

УДК 577.121.7:576.5:616.61-008.64-092.9

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ АПОПТОЗ-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© Чеботарёва А.А.¹, Комаревцева И.А.²

¹Кафедра общей гигиены Курского государственного медицинского университета, Курск; ²кафедра медицинской химии Луганского государственного медицинского университета, Луганск, Украина
E-mail: chebotareva_alisa@mail.ru

В процессе исследования активности антиоксидантной системы животных, которым была смоделирована экспериментальная почечная недостаточность, нами были получены данные, говорящие о снижении уровня основных ферментов данной системы, а именно супероксиддисмугазы и каталазы, на 7 и 14 сутки исследования. Данные результаты могут свидетельствовать о снижении протекторных способностей системы антиоксидантной защиты и об активации процессов перекисного окисления липидов в тканях исследуемого органа. Последующее введение культивируемых нами мезенхимальных стволовых клеток, выращенных в апоптоз-индуцированном окружении, привело к повышению уровня исследуемых ферментов в тканях почек относительно контрольной группы животных на выбранные нами сутки наблюдения и относительно интактных животных к 14 суткам эксперимента.

Ключевые слова: острая почечная недостаточность, мезенхимальные стволовые клетки, антиоксидантная система.

CHANGING IN ANTIOXIDANT PROTECTIVE STATUS AFTER INTRODUCING APOPTOSIS-INDUCED MESENCHYMAL STEM CELLS AGAINST THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL ACUTE RENAL FAILURE

Chebotareva A.A.¹, Komarevtseva I.A.²

¹Department of General Hygiene of Kursk State Medical University, Kursk;

²Department of Medical Chemistry of Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

The study of antioxidant activity in animals after simulating experimental renal failure revealed the decrease in the level of system principle enzymes, namely superoxide dismutase and catalase on the 7th and 14th days of the study. These results may indicate a decrease in antioxidant protective abilities and the activation of lipid peroxidation in tissues of the organ examined. The subsequent introduction of the mesenchymal stem cells grown in apoptosis-induced environment led to the increased level of the enzymes studied in renal tissue comparing to the control group of animals on these days and comparing to intact animals by the 14th day of the experiment.

Keywords: acute renal failure, mesenchymal stem cells, antioxidant system.

Процессы свободнорадикального окисления (СРО), которые лежат в основе всех механизмов метаболизма клеток и определяют состоятельность систем адаптации к действию повреждающих факторов, являются неотъемлемой частью существования аэробных организмов, включая человека и других млекопитающих. С одной стороны, активные формы кислорода (АФК) являются необходимыми для реализации таких важных физиологических функций, как участие в протекании реакций катализа, регуляция внутриклеточного гомеостаза, системный иммунный ответ. С другой стороны, активные свободнорадикальные формы являются соединениями высокоактивными, легко вступающими в реакции с различными классами биомолекул [1, 2, 5]. Широкий ряд биологически важных соединений, как, например, углеводы, белки, нуклеопотеиды и нуклеиновые кислоты, низкомолекулярные модуляторы липидной природы, могут подвергаться относительно легкой окислительной модификации, с дальнейшей деструкцией.

В физиологических условиях АФК, которые производятся в процессе различных метаболических реакций, должны нейтрализоваться многоуровневой защитой антиоксидантной системы организма (АОС), представляющей собой многочисленные ферментные комплексы. Однако при ряде патологических состояний, таких как острая почечная недостаточность (ОПН), развиваются нарушения в системе «свободные радикалы – перекисное окисление липидов – система антиоксидантной защиты», что приводит к развитию оксидантного стресса [3]. При этом кислородные радикалы вызывают дисфункцию и повреждение клеток, атакуя биомолекулы и моделируя чувствительные к окислительно-восстановительному потенциалу пути трансдукции сигналов и факторы транскрипции [10].

Острая почечная недостаточность является тяжелым и достаточно распространенным патологическим состоянием, часто осложняющим течение хронических заболеваний органов мочевыделительной системы. Профилактика и лечение

этого осложнения до настоящего времени остается серьезной проблемой, так как, несмотря на многолетние исследования, эффективность медикаментозного лечения остается не столь высокой [6, 8].

