

## ВПЛИВ ЗАСТОСУВАННЯ АПОПТОЗІНДУКОВАНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА РІВЕНЬ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК І АКТИВНІСТЬ СИСТЕМИ СФІНГОЗИНУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛЮВАННЯ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

*У ході вивчення рівня фрагментації ДНК і вільного сфінгозину у тварин, яким було змодельовано гостру ниркову недостатність, отримано результати, які свідчать про стимуляцію ішемічним процесом апоптотичної активності в нирковій тканині на 3, 7 і 14 доби дослідження, що підтверджувалося підвищенням рівня маркерів, які вивчали. Подальше застосування мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптозіндукованому середовищі, близькому до змодельованого патологічного процесу, призвело до початкового різкого зростання рівня як фрагментованої ДНК, так і вільного сфінгозину в нирковій тканині на 3 добу з подальшим зниженням їх концентрації до 14 доби експерименту майже до показників, отриманих у групі інтактних тварин.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мезенхімальні стовбурові клітини, апоптоз, сфінгозин, фрагментація ДНК.

ВСТУП. Будь-який патологічний процес в організмі, спричинений чи то дією зовнішніх факторів, чи активацією внутрішніх агентів, призводить до ураження клітин із наступним порушенням їх функцій або загибеллю. На даний момент найкраще вивчено два основні шляхи смерті клітини – апоптоз та некроз. На відміну від некрозу, який завжди є проявом патології і характеризується ураженням цитоплазматичної мембрани з “витіканням” клітинного вмісту в екстрацелюлярний простір [6], апоптоз можна назвати одним із проявів адаптації організму до згубних змін, що відбуваються на клітинному рівні [12, 14]. Апоптоз, чи запрограмована клітинна загибель, – це процес видалення уражених або нежиттєздатних клітин, що формуються під час розвитку організму та за умов дії патологічного агента [15]. На сьогодні вчені встановили вплив апоптозу на розвиток таких патологічних процесів, як пухлинний ріст, вторинні імунodefіцити, деякі нейродегенеративні та аутоімунні хвороби, запалення, ішемічні органи ураження і безпліддя [3, 10, 11]. Регуляція активності апоптотичного процесу відбувається за допомогою внутрішньо- і позаклітинних чинників: цитокінів,  $Ca^{2+}$ , TNF $\alpha$ , Fas L та Bcl-2 [7]. Також важливою ланкою в цьому процесі є система сфінголіпідів, серед яких виділяють апоптозо-

© І. О. Комаревцева, А. А. Чеботарьова, 2016.

стимульовальні керамід і сфінгозин, та їх антагоніст – сфінгозин-1-фосфат [8, 18]. Кінцевим етапом реалізації програми апоптозу є деградація ДНК на фрагменти, кратні 180–200 парам нуклеотидів, тобто її фрагментація, що можна зафіксувати за експериментальних умов [16].

Великий інтерес у вчених в останні роки викликає питання щодо можливості корекції патологічного процесу за допомогою клітинної терапії. Трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), які мають високий проліферативно-диференціовальний потенціал, показує ефективність при лікуванні широкого спектра захворювань, таких, як ураження серцевого м'язу, ниркові та судинні хвороби тощо [4, 5, 13].

Метою даного дослідження було встановити вплив на активність апоптотичного процесу введення мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптозіндукованому середовищі, шляхом визначення рівня фрагментації ДНК (фДНК) і сфінгозину (СФГ) в тканині за умов моделювання патологічного процесу – гострої ниркової недостатності (ГНН).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на білих щурах-самцях 16–18-тижневого віку масою 200–250 г. Моделлю патологічного процесу була гостра ниркова недостатність, змодельована в умовах лабораторії шляхом

двобічного перетиснення ниркової ніжки на 30 хв (модель ішемія-реперфузія).

Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з кісткового мозку стегнової та великогомілкової кісток. Далі їх культивували в апоптозіндукованих умовах шляхом додавання до живильного середовища гомогенату ниркової тканини щурів, які перенесли експериментальну гостру ниркову недостатність за моделлю ішемія-реперфузія за 3 доби до забою. Живильним середовищем була ІГЛА-МЕМ, збагачена L-глутаміном, 10 % телячою сироваткою та антибіотиками. Культивування проходило 12 діб зі зміною 1/2 середовища кожні 5 днів. Життєздатність клітин визначали за тестом із трипановим синім. Вводили МСК через 1 год після моделювання гострої ниркової недостатності. Кількість стовбурових клітин, які вводили, дорівнювала 5 млн. Клітини вводили у хвостову вену.

