений на 7, 14, 21 и 30-е сутки наблюдения соответственно на 46,4% ($p < 0,001$), 37,6% ($p < 0,001$), 20% ($p < 0,001$) и 9,38% ($p < 0,05$). У крыс, леченных МСК, отмечалось статистически значимое повышение уровня восстановленного глутатиона относительно контроля, однако его значения были достоверно ниже интактных цифр. Так, на 7-е сутки наблюдения исследуемый показатель у экспериментальных животных был достоверно ниже интактных значений на 35% ($p < 0,001$), но был выше цифр группы контроля на 19,3% ($p < 0,05$). На 14-е и 21-е сутки наблюдения его уровень у крыс опытной группы снизился на 22% ($p < 0,001$) и 8,14% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с показателями интактной группы, но превышал контрольные значения на 24,9% ($p < 0,01$) и 15,2% ($p < 0,01$). К концу исследования не было статистической разницы между показателями восстановленного глутатиона в почечной ткани крыс всех исследуемых групп. Полученные результаты могут указывать на интенсивное расходование данного вещества в реакциях конъюгации с продуктами свободнорадикальных процессов, резко активизирующихся при

стрессе. Динамика уровня восстановленного глутатиона в сыворотке крови и в почечной ткани после 24-часовой иммобилизации и введения МСК показана на рисунке 1.

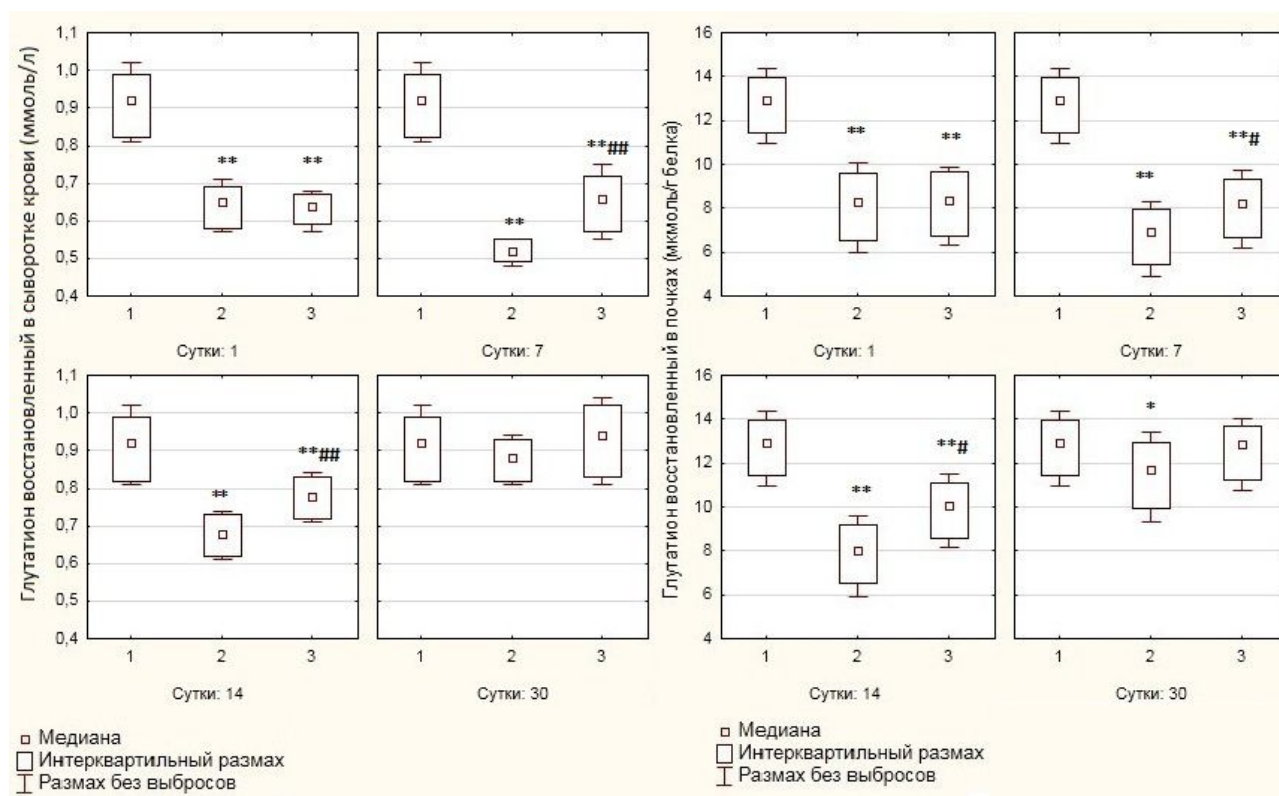


Рис. 1. Динамика уровня восстановленного глутатиона в сыворотке крови и в почечной ткани после 24-часовой иммобилизации и введения МСК

Примечание:

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$ – относительно интактных значений;

- $p < 0,05$; ## - $p < 0,001$ – относительно контрольных значений.

