

УДК 612.461.23.01: 611-013.11)-092.9

*І.О. Комаревцева, А.А. Чеботарьова, Т.П. Яковлева, О.А. Журба, Ю.В. Кравцова,
К.В. Комаревцева, Р.П. Морару-Бурлеску*

ВПЛИВ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН, КУЛЬТИВОВАНИХ В АПОПТОЗ-ІНДУКОВАНОМУ ОТОЧЕННІ НА АКТИВНІСТЬ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В ІШЕМІЧНІЙ ТКАНИНІ

ДЗ «Луганський державний медичний університет», м. Рубіжне

Резюме. У статті наводяться дані визначення вмісту вільного метаболіту оксиду азоту в нирковій тканині лабораторних щурів, яким моделювали експериментальну гостру ниркову недостатність, і зміни концентрації цього метаболіту на тлі внутрішньовенного уведення тваринам культури мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптоз-індукованому оточенні. Це оточення моделювалося шляхом додавання до

стандартного культурального середовища гомогенату попередньо ішемізованої ниркової тканини тварин. Отримані дані свідчать про зростання рівня метаболіту оксиду азоту при формуванні патологічного процесу та його різке зменшення при уведенні тваринам мезенхімальних стовбурових клітин.

Ключові слова: оксид азоту, гостра ниркова недостатність, апоптоз, мезенхімальні стовбурові клітини.

Вступ. Оксид азоту (NO) є одним з універсальних регуляторів метаболічних процесів, які постійно відбуваються в клітинах живого організму. Він синтезується з L-аргініну за допомогою сімейства ферментів NO-синтаз у ендотеліоцитах, епітеліоцитах, міоцитах, фібробластах, гепатоцитах та інших клітинах організму і контролює в них різноманітні біохімічні процеси [2]. За фізіологічних умов оксид азоту проявляє функції реалізації механізмів клітинного захисту, має протимікробну і нейромедіаторну активність, регулює артеріальний тиск, за допомогою вазодилатаційної активності [4, 8]. Окрім цього, високі концентрації NO можуть мати цитотоксичну дію на клітини організму, діяти як ендогенний інгібітор захисних систем організму [3, 11]. У відповідь на дію патологічного агента в клітині може запускатися процес запрограмованої загибелі – апоптозу. Оксид азоту є промотором апоптозу в одних клітинах та інгібітором його в інших [5]. Встановлено, що NO відіграє значну роль у механізмах ураження і репарації клітин при ішемії. Наявні дані про активацію NO-синтаз у клітинах різних органів при гострій та хронічній гіпоксії, що свідчить про роль оксиду азоту в процесах адаптації [1].

Питання пошуків нових методів корекції ішемічних уражень різних органів, у том числі нирок, є вкрай актуальними в останній час. Це зумовлене зростанням частоти випадків цієї патології і швидким розвитком ускладнень у вигляді поліорганних порушень [7]. Активно розроблюється напрямок застосування клітинної терапії в лікуванні гострих ішемічних уражень нирок, з доведеними позитивними ефектами щодо стимуляції ангиогенезу в ушкодженій нирковій тканині [9] і припускається безпосередня участь у цьому оксиду азоту [10].

Мета дослідження. Визначити вплив застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), культивованих в апоптоз-індукованому оточенні на рівень активності системи оксиду

азоту, як маркера апоптотичного процесу, у нирковій тканині на тлі моделювання експериментальної гострої ниркової недостатності (ГНН).

Матеріал і методи. Дослідження проводили на самцях лабораторних щурів-альбіносів віком 14-16 тижнів і масою тіла 200±50 грамів, з дотриманням основних положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.), Директиви ЄС № 609 (від 24.11.1986 р.) і Наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.

