

## ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 612.649.011.87:615.014.41:616.13.14-018.74:616.12-008.331-053

*Л.В. Бабийчук\**, *В.Г. Бабийчук\**, *Л.А. Сиротенко\*\**, *Н.Г. Малова\*\**, *С.Н. Коваль\*\*\***\*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков**\*\*ГУ «Институт проблем эндокринной патологии имени В.Я. Данилевского  
НАМН Украины», г. Харьков**\*\*\*ГУ «Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой НАМН Украины»,  
г. Харьков***ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК  
КОРДОВОЙ КРОВИ НА УРОВЕНЬ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ  
ОБМЕНА ОКСИДА АЗОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС  
РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП  
НА ФОНЕ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

Стресс-индуцированная артериальная гипертензия сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции, что подтверждается снижением уровня конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови молодых и старых животных, а также выраженным повышением артериального давления. Данные изменения проявляются уже на ранних стадиях заболевания. Введение криоконсервированного препарата ядросодержащих клеток кордовой крови приводит к нормализации системы локальной регуляции гомеостаза и сосудистого тонуса.

**Ключевые слова:** *ядросодержащие клетки кордовой крови, стресс-индуцированная артериальная гипертензия, оксид азота, дисфункция эндотелия.*

Стресс и стресс-индуцированные состояния, прежде всего тревога и депрессия, являются независимыми факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Они значительно повышают вероятность неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов: инфаркта миокарда, мозгового инсульта, угрожающих жизни аритмий, внезапной кардиальной смерти [1].

Одной из наиболее распространенных причин структурно-функциональной перестройки сердечно-сосудистой системы является эссенциальная артериальная гипертензия. Сердце и сосуды – основные мишени поражения при данном заболевании [2].

Оксид азота (NO) является основным вазодилататором, препятствующим тоническому сокращению сосудов нейронального, эндокринного или локального происхождения [3, 4]. В физиологических условиях преобладает освобождение релаксирующих фак-

торов. При различных сердечно-сосудистых заболеваниях способность эндотелиальных клеток выделять релаксирующие факторы уменьшается, тогда как образование сосудосуживающих факторов сохраняется или увеличивается, то есть формируется состояние, определяемое как дисфункция эндотелия [5, 6].

Проникая в эндотелиальные клетки и сосуды гладких мышц, NO активирует циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат, снижает содержание внутриклеточного кальция, опосредует эффекты других вазодилататоров (брадикинина, ацетилхолина, гистамина), ингибирует синтез эндотелина-1, ограничивает высвобождение норадреналина. Кроме эффекта вазодилатации, NO тормозит пролиферативные процессы в сердце и сосудах, оказывает корригирующее влияние на апоптоз, мощное противовоспалительное и антитромбогенное действие, тормозит агре-

гацию и адгезию тромбоцитов, обладает антиоксидантными свойствами. Оксид азота синтезируется из L-аргинина под влиянием конститутивной (эндотелиальной и нейрональной) и индуцибельной NO-синтаз [7, 8].

В реализации гипертензивного действия симпатикотонии большое значение имеют опосредованные эффекты симпатического отдела вегетативной нервной системы. Наиболее существенным является неблагоприятное воздействие катехоламинов на эндотелий, проявляющееся в торможении синтеза NO и усилении образования эндотелина-1, приводящее к повышению общего периферического сосудистого сопротивления.

На сегодняшний день лечение сердечно-сосудистых заболеваний прошло большой путь от медикаментозной коррекции и хирургического вмешательства до регенерационной терапии стволовыми клетками. Идея регенеративной терапии с использованием как собственных клеток пациента, так и стволовых клеток донора или клеточных культур, а также специфических факторов роста, которые стимулируют выход стволовых клеток в периферический кровоток, на сегодняшний день стала реальностью [9].

В связи с изложенным целью данного исследования была оценка изменения уровня NO в сыворотке крови экспериментальных животных на фоне неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензии (АГ) до и после введения криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови.

**Материал и методы.** Эксперименты проведены на белых молодых (6-месячных) и старых (28–30-месячных) нелинейных крысах-самцах в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными Первым Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласованными с положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Каждая возрастная группа животных была разделена на три подгруппы: 1-я – 6- и 28–30-месячные интактные крысы; 2-я – 6- и 28–30-месячные крысы с неврогенной стресс-индуцированной АГ; 3-я – 6- и 28–30-месячные животные с АГ после введения криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови.