В последнее время достаточно широко проводятся исследования по коррекции ОПН стволовыми клетками. На данном этапе получены обширные данные об активации процессов ангиогенеза после введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [9, 11].

Целью нашего исследования являлось изучение активности систем антиоксидантной защиты в условиях поражения почечной ткани при ОПН и возможного ее изменения в условиях введения мезенхимальных стволовых клеток, культивированных в апоптоз-индуцированном окружении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено на белых беспородных крысах-самцах 16-18 недельного возраста. Экспериментальную ОПН формировали путем двустороннего пережатия почечной ножки на 30 мин. (модель ишемия-реперфузия).

Мезенхимальные стволовые клетки получали из костного мозга бедренной и большеберцовой костей, затем их культивировали в среде ИГЛА-МЕМ, обогащенной L-глутамином, 10% телячьей эмбриональной сывороткой и антибиотиками.

Апоптоз-индуцированные МСК культивировались вышеизложенным методом, с добавлением к питательной среде гомогената почечной ткани крыс, перенесших за трое суток до забоя экспериментальную острую почечную недостаточность по модели ишемия-реперфузия.

Жизнеспособность клеток в культуре определяли по тесту с трипановым синим.

Введение МСК проводили через 1 ч после операции. Количество вводимых клеток одному животному составило 5 млн. Клетки вводили внутривенно в хвостовую вену.

Животные были поделены на 4 группы: I – интактные животные, II – животные, которым формировали ОПН, III – животные, которым формировали ОПН на фоне введения обычных МСК, IV – животные, которым формировали ОПН на фоне апоптоз-индуцированных МСК.

Забой крыс производился на 7 и 14 сутки формирования ОПН, путем декапитации под эфирным наркозом. Затем извлекали почки. Активность АОС оценивали по уровню супероксиддисмутазы (СОД), активность которой определяли в реакции ингибирования аутоокисления адреналина [4], и каталазы, активность которой опре-

деляли в реакции с молибдатом аммония [7]. Вероятность полученных результатов оценивалась по критерию t-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было установлено, что у интактных животных активность СОД составляла 25,9%.

На 7 сутки развития ОПН активность СОД снизилась до 14,7%. На 14 сутки формирования ОПН активность СОД была снижена до 18,2%

При введении МСК в III группе на 7 сутки ОПН активность СОД была повышена на 62,6% в сравнении с II группой животных; при этом активность СОД была ниже таковых значений интактной группы. На 14 сутки ОПН при введении МСК уровень активности СОД повышался на 69,1% в сравнении со значениями животных II группы.

При введении апоптоз-индуцированных МСК в IV группе животных на 7 сутки формирования экспериментальной ОПН активность СОД составляла 26,4%, что превышало уровень фермента во II группе животных на 81,63%, а также было выше таковых значений в интактной группе. На 14 сутки ОПН при введении МСК, культивированных в апоптоз-индуцированном окружении, уровень активности СОД повышался на 90,6% в сравнении с показателями животных II группы (рис. 1).

Снижение активности СОД в условиях оксидантного стресса при экспериментальной ОПН может быть результатом накопления в клетках почек соединений, взаимодействующих с ионами металлов в активном центре фермента или влияющих на степень их восстановленности, а также следствием взаимодействия активного центра энзима с гидроперекисями ненасыщенных жирных кислот, которые образуются при активации перекисного окисления липидов. Увеличение же уровня активности данного фермента может свидетельствовать о положительном влиянии введения мезенхимальных стволовых клеток – в особенности, культивированных в апоптоз-индуцированном окружении – при экспериментальной ОПН на активность СОД, как основного фермента системы АОЗ.

Сходная динамика наблюдалась и при определении активности каталазы. У интактных животных мы получили 116,2 усл. ед. На 7 сутки развития ОПН активность каталазы снизилась до 79,7 усл. ед. На 14 сутки ОПН уровень активности фермента возрос на 16% по сравнению с 7 сутками, но оставался достоверно ниже таковых показателей интактной группы.

