

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ВВЕДЕНИИ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**Комаревцева И.А., Фильчуков Д.А., Сенчий В.Н., Бриндак Д.В., Шпилова И.В.***ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»*

Причиной возникновения окислительного стресса у больных острой почечной недостаточностью (ОПН) является снижение эффективности антиоксидантных систем организма, увеличение активности прооксидантных систем, продукции свободных радикалов. Окислительный стресс является неотъемлемой составляющей ОПН. Несмотря на давность изучения данного вопроса, имеющиеся в литературе данные неоднозначны. О наличии оксидативного стресса свидетельствует повышенный уровень продуктов окисления углеводов, липидов и белков в плазме и тканях больных, в том числе и почечной ткани [1, 2, 3].

В современных исследованиях показано, что клеточные технологии за счет стимуляции регенераторных процессов позволяют существенно улучшить состояние органов мочеполовой системы не только при их хроническом повреждении, но и при острых заболеваниях. Стимуляция регенераторного потенциала ишемизированной почки достигается введением стволовых клеток, полученных из костного мозга, как непосредственно в орган, так и в системный кровоток. Это предупреждает гибель животных от острой почечной недостаточности и ускоряет восстановление функциональной полноценности почки в постишемическом периоде [2, 3, 7, 8].

Считается, что при окислительном стрессе атаке активными формами кислорода подвергаются в первую очередь белки плазматических мембран, которые затем являются потенциальными стимуляторами перекисного окисления липидов. В ряде исследований процесс окислительной модификации белка рассматривается как одна из возможных причин инактивации ферментов, изменении структурной организации белков при состоянии окислительного стресса [4, 5]. В настоящее время разработаны методы оценки спонтанного окисления белков, характеризующего окислительный потенциал организма, и стимулированного, который указывает на степень резервно-адаптационных возможностей.

Целью нашего исследования было изучить в динамике состояние процессов перекисного окисления белков в корковом и мозговом веществе почек при экспериментальной острой почечной недостаточности на фоне введения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток. Статья является фрагмен-

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

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на белых беспородных половозрелых крысах самцах массой 250±30 г в лабораториях кафедры медицинской химии ДЗ «Луганский государственный медицинский университет». У животных формировали острую почечную недостаточность (ОПН) по модели ишемия /реперфузия – за счет пережатия почечной ножки в течение 30 минут. 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 ½ среды каждые 5 суток. Плотность посадки клеток составляла 2000 кл/см². Культивирование в стандартных условиях проводили при температуре 37° в атмосфере 5% углекислого газа в CO₂ – инкубаторе.

В течение всего срока культивирования проводили фенотипирование выращиваемой культуры клеток непрямим иммунофлюоресцентным методом с использованием специфических маркеров к мезенхимальным стволовым клеткам: моноклональных антител CD44, CD54, CD90, меченных FITC и CD73 (SH3/4) и CD105 (SH2), меченых фикоэритрином (Sigma или BD Biosciences, США), а также маркеров к гемопоэтическим стволовым клеткам CD34 и CD45, мечеными FITC (Sigma). Микроскопию проводили с помощью люминисцентного микроскопа MC300 (Micros Austria).

Интенсивность процессов перекисного окисления белков (ПОБ) определяли спектрофотометрическим методом по уровням ранних маркеров – альдегидфенилгидразона (АФГ) при λ=270 нм, и поздних – кетондинитрофенилгидразона (КФГ) при λ=363 нм

[6]. Концентрации АФГ и КФГ спонтанной и индуцированной (металлкатализируемой) окислительной модификации белков (ОМБ) рассчитывали по приведенным в методике формулам.

Введение мезенхимальных стволовых клеток проводили однократно через один час после формирования ОПН. Количество вводимых клеток одному животному составило 5 миллионов клеток. Клетки вводили внутривенно в хвостовую вену крыс. Животные были подразделены на три группы: интактная, контрольная (формирование ОПН) и опытная (формирование ОПН и введение МСК). Все

исследования проводились в динамике на 3, 14, 28 сутки после формирования ОПН в корковом и мозговом веществе почек крыс.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате наших исследований установлено, что уровень перекисного окисления белков (ПОБ) в контрольной группе животных достоверно повышался ($p < 0,05$) в корковом веществе почек во всех сутках эксперимента в сравнении с показателями интактной группы крыс (Табл. 1).

