

# APPLICATION EFFICIENCY OF RYOPRESERVED PLACENTAL MESENCHYMAL STEM CELLS IN CORRECTION OF DYSLIPIDEMIA IN EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN TYPE 2 DIABETES

Yu. A. Demin, M. Yu. Demina

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

*Diabetes mellitus is a global health and social problem of the XXI century due to the pandemic spread of the disease, the third leading cause of mortality in most countries. The moral and social severity of diabetes is mainly due to the development of micro- and macroangiopathy, which significantly reduce the duration and quality of life. Diabetic retinopathy is a major microvascular complication, leading to vision loss and blindness. We used an experimental model of diabetes mellitus type 2 induced by streptozotocin and high-calorie diet.*

*The ability of cryopreserved placental mesenchymal stem cells for intravitreal and systemic administration to reduce the development of dyslipidemia, which can ensure the blocking of the main pathogenetic links in the development of diabetic retinopathy, and thereby to contribute into preservation of the vision in patients with diabetes.*

*There has been experimentally proven therapeutic efficacy of cryopreserved placental mesenchymal stem cells, manifested in a decreased concentration of total lipids and triglycerides by 20 % and 25 % ( $p < 0,05$ ) that opens a perspective trend when treating the diabetic retinopathy by means of preparations of cryopreserved placental mesenchymal stem cells in clinic.*

**Keywords:** cryopreserved placental mesenchymal stem cells, diabetes mellitus, dyslipidemia, diabetic rethinopathy.

## ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У КОРЕКЦІЇ ДИСЛІПІДЕМІЇ В РАЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Проф. Ю. А. Дьомін, М. Ю. Дьоміна

*Цукровий діабет визнано глобальною медико-соціальною проблемою XXI ст. у зв'язку з пандемічним характером поширення захворювання, якому належить третє місце серед основних причин смертності населення в більшості країн. Моральна та соціальна тяжкість цукрового діабету здебільшого зумовлена розвитком мікро- та макроангіопатій, які істотно знижують тривалість і якість життя хворих. Діабетична ретинопатія є одним з основних мікросудинних ускладнень, яке призводить до втрати зору та сліпоти.*

*У роботі використовували модель експериментального цукрового діабету 2 типу, індукованого стрептозоточином та висококалорійною дієтою. Виявлено здатність кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти під час інтравітрального системного введення послаблювати розвиток дисліпідемії, що може забезпечити блокування основних патогенетичних ланок у розвитку діабетичної ретинопатії, і таким чином сприяти збереженню зору у хворих на цукровий діабет.*

*Доведена експериментальна терапевтична ефективність препарату кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти, що виявлялося зниженням концентрації загальних ліпідів та тригліцеридів, відповідно, на 20 і 25 % ( $p < 0,05$ ), що відкриває перспективний напрямок у лікуванні діабетичної ретинопатії препаратами кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти в клініці.*

**Ключові слова:** кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини плаценти, цукровий діабет, дисліпідемія, діабетична ретинопатія.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТКИ В КОРРЕКЦИИ ДИСЛИПИДЕМИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Проф. Ю. А. Демин, М. Ю. Демина

*Сахарный диабет признан глобальной медико-социальной проблемой XXI в. в связи с пандемическим характером распространения заболевания, занимающего третье место среди основных причин смертности населения в большинстве стран мира. Моральная и социальная тяжесть сахарного диабета в основном обусловлена развитием микро- и макроангиопатий, которые существенно снижают продолжительность и качество жизни больных. Диабетическая ретинопатия является одним из основных микрососудистых осложнений, которое приводит к потере зрения и слепоте.*

*В работе использовали модель экспериментального сахарного диабета 2 типа, индуцированного стрептозоточином и высококалорийной диетой. Установлена способность кріоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты при интравитреальном системном введении ослаблять развитие дислипидемии, что может обеспечить блокирование основных патогенетических звеньев в развитии диабетической ретинопатии, и таким образом способствовать сохранению зрения у больных сахарным диабетом.*

*Доказана экспериментальная терапевтическая эффективность препарата кріоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты, которая выражалась снижением концентрации общих липидов и триглицеридов, соответственно, на 20 и 25 % ( $p < 0,05$ ), что открывает перспективное направление в лечении диабетической ретинопатии препаратами кріоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты в клинике.*

**Ключевые слова:** кріоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки плаценты, сахарный диабет, дислипидемия, диабетическая ретинопатия.

Diabetes is a progressive and the most common metabolic disease that has reached epidemic proportions in the 21st century. According to WHO by 2030 diabetes will become the seventh leading cause of death worldwide [6].