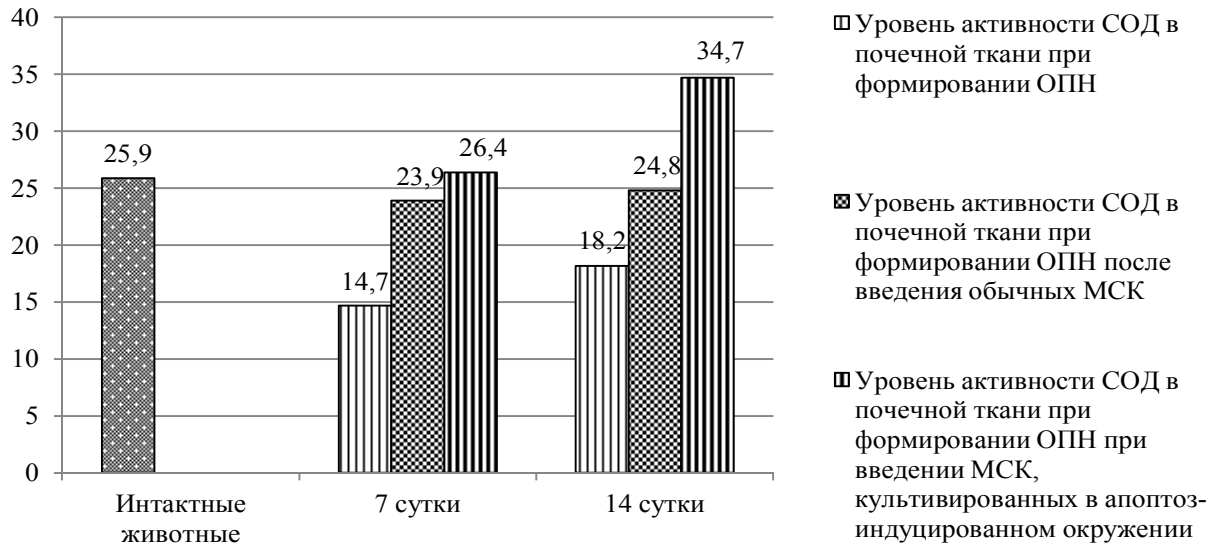


Рис. 1. Динамика изменения активности СОД в почечной ткани крыс на фоне введения МСК, культивированных в апоптоз-индуцированном окружении.

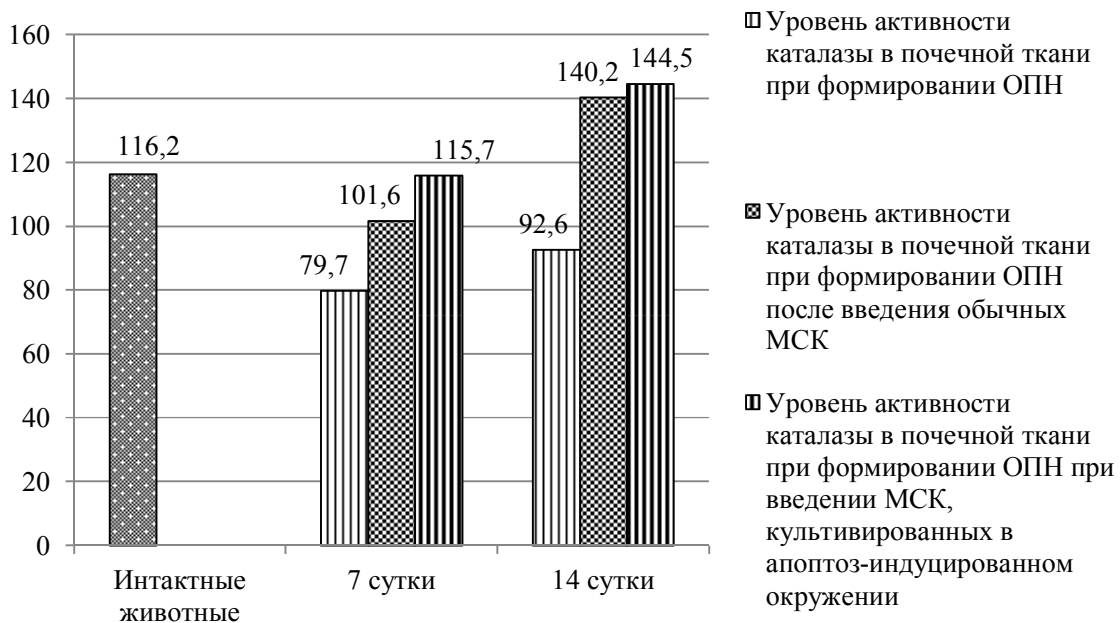


Рис. 2. Динамика изменения активности каталазы в почечной ткани крыс на фоне введения МСК, культивированных в апоптоз-индуцированном окружении.

