

**І. В. Іванова, К. І. Клименко, І. В. Кізуб, І. М. Прудников\*, В. М. Цивкін\*, А. І. Соловійов**

*Державна установа “Інститут фармакології та токсикології НАМН України”, 03680, Київ*

*\*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, 01024 Київ*

## **МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ЛЮДИНИ ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ЗАСІБ ВІДНОВЛЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ СУДИННОