

Содержание свободного сфингозина в почечной ткани при введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на фоне развития экспериментальной острой почечной недостаточности

И.А.Комаревцева, В.Н.Сенчий,
Д.А.Фильчуков, Д.В.Бриндак, В.Л.Русалов

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»
Луганск, Украина

Исследование было проведено на 42 белых беспородных крысах. Показано, что развитие острой почечной недостаточности сопровождается накоплением свободного сфингозина в корковом и мозговом веществе почек крыс. Введение аллогенных мезенхимальных стволовых клеток приводило к достоверному снижению уровня свободного сфингозина с 14 суток развития острой почечной недостаточности как в корковом, так и в мозговом веществе почек.

Ключевые слова: почки, острая почечная недостаточность, мезенхимальные стволовые клетки, сфингозин.

ВВЕДЕНИЕ

Сфинголипиды, компоненты клеточных мембран, являются предшественниками активных метаболитов, играющих существенную роль в развитии ткани, онкогенезе, дифференцировке и апоптозе клеток. Распад сфинголипидов происходит под действием мембраносвязанной нейтральной сфингомиелиназы, активность которой регулируется различными цитокинами. Образующиеся при этом церамид и сфингозин (СФГ) являются вторичными мессенджерами во многих метаболических путях [1, 2, 4].

Свободный СФГ был найден в печени, почках крыс и мышей, в клетках HL-60, нейтрофи-

лах и других тканях [5]. Установлено, что он является эндогенным ингибитором протеинкиназы С и оказывает ингибирующий эффект на многие клеточные функции, зависящие от активности этого фермента, включая процессы пролиферации, дифференцировки и программируемой гибели клеток. СФГ способен изменять структуру хроматина и вторичную структуру ДНК, конкурируя с гистонами и некоторыми ферментами и транскрипционными факторами за места связывания с матрицей, в зависимости от концентрации увеличивать или уменьшать степень метилирования ДНК, при некоторых условиях стимулирует образование негативного модулятора роста цАМФ [1]. Доказана роль СФГ в стимуляции апоптоза, развивающегося при радиационном облучении, действии TNF- α [6].

В почках при ишемии-реперфузии происходит активация сфингомиелинового сигнального пути апоптоза за счет повышения цитозольной концентрации ионов кальция. В работе M.Iwata и соавт. [7] показано, что добавление в культивируемые клетки канальцев почек сфингозина, его метаболитов и церамида вызывало острое клеточное повреждение. Эффект был дозозависимым: цитотоксические дозы приводили к некротической форме гибели, без признаков апоптоза.

Целью исследования было изучить содержание свободного сфингозина в корковом и мозговом веществе почек при экспериментальной острой почечной недостаточности на фоне введения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток.

Статья является фрагментом научной программы МОЗ Украины «Механизмы апоптоза в культурах клеток и репаративные процессы в тканях» (№ государственной регистрации 0107U001159) согласно плану научных работ ГЗ «Луганский государственный медицинский университет».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на белых беспородных половозрелых самцах крыс массой 250 ± 30 г в лабораториях кафедры медицинской химии ГЗ «Луганский государственный медицинский университет». У животных формировали острую почечную недостаточность (ОПН) по модели ишемия/реперфузия за счет пережатия почечной ножки в течение 30 мин. Операцию проводили под тиопенталовым наркозом в стерильных условиях. У интактных животных проводили двухсторонние надрезы кожи и мышц в области спины.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) получали из костного мозга бедренных и большеберцовых костей. Культивирование клеток проводили в среде Игла MEM, обогащенной L-глутамином, 10% эмбриональной телячьей сывороткой и с добавлением антибиотиков в течение 12 дней со сменой S среды каждые 5 сут. Плотность посадки клеток составляла 2000 кл/см². Культивирование в стандартных условиях проводили при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в HF151UV CO₂-инкубаторе.

В течение всего срока культивирования проводили фенотипирование выращиваемой культуры клеток непрямой иммунофлуоресцентным методом с использованием специ-

фических маркеров к мезенхимальным стволовым клеткам: моноклональных антител CD44, CD54, CD90, меченных FITC и CD73 (SH3/4) и CD105 (SH2), меченных фикоэритрином (Sigma или BD Biosciences, США), а также маркеров к гемопоэтическим стволовым клеткам CD34 и CD45, меченным FITC (Sigma). Микроскопию проводили с помощью люминесцентного микроскопа MC300 (Micros Austria) при 400-кратном и 1000-кратном увеличении, для съемок использовали видеокамеру CAM400 (Micros Austria) с использованием программного обеспечения Bio Vision version 2.0.