Неврогенную стресс-индуцированную АГ моделировали по методу [10] до получения

стойких повышенных цифр артериального давления (АД): у старых крыс до  $(179,25 \pm 2,29)$  мм рт. ст., у молодых крыс до  $(161,98 \pm 5,47)$  мм рт. ст., путем комплексного периодического воздействия на организм животных различными видами раздражителей – светового, звукового, электрического. Гипертензию контролировали по стабильно высокому по сравнению с контрольными животными АД, которое измеряли непрямым методом по принципу медицинской тонометрии, с помощью электрокардиографа «Поли-Спектр» (компания «Нейрософт», Россия), используя специальные прижимные манжетки и датчики пульса кровеносных сосудов хвоста животного.

Животным со стресс-индуцированной АГ вводили криоконсервированный препарат ядродержащих клеток кордовой крови, полученный в Институте проблем криобиологии и криомедицины [11, 12]. Выделение фракции ядродержащих клеток из кордовой крови проводили методом седиментации в растворе декстрана Д-60. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксидомид в конечной концентрации 5%. Фенотип клеток  $CD45^+$ ,  $CD45^+CD34^+$ , а также их жизнеспособность ( $CD45^+7AAD^-$ ,  $CD34^+7AAD^-$ ) определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur Becton Dickinson, США) с использованием реагентов BD по ISHAGE протоколу фирмы Becton Dickinson. Препарат представляет собой взвесь криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови в аутоплазме с концентрацией стволовых  $CD34^+$  клеток  $(2-4) \cdot 10^5$  в 1 мл. Размороженный препарат вводили внутрибрюшинно, однократно в дозе  $1 \cdot 10^5$   $CD34^+$  клеток на килограмм массы на 7-е сутки после развития АГ.

Суммарные метаболиты NO определяли спектрофотометрическим методом нитрит-иона [13], основанным на реакции нитритов с реактивом Грисса.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации на 3, 7 и 30-е сутки после развития стойкой АГ и введения препарата ядродержащих клеток кордовой крови.

При статистической обработке результатов использовали критерии В. Шапиро–Уилка, Ф. Фишера, Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  [14].

**Результаты и их обсуждение.** Оксид азота играет важную роль в регуляции ко-

ронарного кровотока. Умеренный стресс увеличивает продукцию NO, а при длительном и интенсивном раздражении генерация NO снижается, и этот факт, очевидно, может быть одной из важных причин возникновения стрессорного коронарспазма [3, 4].

При исследовании уровня суммарных метаболитов NO в сыворотке крови было обнаружено, что у старых животных через 3 дня после развития АГ происходило достоверное повышение этого показателя практически в два раза (табл. 1). Можно предположить, что первоначальное повышение

и прогрессировании патологического состояния (табл. 1 и 2).

Спустя месяц уровень суммарных метаболитов NO в сыворотке крови старых животных со стресс-индуцированной АГ был достоверно ниже значений контрольных животных при сохраняющейся тенденции к повышению показателей АД. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии устойчивого патологического процесса и невозможности организма реагировать посредством образования NO на вазодилатацию сосудов.

Таблица 1. Содержание суммарных метаболитов NO в сыворотке крови молодых и старых крыс с неврогенной стресс-индуцированной АГ до и после введения криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК)

Группа	Концентрация суммарных метаболитов NO у крыс, ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ ) мкМ/л	
	старых	молодых
Контроль	14,13±0,69	17,12±1,23
3 дня с гипертензией	33,9±4,24*	19,90±0,75*
7 дней с гипертензией	13,00±0,86*	14,40±1,65*
1 месяц с гипертензией	12,80±0,88	13,70±0,97
3 дня после введения ЯСК КК	18,77±2,60*	20,29±1,23*
7 дней после введения ЯСК КК	19,83±3,39	17,87±0,86
1 месяц после введения ЯСК КК	17,94±1,74*	17,51±1,90

Примечание. \*  $p < 0,05$ .