Експериментальну гостру ниркову недостатність моделювали шляхом 30 – хвилинного двобічного перетиснення обох ниркових ніжок. Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з кісткового мозку великогомілкової та стегнової кісток здорових щурів і культивували впродовж 12 діб двома способами. Одну порцію клітин – у стандартних умовах – на живильному середовищі ІГЛА-МЕМ із додаванням антибіотики, 10 % телючої сироватки і L-глютаміну. Іншу порцію клітин культивували в апоптоз-індукованому оточенні, яке досягалося шляхом додавання до означеного стандартного середовища гомогенату ниркової тканини щурів, які перенесли експериментальну ГНН за три доби до дослідження. Уводили мезенхімальні стовбурові клітини, по годині після операції експериментальної ГНН, у хвостову вену. Усі тварини були розподілені на чотири групи. I група – інтактні тварини, II група – тварини, яким моделювали експериментальну ГНН, але не вводили МСК, III група – тварини, яким після моделювання гострої ниркової недостатності вводили внутрішньовенно мезенхімальні стовбурові клітини, культивовані в стандартному середовищі, і IV група – тварини, яким після ГНН вводили апоптоз-індуковані МСК. Дослі-

дження активності системи оксиду азоту проводили по вимірюванню в нирковій тканині тварин рівня вільного метаболіту NO – нітрит-аніона (NO₂) на 3, 7, 14-ту добу після моделювання ГНН. Концентрацію нітрит-аніона визначали спектрофотометрично за допомогою реактиву Грисса [6]. Отримані дані були оброблені статистично за допомогою t-критерію Стьюдента. Зміни вважалися статистично достовірними при $p < 0,05$. Статистичні розрахунки виконувалися за допомогою електронної платформи Statistica 6,0.

Результати дослідження та їх обговорення.

Нами встановлено, що моделювання гострої ниркової недостатності призводить до різкого підвищення концентрації вільного метаболіту оксиду азоту в нирковій тканині. Так, на 3-тю добу, з моменту операції, рівень нітрит-аніона в нирковій тканині тварин II групи перевищував показники, отримані в групі інтактних тварин у 6 разів. На 7-му добу після операції вміст NO₂ дещо знижувався щодо 3-ї доби спостереження (на 43,75 %), але, як і раніше, значно перевищував показники інтактною групою – у 3,38 рази. На 14-ту добу дослідження показники концентрації нітрит-аніона знову дещо підвищувалися, складаючи майже 0,04 ммоль/мг білка, що було на 25% нижче показників 3-ї доби, на 33,34% перевищувало показники 7-ї доби і було в 4,5 рази вище концентрації даного метаболіту в інтактній групі спостереження.

Після уведення суспензії мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих у стандартних умовах у хвостову вену лабораторних шурів, які перенесли експериментальну гостру ниркову недостатність, нами отримані наступні результати. Концентрація нітрит-аніона в нирковій тканині лабораторних тварин III групи на 3-тю добу від початку експерименту була нижче показників, отриманих у II групі на 29,16 %. Однак даний результат був достовірно вищий ($p < 0,05$) показників інтактною групою в 4,25 рази. Після семи діб із моменту формування експериментальної гострої ниркової недостатності, на тлі уведення МСК, рівень вільного метаболіту оксиду азоту знижував-

ся, порівняно з третьою добою спостереження, на 26,47 %, також був нижчим даних показників відповідних строків спостереження в II групі на 7,4 %, але перевищував результати, отримані в інтактних тварин у 3,13 рази. Результат, який ми отримали на 14-ту добу спостереження, був нижче показників, отриманих у даній групі спостереження на 3-тю та 7-му добу на 35,29 % і 14,19 % відповідно. У порівнянні з показниками інтактних тварин цей показник був вище таких у 2,75 рази.

На тлі уведення лабораторним тваринам суспензії мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптоз-індукованих умовах, отримані дані відрізнялися від попередніх. Так, на 3-тю добу експерименту рівень вільного метаболіту оксиду азоту становив у дослідній групі $0,098 \pm 0,001$ ммоль/мг білка, що було значно вище всіх попередніх показників. Він перевищував результати, отримані на відповідні строки спостереження в II групі в 2,04 рази. Показники трьох діб спостереження в III групі були нижче отриманих результатів у 2,88 рази, а порівняно з інтактною групою рівень даного метаболіту підвищився в IV групі тварин в 12,25 рази. До 7-ї доби експерименту спостерігалось різке зниження концентрації в нирковій тканині тварин IV групи NO₂. Так вона була нижче показників 3-ї доби спостереження в цій групі в 5,16 рази і нижче результатів, отриманих на цей термін спостереження в II та III групах на 29,63 % і 24 % відповідно ($p < 0,05$). Однак рівень нітрит-аніона, виявлений у даних лабораторних тварин, все ж перевищував показники інтактною групою у 2,38 рази. Результати вмісту нітрит-аніона, отримані нами на 14-ту добу спостереження, наближалися до показників інтактною групою і перевищували їх всього в 1,5 рази. Вони були нижче концентрації NO₂, яка була отримана на 3-тю добу експерименту в тій же групі спостереження у 8,16 рази і на 7-му добу в 5,16 рази. У порівнянні ж з результатами 14-ї доби експерименту в II та III групах показник був нижче в 3 і 1,83 рази відповідно (табл. 1).