Для выделения свободного сфингозина нами был использован метод, описанный М.И.Прохоровой [3], основанный на экстракции сфингоидных оснований диэтиловым эфиром. Пробы спектрофотометрировали при $\lambda=415$ нм. Количество свободного сфингозина определяли по калибровочной кривой стандартного раствора сфингозина (Amersham) в пересчете на мг белка в ткани.

Введение мезенхимальных стволовых клеток проводили однократно через 1 ч после формирования ОПН. Количество вводимых клеток одному животному составило 5 миллионов клеток. Клетки вводили внутривенно в хвостовую вену крыс. Животные были разделены на три группы: интактная, контрольная (формирование ОПН) и опытная (формирование ОПН и введение МСК). Все исследования проводились в динамике на 3, 14, 28 сут. после формирования ОПН в корковом и мозговом веществе почек крыс.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

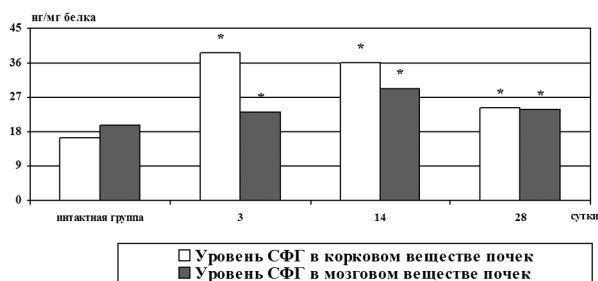


Рис. 1. Динамика содержания сфингозина в корковом и мозговом веществе почечной ткани при экспериментальной ОПН.

Примечание: * — показатели достоверны относительно интактной группы ($p < 0,05$).

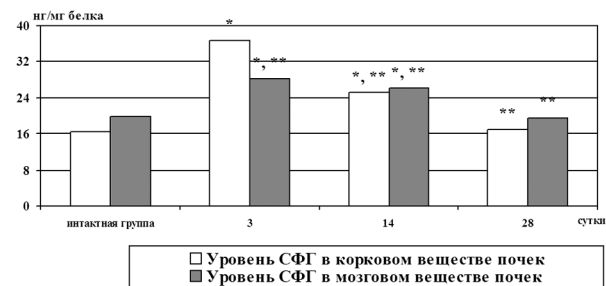


Рис. 2. Динамика содержания сфингозина в корковом и мозговом веществе почечной ткани при введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на фоне экспериментальной ОПН.

Примечания: * — показатели достоверны относительно интактной группы ($p < 0,05$); ** — показатели достоверны относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований установлено, что уровень свободного СФГ в контрольной группе животных достоверно повышался ($p < 0,05$) в корковом и мозговом веществе почек во всех сутках эксперимента в сравнении с показателями интактной группы крыс (рис. 1).

На 3 сут. после формирования ОПН в корковом веществе контрольной группы животных уровень СФГ вырос в 2,36 раза в сравнении с интактными животными. На 14 сут. эксперимента уровень свободного СФГ составлял $36,11 \pm 2,09$ нг/мг белка, что было в 2,21 раза выше интактного значения. На 28 сут. содержание СФГ достоверно снижалось, но не достигало показателей интактных животных (в 1,49 раза выше).

В мозговом веществе почек крыс контрольной группы уровень СФГ постепенно увеличивался на 3 и 14 сут., в 1,17 и 1,48 раза соответственно превышая содержание СФГ в интактной группе. На 28 сут. после формирования ОПН уровень СФГ понижался, но, как и в корковом веществе, оставался достоверно выше значений интактной группы. В сравнении с интактными животными содержание СФГ в мозговом веществе почек на 28 сут. было выше в 1,21 раза соответственно.

При введении МСК в опытной группе крыс уровень свободного СФГ в корковом и мозговом веществе почек в сравнении с контрольной группой снижался, приближаясь на 28 сут. к показателям интактной группы животных (рис. 2).

В опытной группе в корковом веществе почек на 3 сут. эксперимента наблюдалось повышение уровня свободного СФГ (в 2,25 раза в сравнении с интактной группой). В дальнейшем определялось постепенное снижение содержания СФГ: на 14 сут. уровень СФГ превышал интактный показатель в 1,53 раза, на 28 сут. уровень свободного СФГ приближался к показателю крыс интактной группы. В мозговом веществе животных опытной группы в сравнении с интактными крысами уровень СФГ на 3 сут. увеличивался на 42,7%, на 14 сут. — на 32,1%. На 28 сут. уровень СФГ достоверно приближался к показателю интактных животных ($p < 0,05$).