Таблица 1. Показатели активности спонтанного и индуцированного ПОБ в корковом веществе почечной ткани при экспериментальной ОПН на фоне введения МСК (усл. ед.).

Группа	Сутки	АФГ		КФГ	
		СПОБ	ИПОБ	СПОБ	ИПОБ
Интактная группа	–	3,16±0,22	1,64±0,14	4,04±0,36	2,61±0,26
ОПН	3	6,33±0,36 *	2,72±0,11 *	7,19±0,31*	3,56±0,17 *
	14	5,28±0,38 *	2,27±0,13 *	6,90±0,29 *	3,37±0,15 *
	28	3,96±0,30 *	1,94±0,12 *	4,96±0,37 *	3,04±0,13 *
ОПН + МСК	3	5,90±0,28 *	2,66±0,11*	6,97±0,23*	3,46±0,14 *
	14	4,46±0,35 *,**	1,88±0,07 *,**	6,01±0,31*,**	2,95±0,09*,**
	28	3,22±0,24 **	1,61±0,11**	4,21±0,25**	2,69±0,19

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

Результаты исследований показали, что при развитии экспериментальной ОПН активизируются процессы нерегулируемой перекисидации белков. На это указывает накопление в исследуемой ткани продуктов белковой деструкции в виде альдегид- и кетопроизводных, являющихся маркерами окислительной модификации мембранных протеинов. Особенно выражено это наблюдалось на 3 сутки эксперимента.

Введение МСК в опытной группе животных достоверно снижало в сравнении с контрольной группой содержание альдегидфенилгидразона и кетондинитрофенилгидразона

спонтанного и индуцированного ПОБ на 14 сутки после формирования ОПН, а на 28 сутки их концентрации приближались к показателям интактной группы.

В мозговом веществе почечной ткани животных контрольной группы концентрация альдегидфенилгидразона и кетондинитрофенилгидразона спонтанного ПОБ повышалась на всех сроках наблюдения; содержание АФГ и КФГ индуцированной окислительной модификации белков также было достоверно повышено на 3 и 14 сутки после формирования ОПН, а на 28 сутки – приближалось к показателям интактной группы (Табл. 2).

Таблица 2. Показатели активности спонтанного и индуцированного ПОБ в мозговом веществе почечной ткани при экспериментальной ОПН на фоне введения МСК (усл. ед.).

Группа	Сутки	АФГ		КФГ	
		СПОБ	ИПОБ	СПОБ	ИПОБ
Интактная группа	–	2,87±0,26	1,57±0,05	3,89±0,23	2,28±0,18
ОПН	3	4,93±0,16 *	2,82±0,11 *	5,96±0,21*	3,34±0,17*
	14	4,68±0,18 *	2,37±0,13 *	6,31±0,13*	2,99±0,15*
	28	3,46±0,14 *	1,64±0,12	4,46±0,17*	2,46±0,23
ОПН + МСК	3	4,9±0,28 *	2,66±0,11*	5,77±0,23*	3,36±0,14*
	14	3,86±0,25 *,**	1,91±0,07*,**	5,3±0,11*,**	2,58±0,16**
	28	3,02±0,24 **	1,6±0,11	4,01±0,15**	2,22±0,19

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

Введение мезенхимальных стволовых клеток снижало интенсивность процессов окислительной модификации протеинов в мозговом веществе почечной ткани уже на 14 сутки, на что указывает уменьшение содер-

жания ранних и поздних маркеров (АФГ и КФГ соответственно) перекисного окисления белков.

Анализируя данные контрольной и опытной групп, можно отметить, что в корковом и

мозговом веществе почек животных опытной группы с 14 суток эксперимента наблюдается достоверное ($p < 0,05$) снижение интенсивности процессов ОМБ. Возможно, это осуществляется за счет активации ферментов антиоксидантной защиты.

