

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ В КОРРЕКЦИИ ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-го ТИПА

Проф. Ю. А. ДЕМИН, М. Ю. ДЕМИНА

Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина

Выявлена способность мезенхимальных стволовых клеток плаценты при интравитреальном и системном введении ослаблять оксидативный стресс и повышать активность антиоксидантной системы, что может обеспечить блокирование основных патогенетических звеньев в развитии диабетической ретинопатии и таким образом способствовать сохранению зрения у больных сахарным диабетом 2-го типа.

Ключевые слова: криоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки плаценты, оксидативный стресс, диабетическая ретинопатия, экспериментальные животные.

Диабетическая ретинопатия (ДР) является наиболее распространенным микрососудистым осложнением сахарного диабета (СД) и одной из ведущих причин потери зрения среди лиц трудоспособного возраста, что имеет большое экономическое и социальное значение [1, 2]. Число больных СД, в основном 2-го типа, постоянно увеличивается. Так, по прогнозу ВОЗ, распространенность ДР увеличится с 126,6 млн в 2010 г. до 191,0 млн в 2030 г. [2].

ДР — прогрессирующее заболевание, которое характеризуется микрососудистыми изменениями, приводящими к ишемии, повышенной проницаемости, неоваскуляризации в сетчатке и макулярному отеку [3]. Оксидативный стресс, индуцируемый гипергликемией, является важным патофизиологическим звеном в развитии диабетических микрососудистых осложнений [4]. Предполагают, что как развитие, так и прогрессирование ДР обусловлено увеличением продукции активных форм кислорода (АФК).

На сегодняшний день оксидативный стресс рассматривают как один из общих патогенетических механизмов развития инсулинорезистентности, а также спектра диабетических осложнений, включая ДР.

Известно, что СД сопровождается развитием оксидативного стресса, являющегося результатом токсического воздействия гипергликемии на биохимические процессы, которые обуславливают повышение продукции свободных радикалов и снижение антиоксидантной системы защиты [5].

Экспериментальные исследования показали, что оксидативный стресс способствует не только развитию ретинопатии, но ее сохранению после нормализации гликемического контроля [6].

Уровень супероксида аниона был повышен в сетчатке крыс с диабетом 2-го типа и сопровождался увеличением перекисного окисления липидов в мембранах и оксидативным повреждением ДНК [7]. Исследования показали, что повышение продукции супероксида аниона может активировать пять основных патофизиологических путей в развитии диабетических осложнений: 1) полиолового; 2) усиленного образования advanced glycation and products (AGEs); 3) повышенной экспрессии рецепторов к AGEs; 4) активации изоформ протеинкиназы C; 5) гиперфункции гексааминового пути. Все они активируются единственным пусковым фактором — избыточной продукцией АФК в митохондриях, что приводит к усилению их образования и индуцированию ангиогенеза, активации провоспалительных путей и эпигенетических изменений, которые сохраняются даже после нормализации гликемии (феномен «гликемической памяти») [8–10].

Развитию оксидативного стресса также способствует снижение в сетчатке глаза таких антиоксидантных ферментов, как супероксиддисмутатаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза и каталаза, что наблюдается при диабете [11, 12].

В работах [13] была сформулирована гипотеза, в соответствии с которой при ДР оксидативный стресс является унифицированным механизмом, связывающим все повреждающие пути, индуцируемые гипергликемией. Предполагают, что АФК, образующиеся в митохондриях, разрушают ДНК, что, в свою очередь, активирует поли-(АДФ-рибозо)-полимеразу (PARP). Активация PARP ингибирует глицерофосфатдегидрогеназу, что приводит к накоплению гликолитических метаболитов. Последние активируют AGE, PKC β 2, полиоловый и гексааминовый пути.

Широкомасштабные исследования в области клеточных и молекулярных механизмов патогенеза ДР свидетельствуют о необходимости новых терапевтических стратегий для профилактики и ослабления прогрессирования данной патологии. В связи с этим особый интерес представляет использование стволовых клеток, способных проникать в место повреждения сосудов и тканевой ишемии, обеспечивая заживление и реперфузию. В последние годы мезенхимальные стволовые клетки плаценты (МСКП) рассматриваются в качестве нового направления регенеративной терапии благодаря их иммуномодулирующей активности, способности к самообновлению и дифференциации в ткани мезодермального происхождения [14, 15]. Способность криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты (КМСКП) ослаблять развитие оксидативного стресса и повышать активность антиоксидантной системы может быть использована для блокирования основных патогенетических звеньев при ДР и тем самым поддерживать зрение у пациентов с СД. Подобный эффект КМСКП демонстрируют экспериментальные исследования.

Цель нашего исследования — изучить влияние КМСКП на оксидативный стресс у лабораторных крыс с СД 2-го типа.

Исследования проводили на модели СД 2-го типа у половозрелых самцов крыс линии Вистар с исходной массой тела 130–160 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом дневном освещении, температуре воздуха — 20–25 °С, влажности воздуха — 50–55 %.