Лабораторних тварин було поділено на три групи: 1-ша – інтактні тварини; 2-га (контрольна) – тварини, яким формували гостру ниркову недостатність; 3-тя (експериментальна) – тварини, яким після формування ГНН вводили апоптозіндуковані мезенхімальні стовбурові клітини. Забій щурів здійснювали на 3, 7 і 14 доби після формування гострої ниркової недостатності шляхом декапітації під етеровим наркозом. Потім вилучали нирки. Для визначення фрагментації ДНК використовували дифеніламіновий тест [1]. Для визначення вільного сфінгозину застосовували методику, описану М. І. Прохоровою, основу на екстракції сфінгоїдних основ діетиловим етером [2]. Зразки вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 415 нм. Кількість вільного СФГ визначали за калібрувальною шкалою в перерахунку на 1 мг білка.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Було встановлено, що рівень фрагментації ДНК у нирковій тканині щурів, які перенесли експериментальну гостру ниркову недостатність, значно вищий, ніж в інтактних. Так, рівень фДНК в інтактній групі складав 4,25 %, тоді як на 3 добу після моделювання гострої ниркової недостатності у тварин 2-ї групи він збільшувався в 6,92 раза. На 7 добу експерименту вміст фДНК у нирковій тканині щурів контрольної групи становив 23,81 %, що перевищувало показники інтактної групи у 5,6 раза і було незначно нижчим (в 1,23 раза) від показників, отриманих на 3 добу. До 14 доби дослідження рівень фрагментації ДНК у тканині нирок значно перевищував показники інтактної групи (в 6,74 раза), хоча і був дещо нижчим (в 1,03 раза) від показників, отриманих на 3 добу експерименту.

В експериментальній групі виявлено значні зміни вмісту фДНК порівняно з 1-ю і 2-ю групами. Так, на 3 добу після операції і введення в хвостову вену апоптозіндукованих МСК рівень фрагментації ДНК сягав 33,71 %, що перевищувало показники як інтактної, так і контрольної груп на 3 добу (в 7,93 та 1,14 раза відповідно). Результати, отримані на 7 добу дослідження, продемонстрували значне зменшення концентрації фДНК, яка дорівнювала 11,88 %, що було нижчим від відповідних показників 2-ї групи у 2 рази, але все ще перевищувало показники інтактної групи у 2,79 раза. До 14 доби експерименту на фоні введення апоптозіндукованих мезенхімальних стовбурових клітин рівень фДНК майже досягав показників інтактної групи, перевищуючи їх всього у 1,64 раза, і був достовірно нижчим ( $p < 0,05$ ), порівняно з відповідними показниками контрольної групи, в 4,09 раза (рис. 1).

Зростання рівня фДНК на 3 добу після моделювання експериментальної ГНН може бути пов'язане з високою чутливістю ниркової тканини до розвитку ішемії та активацією апоптотичних процесів. Відносно зниження відповідних показників на 7 добу можна пояснити активацією репаративних процесів у тканині нирок, а повторне підвищення рівня фрагментації ДНК спричинене другим піком апоптотичних процесів в ішемізованій тканині, який описано в літературі [9, 17]. Введення мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптозіндукованому середовищі, ймовірно, на початковому етапі стимулює апоптотичні процеси, прискорюючи видалення ушкоджених в ході ішемії клітин, що в подальшому призводить до активації власної репаративної здатності організму і наступного зниження апоптотичної активності.

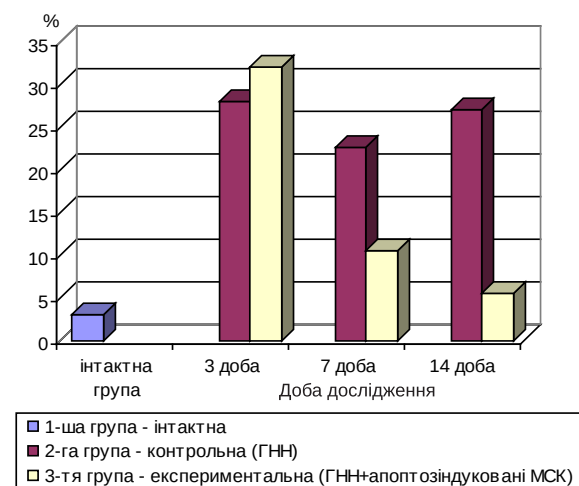


Рис. 1. Рівень фрагментації ДНК у нирковій тканині на фоні експериментальної гострої ниркової недостатності при введенні МСК, культивованих в апоптозіндукованому середовищі.