Diabetic rethinopathy (DR) is one of the most dangerous complications of diabetes and the most common cause of new cases of blindness (28.5 %) in adults aged from 20 to 74 years [3].

It is known that careful control of glycemia, lipids and blood pressure may reduce the risk of the DR, but is difficult to achieved in clinical practice [12].

Diabetic hyperglycemia and dyslipidemia are major metabolic abnormalities causing the retina degenerations, thus, meanwhile the role of hyperglycemia in the DR induction have been studied in details, much less attention has been paid to investigation of dyslipidemia [2].

Diabetic dyslipidemia is the result of an imbalance in the regulation of lipid, entering, metabolism, release from the adipocyte and removal from circulation. The recently completed clinical studies suggest that dyslipidemia is a critical factor in the DR development both for the 1 and 2 with type diabetes [11]. However, the pathogenetic mechanisms explaining the relationship of traditional lipid parameters (total cholesterol, LDL, triglycerides) to the DR, remained unknown.

**Purpose.** To study the effect of cryopreserved placental mesenchymal stem cells on the lipid profile in rats with type 2 diabetes.

## MATERIALS AND METHODS

The studies were carried out on model of type 2 diabetes mellitus (DM) of adult Wistar male rats of 130–160 g initial weight. Rats were kept in a standard vivarium conditions at a 12 hour daylight or ambient temperature of 20–25 °C, 50–55 % relative humidity. All the manipulations with animals were carried out according to the statements of the «European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes» (Strasbourg, 1986) and the decision of the IV National Congress in Bioethics (Kiev, 2010).

Insulin resistance in rats were modeled within ten weeks by means of high-calorie (high fat and high carbohydrate) diet, which consisted of 15 % fat, 25 % sucrose, 1 % of bile acids that 59.0 % meal recommended for this type of animal: feed stuff, juicy food, salt, fats *ad libitum*; a source of water was cooled boiled water from the city network in glass drinkers [8].

Intact animals within ten weeks received a standard vivarium diet.

Four weeks later the start of the experiment the rats received a high-calorie diet, a citrate solution was intraperitoneally administered streptozotocin at 25 mg/kg of body weight once a week for two weeks. The control animals received intraperitoneally the citrate buffer in a similar pattern [8].

Seven days after the last injection of streptozotocin all the experimental animals were divided into groups.

CPMCP were administered by intravenously in concentration of  $1.1 \times 10^6$  and intravitreally in concentration  $0.1 \times 10^6$  to control animals and rats with type 2 DM induced with high-calorie diet and streptozotocin.

Rats of the «Diabetes + placebo» group received placebo of corresponding volume in a similar way.

Lipid metabolism was studied in the concentration of triglycerides (TG) [5], total lipids [1], total cholesterol [10] and non-esterified fatty acids (NEFA) [4] in the serum with a spectrophotometer Shimadzu UV 1800 (Japan).

## RESULTS

Proceeding from the results of large-scale epidemiological studies the leading risk factors of DR, in addition to the duration of diabetes, hyperglycemia and hypertension, was hyperlipidemia as well [7].

Diabetes mellitus is accompanied by the development of atherogenic dyslipidemia due to activation of triglyceride synthesis in the liver, modification of low density lipoprotein (LDL) levels and decreased high-density lipoprotein (HDL) [9].

Hypertriglyceridemia is a consequence of an increased lipolysis in adipocytes and synthesis of neutral lipids de novo in the liver in conditions of insulin resistance, and, for today, it is one of the independent factors and diagnostic criteria for the metabolic syndrome by classification of WHO, ATP III and IDF.

Our studies have revealed that in placebo-treated diabetic rats there are disorders of lipid metabolism, as evidenced by a significant increase in the concentration of total lipids and triglycerides in the blood serum in respect of the indices of intact control (table. 1), which

Table 1

**Influence CPMSC on concentration of total lipids and triglycerides in blood serum of rats with type 2 diabetes ( $X \pm Sx$ ), n = 6**

| Group              | Dose, mg/kg | Total lipids, g/l                           | Triglycerides, mmol/l                       |
|--------------------|-------------|---|---|
| Intact control     | –           | 1.74 ± 0.11                                 | 1.13 ± 0.18                                 |
| Control + CPMSC    | –           | 1.69 ± 0.11<br>$p_1 > 0.05$                 | 0.95 ± 0.12<br>$p_1 > 0.05$                 |
| Diabetes + placebo | 25          | 2.83 ± 0.14<br>$p_1 < 0.001$                | 2.44 ± 0.27<br>$p_1 < 0.001$                |
| Diabetes + CPMSC   | 50          | 2.25 ± 0.08<br>$p_1 < 0.01$<br>$p_2 < 0.01$ | 1.85 ± 0.11<br>$p_1 < 0.01$<br>$p_2 < 0.05$ |

**Notes:** 1) deviation is significant in respect of the intact control; 2) deviation is significant in respect of the of «Diabetes + placebo» group.