При введении МСК в III группе на 7 сутки ОПН активность каталазы была выше на 27,4% в сравнении с II группой животных. На 14 сутки ОПН при введении МСК уровень активности каталазы составлял 140,2 усл. ед., что превышало показатели II группы на 51,4%.

При введении апоптоз-индуцированных МСК в IV группе животных на 7 сутки формирования экспериментальной ОПН активность каталазы составляла 115,7 усл. ед., что превышало уровень фермента во II группе животных на 45,1%. На 14 сутки ОПН при введении МСК, культивиро-

ванных в апоптоз-индуцированном окружении, уровень активности каталазы превышал показатели животных II группы на 56,04%, а также был выше таковых значений в интактной группе (рис. 2).

Увеличение активности данного фермента в условиях оксидантного стресса может свидетельствовать о запуске компенсаторных механизмов в ответ на повышение свободнорадикальных форм кислорода в клетке почки. Применение МСК ускоряет процессы адаптации в почечной ткани.

Исходя из вышеизложенного можно сделать выводы, что острая почечная недостаточность непосредственно отражается на активности про-оксидантно-антиоксидантной системы, действующей в экспериментальном органе, что проявляется в снижении активности фермента супероксиддисмутазы и каталазы после формирования экспериментальной ОПН. Полученные данные могут говорить об активации перекисного окисления липидов в ишемизированном органе и поражении его клеток активными формами кислорода. Введение аллогенных мезенхимальных стволовых клеток ускоряет процессы адаптации в почечной ткани и восстановление уровня ферментов. Культивирование МСК в апоптоз-индуцированном окружении, по-видимому, ведет к ускорению процесса дифференцировки стволовых клеток, что можно предположить из увеличения активности ферментов АОС в эксперименте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленичев И.Ф., Ганчева О.В. Сигнальная роль активных форм кислорода в регуляции физиологических функций // Патология. – 2005. – Т. 2, № 1. – С. 4-9.
2. Губський Ю.І., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І. Основні шляхи утворення активних форм кисню в нормі та при ішемічних патологіях // Современные проблемы токсикологии. – 2004. – № 2. – С. 8-15.
3. Пикалова В.М., Поступаев В.В., Тимошин С.С. Состояние ПОЛ и антиоксидантной защиты тканей желудка крыс при введении АТ11 и эналаприла малеата // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2003. – Т. 135, № 4. – С. 402-405.
4. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. – 1999. – № 3. – С. 36-46.
5. Тимочко М.І., Кобилінська Л.І. Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль // Медична хімія. – 1999. – Т. 1, № 1. – С. 19-25.
6. Шумаков В.И. Достижения и перспективы развития трансплантологии и искусственных органов в России // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – С. 6-9.
7. Bachmann S., Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function // American Journal of Kidney Diseases. – 1994. – Vol. 24, N 1. – P. 112-129.
8. DuBose T.D.Jr., Warnock D.G., Mehta R.L., Bonventre J.V., Hammerman M.R., Molitoris B.A., Paller M.S., Siegel N.J., Scherbenske J., Striker G.E. Acute renal failure in the 21st century: recommendations for management and outcomes assessment // American Journal of Kidney Diseases. – 1997. – Vol. 29. – P. 793-799.
9. Duffield J. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells / Duffield J. // The Journal of Clinical Investigation. – 2005. – Vol. 115. – P. 1743-1755.
10. Epperlein M.M., Nourooz-Zadeh J., Jayasena S.D. Nature and biological significance of free radicals generated during bicarbonate hemodialysis // J. Am. Soc. Nephrology. – 1998. – Vol. 9. – P. 457-463.
11. Lin F., Moran A. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney // The Journal of Clinical Investigation. – 2005. – Vol. 115. – P. 1756-1764.