суммарных метаболитов NO является компенсаторной реакцией организма старых животных на стресс. В эти сроки показатели АД составляли (177,3±3,1) мм рт. ст (табл. 2).

Через 3 дня после введения старым гипертонивным животным криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови содержание суммарных ме-

Таблица 2. Показатели АД у молодых и старых крыс с неврогенной стресс-индуцированной АГ до и после введения криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК)

Группа	Показатели АД, мм рт. ст., у крыс	
	старых	молодых
Контроль	103,92±2,96	99,72±3,57
Гипертоническая болезнь	179,25±2,29*	161,98±5,47*
3 дня с гипертензией	177,3±3,1*	154,11±7,7*
7 дней с гипертензией	165,0±5,4*	159,34±7,34
1 месяц с гипертензией	157,5±2,5*	145,0±2,89*
3 дня после введения ЯСК КК	153,63±10,75*	139,23±11,83
7 дней после введения ЯСК КК	138,34±6,67	119,38±15,63
1 месяц после введения ЯСК КК	113,75±3,75*	115±2,89*

Примечание. \*  $p < 0,05$ .

На 7-е сутки после развития АГ уровень суммарных метаболитов NO резко снижался, а цифры АД достоверно превышали контрольные значения, что может свидетельствовать об ингибировании NO-синтазы массивного образования NO в ранние сроки

таболитов NO в сыворотке крови и значения АД были достоверно выше контрольных показателей.

На 7-е сутки и через 1 месяц после введения криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови уро-

вень суммарных метаболитов NO в сыворотке крови старых крыс был достоверно выше по отношению к контролю, а показатели АД снижались и соответствовали контрольным показателям. На основании полученных экспериментальных данных можно предположить, что вводимый старым животным с АГ криоконсервированный препарат ядродержащих клеток кордовой крови способен стимулировать выработку NO-синтазы в ответ на стрессорное воздействие организма, вследствие чего образование NO происходит постепенно, не истощая резервы сосудистого эндотелия, при этом показатели АД возвращаются к нормальным значениям.

У молодых крыс на 3-и сутки после развития стойкой АГ в сыворотке крови отмечалось повышение содержания суммарных метаболитов NO, однако не столь существенное, как у старых животных. Достоверно возрастали показатели АД (табл. 1 и 2).

Через 7 дней и 1 месяц после развития АГ имело место достоверное снижение уровня суммарных метаболитов NO. Показатели АД в эти сроки наблюдения оставались достоверно высокими.

Уже через 3 дня после введения молодым животным со стресс-индуцированной АГ криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови отмечалось значительное повышение содержания суммарных метаболитов NO в сыворотке крови. На фоне описанных изменений уменьшались показатели АД. На 7-е сутки и через 1 месяц

после введения препарата уровень NO соответствовал контрольным показателям, а уровень АД снижался до значений контрольных животных.

### Выводы

1. Активность NO, являющегося патогенетическим регуляторным фактором, существенно снижается у молодых и старых крыс на фоне неврогенной стресс-индуцированной АГ. Очевидно, в связи с выраженными в той или иной степени дистрофическими процессами эндотелия сосудов у животных с АГ способность клеток к синтезу NO снижена.

2. Установлено, что введение экспериментальным животным с АГ криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови сопровождается повышением содержания нитритов в сыворотке крови, что, по нашему мнению, является положительным фактором, поскольку направлено на коррекцию дисбаланса системы локальной регуляции гомеостаза и сосудистого тонуса. Выявленные изменения являются физиологически значимыми, поскольку улучшают функцию сосудов и миокарда.

**Перспективным** является дальнейшее изучение влияния криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови на механизмы поддержания сосудистого гомеостаза организма при патологических состояниях.