Инсулинорезистентность моделировали у крыс в течение десяти недель с помощью высококалорийной (жировой и углеводной) диеты, которая состояла из 15 % жира, 25 % сахарозы, 1 % желчных кислот и 59,0 % стандартного питания, рекомендованного для данного вида животных (комбикорм, сочные корма, поваренная соль, жиры *ad libitum*); источником воды служила охлажденная кипяченая вода из городской сети в стеклянных поилках [16].

Интактные животные в течение десяти недель получали стандартную диету вивария.

Через четыре недели после начала эксперимента крысам, получавшим высококалорийную диету, внутривенно вводили цитратный раствор стрептозотоцина в дозе 25 мг/кг массы тела раз в неделю в течение двух недель. У контрольных животных по аналогичной схеме использовали внутривенно цитратный буфер [16].

Через семь дней после последней инъекции стрептозотоцина всех экспериментальных животных разделили на четыре группы: контрольная группа; группа здоровых крыс, получавших КМСКП; группа крыс с СД 2-го типа, получавших КМСКП; группа крыс с СД 2-го типа, принимавших плацебо.

КМСКП вводили внутривенно и интравитреально контрольным животным и крысам с СД 2-го

типа, индуцированным высококалорийной диетой и стрептозотоцином. Крысы группы «СД + плацебо» получали плацебо соответствующего объема по аналогичной схеме.

КМСК из крысиной плаценты снимали с пластика с помощью 0,05 % раствора трипсина-ЕДТА (Biochrom, Германия). Для ингибирования трипсина к суспензии клеток добавляли ФБС (Gibco, Германия) до конечной концентрации 15 %. Клетки отмывали от трипсина путем центрифугирования 5 мин при 300° и ресуспензировали осадок клеток в растворе Хенкса. Криоконсервирование МСКП проводили по разработанной и запатентованной технологии [17].

Для оценки выраженности оксидативного стресса у экспериментальных животных необходимо определить уровень первичных продуктов окисления липидов — диеновых конъюгатов, которые характеризуют раннюю стадию перекисидации. Следует отметить, что диеновые конъюгаты относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеины, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты.

Окислительно-восстановительный гомеостаз оценивали спектрофотометрически по уровню ТБК-активных продуктов [18], восстановленного глутатиона [19], супероксиддисмутазы [20] и общей антиоксидантной активности [21] в сыворотке крови.

В результате проведенных исследований установлено, что СД 2-го типа сопровождается интенсификацией процессов липидной перекисидации, на что указывает повышенный уровень первичных продуктов — диеновых конъюгатов в сыворотке крови крыс по сравнению с интактным контролем. В то же время у крыс, получавших плацебо, отмечалось существенное снижение общей антиоксидантной активности, концентрации восстановленного глутатиона и активности каталазы в сыворотке крови, что свидетельствует об ослаблении антиоксидантной защиты в условиях СД 2-го типа (таблица).

Использование КМСКП приводило к ослаблению оксидативного стресса, о чем свидетельствовал достоверно сниженный уровень диеновых конъюгатов в сыворотке крови крыс по сравнению с группой животных, получавших плацебо (таблица).

Антиоксидантное действие КМСКП проявлялось не только в торможении процессов свободнорадикального окисления липидов, а также в активации антирадикальной системы защиты. Так, общая антиоксидантная активность в сыворотке крови крыс, получавших мезенхимальные клетки, повышалась на 50 %, но не достигала показателей интактного контроля. Повышение концентрации восстановленного глутатиона в сыворотке крови животных с СД 2-го типа сопровождалось нормализацией активности ключевого фермента антиоксидантной защиты — каталазы (таблица).

Влияние криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты на показатели окислительно-восстановительного гомеостаза в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2-го типа ($X \pm Sx$), $n = 6$

Группа	Концентрация диеновых конъюгатов, мкмоль/л	Общая антиоксидантная активность, у. е./л	Концентрация восстановленного глутатиона, ммоль/л	Активность каталазы, мкат/л
Интактный контроль	1,55±0,20	19,11±1,50	0,44±0,04	15,24±0,38
Контроль + КМСКП	1,79±0,16 $p_1 > 0,05$	18,16±1,84 $p_1 > 0,05$	0,46±0,03 $p_1 > 0,05$	14,95±0,25 $p_1 > 0,05$
СД + плацебо	3,84±0,25 $p_1 < 0,001$	7,57±0,94 $p_1 < 0,001$	0,31±0,03 $p_1 < 0,001$	13,15±0,35 $p_1 < 0,01$
СД + КМСКП	2,52±0,16 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	13,03±1,40 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	0,37±0,03 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	14,76±0,36 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$

p_1 – отклонение достоверно по отношению к интактному контролю;
 p_2 – отклонение достоверно по отношению к группе «СД + плацебо».

Таким образом, применение КМСКП тормозит развитие оксидативного стресса у крыс с СД 2-го типа, что может способствовать профилактике и ослаблению развития ДР.

Учитывая важную роль оксидативного стресса в патогенезе ДР, терапевтическая коррекция про/антиоксидантного баланса может быть эффективным направлением в предупреждении потери

зрения. Отсутствие убедительных результатов, свидетельствующих об эффективности использования антиоксидантов в клинических исследованиях, может быть связано с их системным способом введения. В связи с этим локальное применение препаратов, обеспечивающих восстановление оксидантного статуса, может стать перспективным направлением в предупреждении ДР.