Table 2

**Influence CPMSC on concentration of total cholesterol, HDL cholesterol and NEFA  
in blood serum of rats with type 2 diabetes ( $X \pm Sx$ ),  $n = 6$**

| Group              | Dose, mg/kg | Non-esterified fatty acids,<br>mmol/l | Total cholesterol, mmol/l   | Cholesterol HDL,<br>mmol/l  |
|--------------------|-------------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Intact control     | –           | 0.54 ± 0.03                           | 1.71 ± 0.12                 | 0.72 ± 0.07                 |
| Control + CPMSC    | –           | 0.51 ± 0.02<br>$p_1 > 0.05$           | 1.82 ± 0.09<br>$p_1 > 0.05$ | 0.77 ± 0.04<br>$p_1 > 0.05$ |
| Diabetes + Placebo | 25          | 0.54 ± 0.02<br>$p_1 > 0.05$           | 1.99 ± 0.09<br>$p_1 > 0.05$ | 0.73 ± 0.07<br>$p_1 > 0.05$ |
| Diabetes + CPMSC   | 50          | 0.53 ± 0.04<br>$p_1 > 0.05$           | 1.72 ± 0.10<br>$p_1 > 0.05$ | 0.69 ± 0.06<br>$p_1 > 0.05$ |

**Notes:** 1) deviation is significant in respect of the intact control; 2) deviation is significant in respect of the «Diabetes + placebo» group.

is associated with the development of steatogepatosis and decreased sensitivity to insulin in liver. At the same time, the concentration of total cholesterol, HDL cholesterol and NEFA in serum were not significantly changed in one of the experimental groups (table 2).

The studies have shown that the combined use of CPMSC reduces the concentration of triglycerides and total lipids, respectively by 20 and 25 % ( $p < 0.05$ ), whereas the values for total cholesterol, HDL cholesterol and NEFA in the serum of diabetic rats have remained unchanged.

## CONCLUSIONS

Identification of lipid-lowering properties of CPMSC due to the reduction of hypertriglyceridemia may contribute to the inhibition of destructive processes induced by diabetes in the retina.

Experimental substantiation of application of CPMSC in the treatment of type 2 streptozotocin diabetes opens a promising trend in clinical use of CPMSC in DR treatment.

## REFERENCES

1. Прохорова М. И. Большой практикум по углеводному и липидному обмену / М. И. Прохорова, З. Н. Тупикова. — Л. : Изд-во Ленингр. мед. ун-та, 1965. — 218 с.
2. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats / R. M. Bezerra, M. Ueno, M. S. Silva [et al.] // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130, № 10. — P. 1531–1535.
3. Cunha-Vaz J. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy / J. Cunha-Vaz, L. Ribeiro, C. Lobo // Prog Retin Eye Res. — 2014. — Vol. 41. — P. 90–111.
4. Dumcombe W. C. The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids / W. C. Dumcombe // Biochem. J. — 1963. — Vol. 188. — № 1. — P. 7–10.
5. Fletcher M. J. A colorimetric method for estimating serum triglycerides / M. J. Fletcher // Clin. Chim. Acta. — 1968. — Vol. 22, № 3. — P. 393–397.
6. Global Status Report on Noncommunicable Diseases / World Health Organization. — Geneva, Switzerland : WHO, 2011. — 162 p.
7. Hackam D. G. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence / D. G. Hackam, S. S. Anand // JAMA. — 2003. — Vol. 290. — P. 932–940.
8. Preventive effect of taurine on experimental type 2 diabetic nephropathy / S. Lin, J. Yang, G. Wu [et al.] // J. Of Biomedical Science. — 2010. — Vol. 17, Suppl. 1. — P. 46–56.
9. Taskinen M.-R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice / M.-R. Taskinen // Diabetologia. — 2003. — Vol. 46, № 3. — P. 733–749.
10. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes / L. Badimon, J. J. Badimon, V. Fuster, J. H. Chesebro // N. Engl. J. Med. — 1992. — P. 242–250, 310–318, 326.
11. Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine / Y. Zhang, X. Li, D. Zou [et al.] // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. — 2008. — Vol. 93, № 7. — P. 2559–2565.
12. Ying W. Oxidative stress: implications for the development of diabetic retinopathy and antioxidant therapeutic perspectives / W. Ying, T. Luosheng, C. Baihua // Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2014. — Vol. 2014. — Article ID 752387. — 12 p. — [Режим доступу]: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/752387/>.