Показатели ферментативного звена антиоксидантной системы также существенно снизились как в сыворотке крови, так и в почечной ткани в ответ на 24-часовой иммобилизационный стресс. В сыворотке крови уровни активности каталазы и супероксиддисмутазы у животных контрольной группы снизились по сравнению с интактными значениями в 1-е сутки наблюдения на 21,4% и 28% соответственно ($p < 0,001$), на 3-и сутки – на 36,4% и 55% соответственно ($p < 0,001$), на 7-е сутки – на 33,5% и 45,6% соответственно ($p < 0,001$), на 14-е сутки – на 26,7% и 33,3% соответственно ($p < 0,001$), на 21-е сутки – 16% и 22,5% соответственно ($p < 0,001$). У крыс, леченных МСК, показатели активности каталазы и СОД достоверно превышали контрольные значения на 7, 14, 21 и 30-е сутки мониторинга соответственно на 9,8% ($p < 0,001$) и 20% ($p < 0,001$), 25,4% ($p < 0,001$) и 21,7% ($p < 0,001$), 16,9% ($p < 0,001$) и 20,5% ($p < 0,001$), 8,3% ($p < 0,001$) и 13,6% ($p < 0,05$).

Изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови после 24-часового иммобилизационного стресса и введения МСК показаны на рисунке 2.

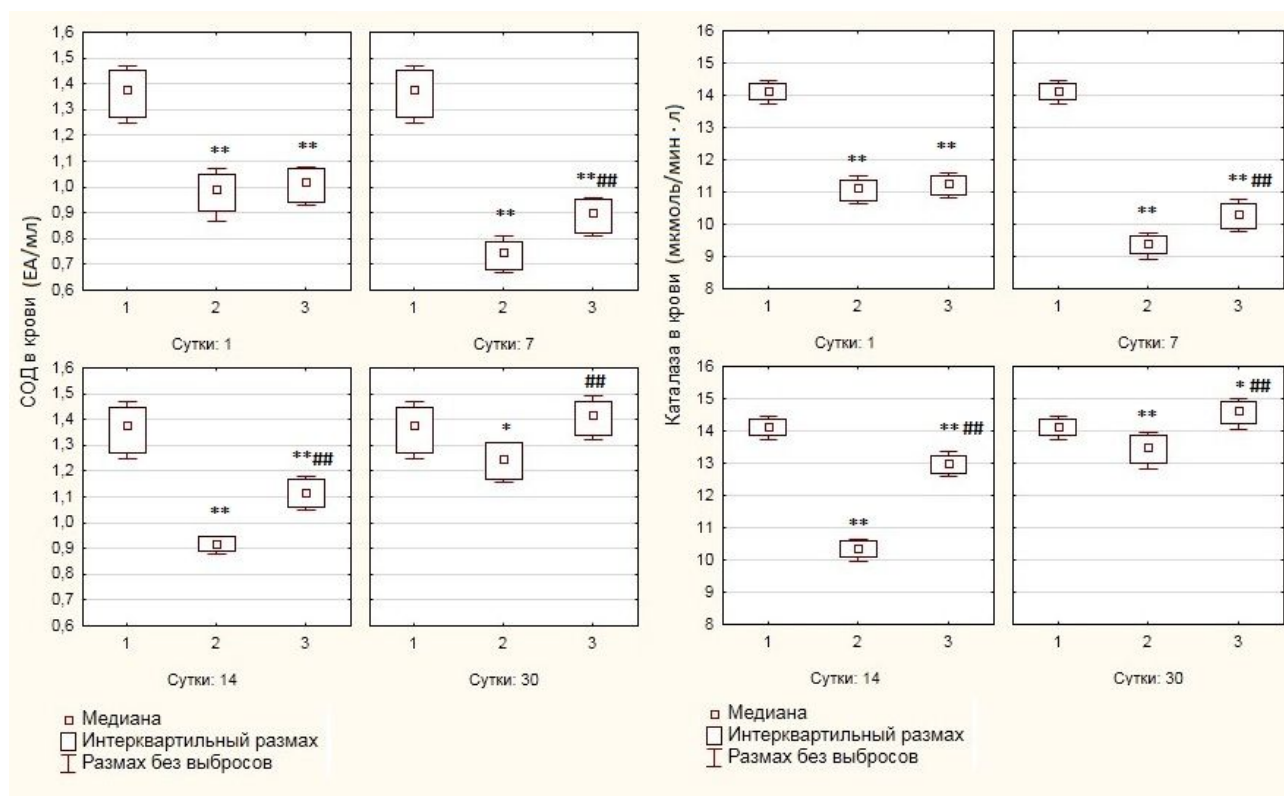


Рис. 2. Изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови после 24-часового иммобилизационного стресса и введения МСК