Список литературы

- Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy / J. W. Yau, S. L. Rogers, R. Kawasaki [et al.] // *Diabetes Care.*— 2012.— Vol. 35, № 3.— P. 556–564.
- Zheng Y. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy / Y. Zheng, M. He, N. Congdon // *Indian J. of Ophthalmology.*— 2012.— Vol. 60, № 5.— P. 428–431.
- Classification of diabetic retinopathy and diabetic macular edema / W. Lihteh [et al.] // *World J. Diabetes.*— 2013.— Vol. 4, № 6.— P. 290–294.
- Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy / Y. Cui [et al.] // *Exp. Eye Res.*— 2006.— Vol. 83, № 4.— P. 807–816.
- Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications / D. Pitocco, M. Tesaro, R. Alessandro [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.*— 2013.— Vol. 14.— P. 21525–21550.
- Kowluru R. A. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrative stress in diabetic rats / R. A. Kowluru // *Diabetes.*— 2003.— Vol. 52, № 3.— P. 818–823.
- Kowluru R. A. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated / R. A. Kowluru // *Acta Diabetologica.*— 2001.— Vol. 38, № 4.— P. 179–185.
- Kowluru R. A. Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries / R. A. Kowluru, M. Kanwar, A. Kennedy // *Exp. Diabetes Res.*— 2007.— Vol. 2007.— 7 p.
- Glucose oscillations, more than constant high glucose, induce p53 activation and a metabolic memory in human endothelial cells / B. Schisano [et al.] // *Diabetologia.*— 2011.— Vol. 54, № 5.— P. 1219–1226.
- Reactive oxygen species mediate a cellular «memory» of high glucose stress signaling / M. A. Ilnat [et al.] // *Diabetologia.*— 2007.— Vol. 50, № 7.— P. 1523–1531.
- Zhong Q. Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy / Q. Zhong, R. A. Kowluru // *Diabetes.*— 2011.— Vol. 60, № 4.— P. 1304–1313.
- Oxidative stress in type 1 diabetes / K. Haskins [et al.] // *Ann. of the New York Academy of Sciences.*— 2003.— Vol. 1005.— P. 43–54.
- Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes: UKPDS 33 / UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group // *Lancet.*— 1998.— Vol. 352, № 9131.— P. 837–853.
- Forbes J. M. Mechanisms of diabetic complications / J. M. Forbes, M. E. Cooper // *Physiol. Rev.*— 2013.— Vol. 93, № 1.— P. 137–188.
- Human mesenchymal stem cells increases expression of α -tubulin and angiopoietin 1 and 2 in focal cerebral ischemia and reperfusion / Ma X. L. [et al.] // *Curr. Neurovasc. Res.*— 2013.— Vol. 10, № 2.— P. 103–111.
- Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy / S. Lin, J. Yang, G. Wu [et al.] // *J. Of Biomed. Sci.*— 2010.— Vol. 17, Suppl. 1.— P. 46–56.
- Лобинцева Г. С. Патент (11) 46673 А, Україна, Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини.— Опубл. 15.05.2002.— Бюл. № 5.

18. *Ohkawa H.* Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // *J. Lipid Res.*— 1978.— Vol. 19.— P. 1053–1057.
19. *Eyer P.* Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent / P. Eyer, D. Podhradsky // *Anal. Biochem.*— 1986.— Vol. 153, № 1.— P. 57–66.
20. Современные методы в биохимии; под ред. акад. В. Н. Ореховича — М.: Медицина, 1997.— С. 44–47.
21. *Арутюнян А. В.* Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рек. / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина.— СПб., 2000.— 104 с.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ У КОРЕКЦІЇ ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСУ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ 2-го ТИПУ

Ю. А. ДЬОМІН, М. Ю. ДЬОМІНА

Виявлено здатність мезенхімальних стовбурових клітин плаценти при інтравітреальному та системному введенні послаблювати оксидативний стрес і підвищувати активність антиоксидантної системи, що може забезпечити блокування основних патогенетичних ланок у розвитку діабетичної ретинопатії й таким чином сприяти збереженню зору у хворих на цукровий діабет 2-го типу.

Ключові слова: кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини плаценти, оксидативний стрес, діабетична ретинопатія, експериментальні тварини.

EFFICACY OF CRYOGENICALLY PRESERVED MESENCHYMAL PLACENTA STEM CELLS IN CORRECTION OF OXIDATIVE STATE IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Yu. A. DOMIN, M. Yu. DOMINA

The ability of mesenchymal placenta stem cells to weaken development of oxidative stress and increase the activity of antioxidant system at intravitreal and systemic administration was revealed, which can ensure blocking of the main pathogenetic links in development of diabetic retinopathy and thus help to preserve vision of patients with type 2 diabetes mellitus.

Key words: cryogenically preserved mesenchymal placenta stem cells, oxidative stress, diabetic retinopathy, experimental animals.

Поступила 06.08.2015