Подібну картину спостерігали при вивченні рівня вільного сфінгозину в нирковій тканині. Так, його концентрація в інтактних тварин складала 16,3 нг/мг білка. При моделюванні ГНН у контрольній групі щурів показники зростали і сягали 37,2 нг/мг білка на 3 добу після операції, що перевищувало дані інтактної групи у 2,28 раза. До 7 доби рівень вільного СФГ у 2-й групі дещо знижувався (на 8,87 %), але перевищував такий в інтактній групі у 2,08 раза. Показники, отримані на 14 добу, становили 35,1 нг/мг білка, що було вищим від даних інтактних тварин у 2,15 раза.

При введенні лабораторним тваринам 3-ї групи, які перенесли ГНН, мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптозіндукованому середовищі, отримано такі результати. На 3 добу експерименту рівень вільного СФГ сягав 41,2 нг/мг білка, що було вищим від показників як інтактної, так і контрольної груп у той самий строк (у 2,53 та 1,11 раза відповідно). До 7 доби рівень сфінгозину в нирковій тканині тварин експериментальної групи значно зменшувався і складав 22,8 нг/мг білка, що було нижчим від показників контрольної групи в 1,49 раза, але все ще перевищувало показники інтактної групи у 1,39 раза. На 14 добу дослідження вміст СФГ у 3-й групі майже зрівнявся з показниками інтактної групи, перевищуючи їх на 20,85 %, і був у 1,78 раза нижчим від даних контрольної групи тварин (рис. 2).

Дана картина відповідає показникам фрагментації ДНК і підтверджує активацію апоптозу на 3 та 14 доби після розвитку ішемічного патологічного процесу і стимуляцію компенсаторних можливостей на фоні введення мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптозіндукованому середовищі.

**ВИСНОВКИ.** При експериментальному ішемічному ураженні нирок спостерігають активацію

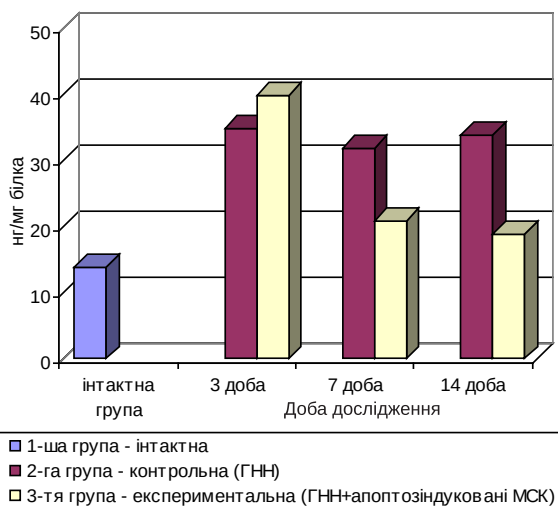


Рис. 2. Рівень вільного сфінгозину в нирковій тканині на фоні експериментальної гострої ниркової недостатності при введенні МСК, культивованих в апоптозіндукованому середовищі.

клітинних чинників системи сфінгозину як одного з активаторів каскаду запрограмованої клітинної загибелі й підвищення рівня основного апоптотичного маркера – фрагментації ДНК в ушкодженій тканині, причому виділяється 2 піки апоптотичної активності – на 3 і 7 доби від моменту формування гострої ниркової недостатності. Введення мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптозіндукованому середовищі, близькому до змодельованого патологічного процесу, значно підвищує апоптотичну активність на початкових етапах експерименту з подальшим різким зниженням як концентрації вільного СФГ, так і фрагментації ДНК із досягненням рівня, майже наближеного до інтактних показників. Отримані результати викликають інтерес для подальшого вивчення впливу апоптозіндукованого середовища на активність мезенхімальних стовбурових клітин та застосування їх при різних патологічних процесах.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Орлова Е. А. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани / Е. А. Орлова, В. Н. Комаревцев // Актуал. пробл. акушерства і гінекології, клініч. імунології та мед. генетики. – 2001. – 6. – С. 206–208.
2. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 178 с.

3. Райхлин Т. Н. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях / Т. Н. Райхлин, Н. Т. Райхлин, А. Н. Райхлин // Вопросы онкологии. – 2002. – 48, № 2. – С. 159–171.
4. Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток человека для восстановления нормальной функции эндотелия и кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости в гладко-