Примечание:

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$ – относительно интактных значений;

- $p < 0,05$; ## - $p < 0,001$ – относительно контрольных значений.

Исследованием установлено, что уровни активности СОД и каталазы в гомогенатах почечной ткани после 24-часовой иммобилизации в группе контроля в 1-е сутки снизились по сравнению с интактными значениями на 27% ($p < 0,001$) и 46,2% ($p < 0,001$) соответственно, на 3-и сутки – на 49,7% ($p < 0,001$) и 58,3% ($p < 0,001$) соответственно, на 7-е сутки – на 41,6% ($p < 0,001$) и 43,9% ($p < 0,001$) соответственно, на 14-е сутки – на 18,3% ($p < 0,001$) и 32,6% ($p < 0,001$) соответственно, на 21-е сутки – на 9,8% ($p < 0,01$) и 14,8% ($p < 0,001$) соответственно. К 30-м суткам наблюдения показатели активности каталазы и супероксиддисмутазы в контрольной группе статистически не отличались от интактных значений. У животных, получавших клеточную терапию, показатели активности каталазы достоверно превышали значения группы контроля на 7, 14, 21 и 30-е сутки соответственно на 15,6% ($p < 0,001$), 14 26,3% ($p < 0,001$), 22,8% ($p < 0,001$) и 6,64% ($p < 0,001$). Значения активности СОД у животных опытной группы на 7, 14, 21 и 30-е сутки наблюдения возросли относительно контрольных

на 29,9% ($p < 0,001$), 6,4% ($p < 0,05$), 7,3% ($p < 0,001$) и 8,2% ($p < 0,01$) соответственно. Изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы в почечной ткани после 24-часового иммобилизационного стресса и введения МСК показаны на рисунке 3.