Підвищення концентрації вільного метаболіту оксиду азоту в нирковій тканині шурів, які

Таблиця 1

Рівень вмісту нітрит-аніона в нирковій тканині на тлі експериментальної гострої ниркової недостатності після уведення мезенхімальних стовбурових клітин

Групи тварин/доба експерименту	3-тя доба експерименту	7-ма доба експерименту	14-та доба експерименту
Інтактні тварини (I група) n=32	$0,008 \pm 0,001$ ммоль/мг білка	$0,008 \pm 0,001$ ммоль/мг білка	$0,008 \pm 0,001$ ммоль/мг білка
ГНН (II група) n=36	$0,048 \pm 0,003$ ммоль/мг білка*	$0,027 \pm 0,004$ ммоль/мг білка*	$0,036 \pm 0,002$ ммоль/мг білка *
ГНН + класичні МСК (III група) n=30	$0,034 \pm 0,002$ ммоль/мг білка*^	$0,025 \pm 0,004$ ммоль/мг білка*^	$0,022 \pm 0,003$ ммоль/мг білка*^
ГНН + апоптоз-індуковані МСК (IV група) n=33	$0,098 \pm 0,006$ ммоль/мг білка*^	$0,019 \pm 0,003$ ммоль/мг білка*^	$0,012 \pm 0,002$ ммоль/мг білка*^

Примітка. 1. * – достовірність змін щодо інтактною групою, 2. ^ – достовірність змін щодо II групи, 3. ^ – достовірність змін, щодо III групи (*^ – $p < 0,05$)

перенесли гостру ниркову недостатність, швидше за все може свідчити про проапоптотичні ефекти високих концентрацій NO₂, рівень якого підвищується у відповідь на ішемію ниркової тканини. Уведення ж мезенхімальних стовбурових клітин, особливо культивованих в апоптоз-індукованих умовах, має, навпаки, антиапоптотичний ефект, знижуючи концентрацію нітрит-аніона, що продукується. Тимчасове підвищення концентрації нітрит-аніона на 3-тю добу на тлі введення апоптоз-індукованих МСК, ймовірно свідчить про минулу різку активацію апоптозу, необхідного для скорішого видалення з організму уражених, нежиттєздатних ниркових клітин. Подальше ж різке зниження рівня даного метаболіту свідчить на користь зниження впливу апоптотичних механізмів, що може бути пов'язано з активацією адаптаційних здібностей тканини під впливом даних МСК, культивованих в апоптоз-індукованому оточенні.

Висновки

1. Формування експериментального патологічного процесу призводить до підвищення вмісту в нирковій тканині вільного метаболіту оксиду азоту.

2. Застосування мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптоз-індукованих умовах, знижує рівень нітрит-аніона, що є найбільш явним на 14-ту добу після введення клітин.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні механізму дії апоптоз-індукованого оточення на активність мезенхімальних стовбурових клітин та можливість використання цього у клініці.

Література

1. Бриндак Д.В. Содержание нитрит-анионов и состояние системы антиоксидантной защиты при введении мезенхимальных стволовых клеток на фоне экспериментальной острой почечной недостаточности / Д.В. Бриндак, Д.А. Фильчуков // Укр. мед. альманах. – 2012. – Т. 15, № 6. – С. 30-32.