В мозговом веществе животных опытной группы в сравнении с интактными крысами уровень СФГ на 3 сут. увеличивался на 42,7%, на 14 сут. — на 32,1%. На 28 сут. уровень СФГ достоверно приближался к показателю интактных животных ($p < 0,05$).

Анализируя данные контрольной и опытной групп, можно отметить, что в корковом и мозговом веществе почек животных опытной группы с 14 сут. эксперимента наблюдается достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня свободного СФГ. Различный уровень снижения свободного СФГ в корковом и мозговом веществе под влиянием МСК можно объяснить тем, что в корковом веществе преобладают аэробные пути метаболизма и более развита сосудистая сеть, в мозговом веществе — анаэробные пути. Также это может быть связано с неравномерным распределением МСК в ранние сроки после их введения. Так, по данным S.Kale, A.Karihaloo и соавт., меченные Lin-Sca1+ костномозговые стволовые клетки в первые дни после ишемии-реперфузии находились во внешнем слое мозгового вещества и лишь с течением времени появлялись в корковом веществе почек [8].

ВЫВОДЫ

Установлено, что острая почечная недостаточность сопровождается накоплением свободного сфингозина в корковом и мозговом веществе почек. Под влиянием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток происходит снижение уровня свободного сфингозина на 14 и 28 сут. в корковом веществе на 30,6% и 30,4% соответственно и в мозговом веществе на 10,7% и 18,2% соответственно. Перспективами дальнейшего исследования является определение уровня выживания стволовых клеток в почечной ткани при остром ишемическом стрессе и дальнейшее восстановление функций почек путем анализа содержания свободного сфингозина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермоленко В.М. Острая почечная недостаточность / В.М.Ермоленко, А.Ю.Николаев. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 240 с.
2. Орлова О.А. Динаміка зміни концентрації сфінгомієліна і фрагментації ДНК в клітинах ниркової тканини при експериментальній гострій нирковій недостатності / О.А.Орлова // Український журнал екстремальної медицини ім. Г.О.Можаєва. — 2001. — №4. — С. 60-63.
3. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 178 с.
4. Divecha N. Phospholipid signaling / N.Divecha, R.F.Irvine // Cell. — 1995. — Vol.80. — №2. — P. 269-278.
5. Hannum Y.A. Ceramide: an intra-cellular signal for apoptosis / Y.A.Hannum, L.M.Obeid // Trends Biochem. Sc. — 1995. — Vol. 20. — №2. — P. 73-77.

6. Kolesnik R.N. The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas and ionizing radiation/ R.N.Kolesnik, A.Haimovitz-Freidman, Z.Fuks // Biochem. Cell. Biol. — 1994. — Vol. 72. — №4. — P. 471-474.
7. Iwata M. Sphingosine: A mediator of acute renal tubular injury and subsequent cytoresistance / M.Iwata, I.H.Prington, R.A.Zager // Proc. Natl. Acad. Set. USA. — 1995. — Vol. 92. — №4. — P. 8970-8974.
8. Goligorsky M.S. Whispers and shouts in the pathogenesis of acute renal ischaemia / M.S.Goligorsky // Nephrology Dialysis Transplantation. — 2005. — Vol. 20(2). — P. 261-266.

І.О.Комаревцева, В.М.Сенчій, Д.О.Фільчуков, Д.В.Бріндак, В.Л.Русалов. *Вміст вільного сфінгозину в нирковій тканині при введенні аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин на фоні розвитку експериментальної гострої ниркової недостатності. Луганськ, Україна.*

Ключові слова: нирки, гостра ниркова недостатність, мезенхімальні стовбурові клітини, сфінгозин.

Дослідження було проведено на 42 білих безпородних щурах. Показано, що розвиток гострої

ниркової недостатності супроводжується накопиченням вільного сфінгозину в кірковій та мозковій речовині нирок щурів. Введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин призводило до достовірного зниження рівня вільного сфінгозину з 14 доби розвитку гострої ниркової недостатності як у кірковій, так і в мозковій речовині нирок.

I.A.Komarevtseva, V.N.Senchiy, D.A.Filchukov, D.V.Brindak, V.L.Rusalov. *The content of free sphingosine in kidney tissue with the introduction of allogenic mesenchymal stem cells in experimental acute renal failure. Lugansk, Ukraine.*

Key words: kidney, acute renal failure, mesenchymal stem cells, sphingosine.

The investigation was conducted on 42 white rats. It is shown that the development of acute renal failure is accompanied by accumulation of free sphingosine in the cortex and medulla of kidneys of rats. The introduction of allogenic mesenchymal stem cells led to a significant reduction in the level of free sphingosine on 14 day of acute renal failure in both the cortical and medulla of the kidneys.

Надійшла до редакції 13.09.2012 р.