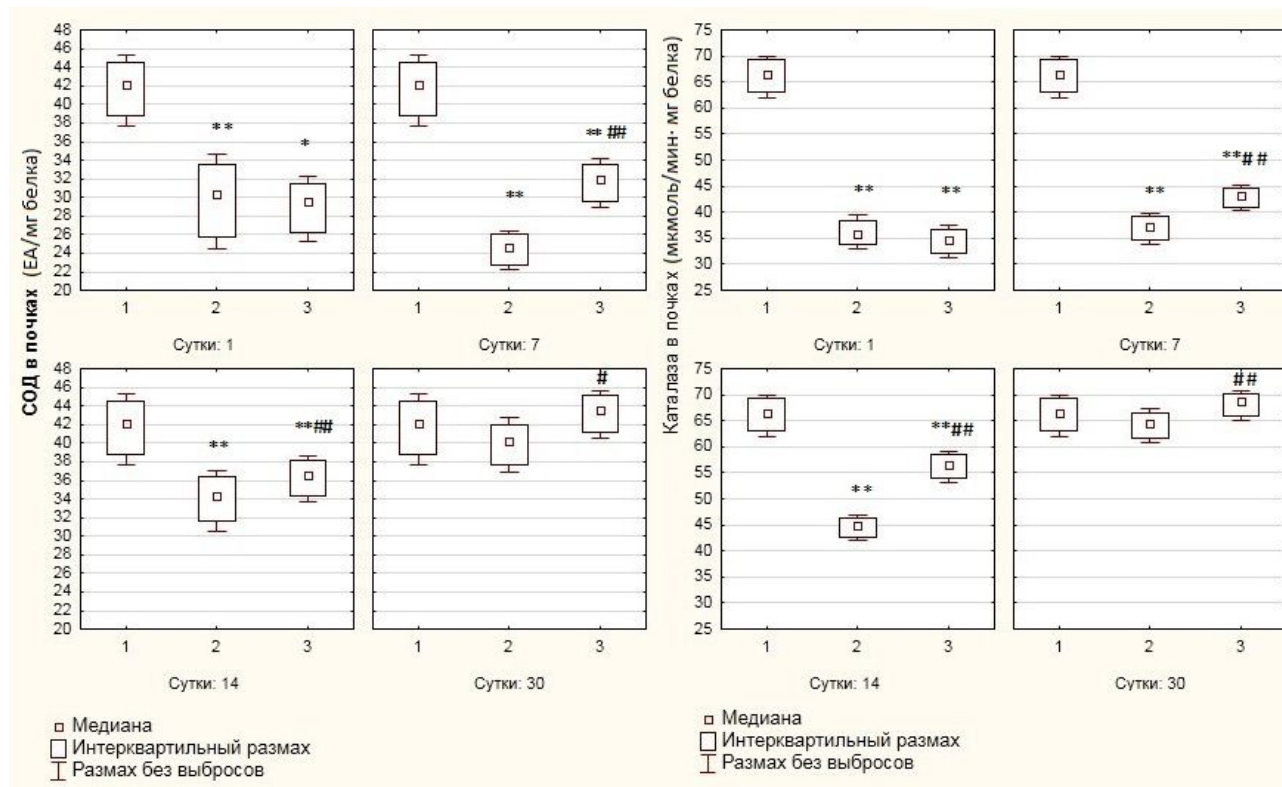


Рис. 3. Изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы в почечной ткани после 24-часового иммобилизационного стресса и введения МСК

Примечание:

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$ – относительно интактной группы;

- $p < 0,05$; ## - $p < 0,001$ – относительно группы контроля.

Полученные результаты свидетельствуют о значительном угнетении системы антиоксидантной защиты сыворотки крови и паренхимы почек в условиях острого стресса, что подтверждается снижением активности каталазы и СОД. Более быстрые темпы восстановления исследуемых показателей могут указывать на подавление мезенхимальными стволовыми клетками процессов перекисного окисления липидов и повышение антиоксидантных свойств клеток [8-10].

Выводы. Острая иммобилизация приводит к интенсификации перекисного окисления липидов, угнетению активности как ферментативных, так и неферментных компонентов антиоксидантной системы, о чем свидетельствуют повышение концентрации малонового диальдегида, снижение уровня восстановленного глутатиона, угнетение активности супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови и в ткани почек. Применение

аллогенных МСК в качестве средства коррекции при острой иммобилизации способствует более быстрому восстановлению показателей антиоксидантной системы, а, следовательно, функционального состояния почек опытных крыс по сравнению с контролем. Полученные данные указывают на целесообразность дальнейших экспериментальных исследований применения клеточной терапии с целью активации процессов регенерации органов и тканей при состояниях, в патогенезе которых лежат явления гипоксии.

Список литературы

1. Кузьменко Е.В. Современные представления о проявлениях механизмов психоэмоционального стресса // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2013. Т.26 (65). № 2. С.95–106.
2. Хужахметова Л.К., Теплый Д.Л. Особенности свободнорадикальных процессов при иммобилизационном стрессе у крыс в онтогенезе // Естественные науки. Физиология. 2016. № 4 (57). С.72–78.
3. Бугаева В.Ф., Киричук А.Н., Иванов И.О. Влияние электромагнитного излучения терагерцового диапазона частотой молекулярного спектра оксида азота 150+0,75 гГц на морфофункциональные нарушения микроциркуляции у белых крыс в состоянии острого и длительного стресса // Саратовский научно-медицинский журнал. 2009. Т.5, № 4. С.511–516.
4. Souza D.B., Silva D., Silva C.M.C., Sampaio F.J.B., Costa W.S., Cortez C.M. Effects of Immobilization Stress on Kidneys of Wistar Male Rats: A Morphometrical and Stereological Analysis. *Kidney Blood Press Res.* 2011. 34. P.424–429. DOI: 10.1159/000328331.
5. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. Нарушение обменных процессов в печени крыс под действием стресса // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 2. С.67–70.
6. Марков Х.М. Окись азота в физиологии и патологии почек // Вестник российской академии медицинских наук. 1996. № 7. С.73–78.
7. Тягушева Ф.А., Зубина И.М., Митрофанова О.В. Оксидативный стресс и хроническая болезнь почек // Нефрология. 2007. Т.11. № 3. С.29–47.
8. Кирпатовский В.И. Возможности клеточной терапии в восстановлении нарушенной функции органов мочеполовой системы // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2016. № 1 (56). С.60–67.
9. Момыналиев К.Т., Огай В.Б., Хорошун Е.В., Бабенко Н.Н., Каабак М.М. Клеточные технологии в трансплантации почки // Нефрология и диализ. 2014. Т. 16. №. 4. С.439–452.

10. Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016. 7. P. 125. DOI: 10.1186/s13287-016-0363-7.