2. Влияние различных концентраций оксида азота (NO) на интенсивность процессов липопероксидации в плазме крови in vitro / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин [и др.] // Мед. альманах. – 2013. – № 3 (27). – С. 76-77.
3. Кузнецова В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия / В.Л. Кузнецова, А.Г.Соловьева // Современ. пробл. науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 462.
4. Мартусевич А.К. Молекулярная стереотипия в реализации эффекта некоторых лечебных физико-химических факторов: роль NO / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – № 2 (3). – С. 205-210.
5. Регуляция апоптоза клеток с использованием газовых транмиттеров (оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода) / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова [и др.] // Вестн. науки Сибири. – 2011. – № 1 (1). – С. 635-640.
6. Уровень оксида азота в тканях, сыворотке крови, мононуклеарных и мезенхимальных стволовых клетках / И.А. Комаревцева, Е.А. Орлова, М.В. Тарасова [и др.] // Укр. ж. клін. та лаб. мед. – 2009. – Т. 4, № 4. – С. 134-137.
7. Хорошилов С.Е. Возможности медикаментозной нефропротекции и профилактики острой почечной недостаточности / С.Е. Хорошилов, А.В. Никулин // Бук. мед. вісник. – 2012. – Т. 16, № 3 (2). – С. 31-35.
8. Шумилова Т.Е. Роль неорганического нитрита и оксида азота в функционировании сердечно-сосудистой системы / Т.Е Шумилова, А.Д. Ноздрачев, М.А. Федорова // Рос. физиол. ж. им. И.М.Сеченова. – 2014. – Т. 100, № 3. – С. 301-315.
9. Fetal kidney stem cells ameliorate cisplatin induced acute renal failure and promote renal angiogenesis / A.K. Gupta, S.H. Jadhav, N.K. Tripathy, S. Nityanand // World. J. Stem. Cells. – 2015. – № 7 (4). – P. 776-788.
10. In search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury / D.C. Almeida, C. Donizetti-Oliveira, P. Barbosa-Costa [et al.] // Clin. Biochem. Rev. – 2013. – № 34 (3). – P. 131-144.
11. The role of nitric oxide on endothelial function / D. Tousoulis, A.M. Kampoli, C. Tentolouris [et al.] // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2012. – № 10 (1). – P. 4-18.

ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В АПОПТОЗ-ИНДУЦИРОВАННОМ ОКРУЖЕНИИ НА АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В ИШЕМИЧЕСКОЙ ТКАНИ

*И.А. Комаревцева, А.А. Чеботарева, Т.П. Яковлева, А.А. Журба,
Ю.В. Крайцова, Е.В. Комаревцева, Р.П. Морару-Бурлеску*

Резюме. В статье приводятся данные определения содержания свободного метаболита оксида азота в почечной ткани лабораторных крыс, которым моделировали экспериментальную острую почечную недостаточность, и изменения концентрации этого метаболита на фоне введения животным культуры мезенхимальных стволовых клеток, культивируемых в апоптоз-индуцированном окружении. Это окружение моделировалось путем добавления к стандартной культуральной среде гомогената предварительно ишемизированной почечной ткани животных. Полученные данные свидетельствуют об увеличении содержания метаболита оксида азота при формировании патологического процесса, и его резкое уменьшение при введении животным мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: оксид азота, острая почечная недостаточность, апоптоз, мезенхимальные стволовые клетки.

INFLUENCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS CULTURED IN APOPTOSIS-INDUCED ENVIRONMENT ON ACTIVITY OF NITRIC OXIDE SYSTEM IN ISCHEMIC INJURED KIDNEY TISSUE

*I.A. Komarevtseva, A.A. Chebotareva, T.P. Yakovleva, A.A. Zhurba, Yu.V. Kravtsova,
K.V. Komarevtseva, R.P. Moraru-Burlesku*

Abstract. The article presents data for determination of the free metabolite of nitric oxide in the renal tissue of laboratory rats that model the experimental acute renal failure, and changes in the concentration of this metabolite during administration of animal culture mesenchymal stem cells cultured in the apoptosis-induced environment. This environment was simulated by adding to the standard culture medium homogenate pre-ischemic renal tissue of animals. The data show an increase in the content of nitric oxide metabolites in the formation of the pathological process, and a sharp decrease in animals when administered mesenchymal stem cells.

Key words: nitric oxide, acute renal failure, apoptosis, mesenchymal stem cells.

SE «Lugansk State Medical University» (Rubizhne city)

Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 3 (79). – P. 88-91

Надійшла до редакції 21.04.2016 року