Выводы: Установлено, что острая почечная недостаточность сопровождается накоплением ранних и поздних маркеров спонтанной и индуцируемой окислительной модификации белков в корковом и мозговом веществе почек, что можно объяснить истощением резервно-адаптационных возможностей кле-

ток в условиях исследуемого ишемического состояния. Под влиянием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток происходит снижение интенсивности процессов перекисного окисления белков на 14-е и 28-е сутки в корковом и в мозговом веществе почечной ткани. Перспективами дальнейшего исследования является определение уровня выживания стволовых клеток в почечной ткани при остром ишемическом стрессе и дальнейшее восстановление функций почек путем анализа содержания окислительно-модифицированных белков.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ермоленко В.М. Острая почечная недостаточность / В. М. Ермоленко, А. Ю. Николаев // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 240 с.
2. Humphreys B.D. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury / B.D. Humphreys, J.V. Bonventre // An. Rev. Med. – 2008. – Vol. 59. – P.311–325.
3. Kogon A. Acute kidney injury in hematopoietic cell transplantation / A. Kogon, S. Hingorani // Semin. Nephrol. – 2010. – Vol. 30. – P.615–626.
4. Каримов И.З. Окислительная модификация белков и перекисное окисление липидов в развитии метаболической интоксикации при патологии / И.З. Каримов // Лабораторная диагностика. – 2005. – Т. 31, № 1. – С. 7–13.
5. Токсикологические последствия окислительной модификации белка при различных патологических состояниях (Обзор литературы) / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий [и др.] // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – № 3. – С. 20–26.
6. До механізму антиоксидантної дії деяких похідних 4-гідразинохіназоліну в умовах моделювання порушення мозкового кровообігу (ГПМК) за типом ішемічного інсульту / І.В. Сидорова, І.Ф. Беленичев, С.І. Коваленко [та ін.] // Ліки. – 2005. – № 1-2. – С.52–58.
7. Abdel A. Mesenchymal Stem Cells Therapy in Acute Renal Failure: Possible Role of Hepatocyte Growth Factor / Abdel Aziz M., Wassef M. // J Stem Cell Res Ther. – 2011. – Vol. 1. – P. 109-116.
8. Mohamed M.I. Effect of human umbilical cord blood progenitor cells versus mononuclear cells on acute renal failure at model / M.I. Mohamed, F.M. Attia, K.A. Atwa // Curr Stem Cell Res Ther. – 2011. – V.6. – P.362-367.

Комаревцева И.А., Фильчуков Д.А., Сенчий В.Н., Бриндак Д.В., Шпилова И.В. Динамика содержания окислительно-модифицированных белков в почечной ткани при введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 5. – С. 94-96.

Исследование было проведено на 56 белых беспородных крысах. Показано, что при развитии острой почечной недостаточности активизируются процессы нерегулируемой перекисной окисления белков. Введение аллогенных мезенхимальных стволовых клеток приводило к достоверному снижению процессов окислительной модификации белков 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, перекисное окисление белков.

Комаревцева І.А., Фільчуков Д.А., Бриндак Д.В., Шпілова І.В. Динаміка вмісту окисномодифікованих білків у нирковій тканині при введенні алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в експерименті // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 5. – С. 94-96.

Дослідження було проведено на 56 білих беспородних щурах. Показано, що при розвитку гострої ниркової недостатності активізуються процеси нерегульованої перекисної окислення білків. Введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин призводило до достовірного зниження процесів окисної модифікації білків з 14 доби розвитку гострої ниркової недостатності, як у кірковій, так і в мозковій речовині нирок.

Ключові слова: нирки, гостра ниркова недостатність, мезенхімальні стовбурові клітини, перекисне окислення білків.

Komarevtseva I.A., Filchukov D.A., Brindak D.V., Shipilova I.V. Dynamics of oxidative modified proteins in renal tissue with the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells in experiment // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 5. – С. 94-96.

The investigation was conducted on 56 white rats. It is shown that the development of acute renal failure, uncontrolled processes activated protein peroxidation. Introduction of allogeneic mesenchymal stem cells led to a significant reduction of oxidative modification of proteins on 14 day of acute renal failure in both the cortical and medulla of the kidneys.

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

Надійшла 07.09.2012 р.

Рецензент: проф. Н.К.Казимірко