### Литература

1. Дроздова И.В. Психоземotionalный стресс как фактор риска у больных артериальной гипертензией / И.В. Дроздова, В.А. Дроздов // Международный медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 39–44.
2. Гаврилюк В.А. Структурно-функциональное ремоделирование сердца и сосудов у больных с эссенциальной артериальной гипертензией с различной массой тела / В.А. Гаврилюк // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 39–41.
3. Затейщикова А.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение / А.А. Затейщикова, Д.А. Затейщиков // Кардиология. – 1998. – № 9. – С. 68–81.
4. Зотова И.В. Синтез оксида азота и развитие атеросклероза / И.В. Зотова, А.А. Затейщикова, Б.А. Сидоренко // Кардиология. – 2002. – № 4. – С. 58–67.
5. Коркушко О.В. Эндотелиальная дисфункция. Клинические аспекты проблемы / О.В. Коркушко, В.Ю. Лишневецкая // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – № 2. – С. 4–14.
6. Faraci F.M. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels / F.M. Faraci, D.D. Heistad // Physiol Rev. – 1998. – Vol. 78 (1). – P. 53–97.
7. Rongen G.A. Endothelium and the regulation of vascular tone with emphasis on the role of nitric oxide. Physiology, pathophysiology and clinical implications / G.A. Rongen, P. Smits, T. Thien // Neth. J. Med. – 1994. – Vol. 44 (1). – P. 26–35.

8. *Малая Л.Т.* Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы / Л.Т. Малая, А.Н. Корж, Л.Б. Балковая. – Харьков: Торсинг, 1999. – 432 с.

9. Клеточная терапия сердечной недостаточности: клинический опыт, проблемы и перспективы / Т.Н. Кочегура, А.Ю. Ефименко, Ж.А. Акопян, Е.В. Парфенова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, № 2. – С. 11–18.

10. Патент на корисну модель 67199 Україна, МПКG09B 23/28. Спосіб моделювання стрес-індукованої артеріальної гіпертензії / заявник і патентовласник: ІПК і К НАН України / Л.В. Бабійчук, В.Г. Бабійчук, О.В. Козлов та ін., №u201108117; заявл. 29.06.11; опубл. 10.02.12. Бюл. № 3.

11. Патент на корисну модель 23499 Україна, МПКC12N5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин пуповинної крові / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, В.В. Рязанцев та ін., №u200700585; заявл. 22.01.07; опубл. 25.05.07. Бюл. № 7.

12. Патент на корисну модель 92227 Україна, МПК A01N 1/0. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін., №a200814009; заявл. 05.12.08; опубл. 11.10.10. Бюл. № 19.

13. *Метельская В.А.* Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.

14. *Атраментова Л.А.* Статистические методы в биологии / Л.А. Атраментова, О.М. Утевская. – Горловка: ЧП. Видавництво ліхтар, 2008. – 248 с.

*Л.В. Бабійчук, В.Г. Бабійчук, Л.А. Сиротенко, Н.Г. Малова, С.М. Коваль*

**ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ НА РІВЕНЬ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ ОБМІНУ ОКСИДУ АЗОТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП НА ТЛІ СТРЕС-ІНДУКОВАНОЇ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ**

Стрес-індукована артеріальна гіпертензія супроводжується розвитком ендотеліальної дисфункції, що підтверджується зниженням рівня кінцевих метаболітів оксиду азоту в сироватці крові молодих і старих тварин, а також значним збільшенням артеріального тиску. Дані зміни проявляються вже на ранніх стадіях захворювання. Введення кріоконсервованого препарату ядровмісних клітин кордової крові приводить до нормалізації регуляції гомеостазу і судинного тону.

**Ключові слова:** ядровмісні клітини кордової крові, стрес-індукована артеріальна гіпертензія, оксид азоту, дисфункція ендотелію.

*L.V. Babychuk, V.G. Babychuk, L.A. Sirotenko, N.G. Malova, S.N. Koval*

**INFLUENCE OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD NUCLEATED CELLS ON LEVEL OF NITRIC OXIDE METABOLIC END PRODUCTS IN BLOOD SERUM OF RATS FROM DIFFERENT AGE GROUPS AGAINST STRESS-INDUCED ARTERIAL HYPERTENSION**

Stress-induced arterial hypertension is accompanied by the development of endothelial dysfunction, that is confirmed by a decreased level of nitric oxide end metabolites in blood serum of young and aged animals, as well as a pronounced increase in arterial hypertension. These changes are manifested even at early stages of the disease. The administration of cryopreserved preparation of cord blood nucleated cells results in normalizing the system of local regulation of homeostasis and vascular tone.

**Key words:** cord blood nucleated cells, stress-induced arterial hypertension, nitric oxide, endothelial dysfunction.

*Поступила 25.06.15*