- мышечных клетках аорты облученных крыс / А. И. Соловьев, И. М. Прудников, В. Н. Цивкин [и др.] // Журн. АМН України. – 2009. – **15**, № 3. – С. 460–475.
5. Шегельская Е. Г. Стромальные клетки костного мозга и перспективы их использования в регенеративной медицине / Е. Г. Шегельская, Ю. Е. Микульский // Трансплантология. – 2004. – **7**, № 3 – С. 108–113.
6. Apoptosis and treatment of chronic allograft nephropathy with everolimus / J. Lutz, H. Zou, B. Antus, U Heemanu // Transplantation. – 2003. – **15**, № 76 (3). – P. 508–515.
7. Ashkenasi A. Deathreceptors: signalling and modulation / A. Ashkenasi, V. M. Dixi // Science. – 1988. – **281**. – P. 1305–1308.
8. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent the Loss of Niemann-Pick Type C Mouse Purkinje Neurons by Correcting Sphingolipid Metabolism and Increasing Sphingosine-1-phosphate / H. Lee, J. K. Lee, W. K. Min [et al.] // Stem Cells. – 2010. – **28**. – P. 821–831.
9. Dagher P. C. Apoptosis in ischemic renal injury: Roles of GTP depletion and p53 / P. C. Dagher // Kidney Int. – 2004. – **66**. – P. 506–509.
10. González-Marín C. Causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells / C. González-Marín, J. Gosálvez, R. Roy // International Journal of Molecular Sciences Types. – 2012. – **13**. – P. 14026–14052.
11. Hersey P. Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis / P. Hersey, X. D. Zhang // J. Cell Physiol. – 2003. – **196**, № 1. – P. 9–18.
12. Kerr J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept / J. F. Kerr // Toxicology. – 2002. – **471**, 4. – P. 181–182.
13. Li F. Differentiating multipotent mesenchymal stromal cells generate factors that exert paracrine activities on exogenous MSCs: Implications for paracrine activities in bone regeneration / F. Li, N. Whyte, C. Niyibizi // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – **5**. – P. 475–479.
14. Lockshin R. A. Apoptosis, autophagy, and more / R. A. Lockshin Z. Zakeri // IJBCB. – 2004. – **36**. – P. 2405–2419.
15. Norbury C. J. Cellular responses to DNA damage / C. J. Norbury, I. D. Hickson // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2001. – **41**. – P. 367–401.
16. Pourkarimi E. Evidence that CED-9/Bcl2 and CED-4/Apaf-1 localization is not consistent with the current model for *C. elegans* apoptosis induction / E. Pourkarimi, S. Greiss, A. Gartner // Cell Death Differ. – 2012. – **19** (3). – P. 406–415.
17. Snider A. J. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation / A. J. Snider, K. A. Orr Gandy, L. M. Obeid // Biochimie. – 2010. – **92** (6). – P. 707–715.
18. Zhang J. H. DNA fragmentation in apoptosis / J. H. Zhang, M. Xu // Cell Research. – 2000. – **10**. – P. 205–211.

И. А. Комаревцева, А. А. Чеботарева

ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, РУБЕЖНОЕ

## ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АПОПТОЗИНДУЦИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА УРОВЕНЬ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК И АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ СФИНГОЗИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

### Резюме

При изучении уровня фрагментации ДНК и свободного сфингозина у животных, которым была смоделирована острая почечная недостаточность, получены результаты, которые свидетельствуют о стимуляции ишемическим процессом апоптотической активности в почечной ткани на 3, 7 и 14 сутки исследования, что подтверждалось повышением уровня изучаемых маркеров. Дальнейшее применение мезенхимальных стволовых клеток, культивированных в апоптозіндуцірованній середі, близькій к смоделированному патологическому процессу, привело к начальному резкому возрастанию уровня как фрагментированной ДНК, так и свободного сфингозина в почечной ткани на 3 сутки с последующим снижением их концентрации к 14 суткам эксперимента почти до показателей, полученных в группе интактных животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мезенхимальные стволовые клетки, апоптоз, сфингозин, фрагментация ДНК.

**INFLUENCE OF APOPTOSIS INDUCED MESENCHYMAL STEM CELLS  
TO DNA FRAGMENTATION LEVEL AND ACTIVITY OF SPHINGOSINE  
UNDER AN EXPERIMENTAL MODELING OF PATHOLOGICAL PROCESSES**

**Summary**

*During the studying the level of DNA fragmentation and free sphingosine in animals had been modeled acute renal failure, we obtained results which indicate stimulation ischemic process apoptotic activity in kidney tissue on 3, 7 and 14 day of study, which was confirmed by increased levels of the studied marker. Further use of mesenchymal stem cells cultured in apoptosis-induced environment near modeled pathological process led to the initial sharp rise in both fragmented DNA and free sphingosine in renal tissue on day 3, with a consequent reduction in their concentrations to 14 days of the experiment almost to the figures obtained by us in the group of intact animals.*

**KEY WORDS: mesenchymal stem cells, apoptosis, sphingosine, DNA fragmentation.**

Отримано 09.01.16

**Адреса для листування:** А. А. Чеботарьова, Луганський державний медичний університет, вул. Будівельників, 32, Рубіжне, 93012, Україна, e-mail: safrnvaali@rambler.ru.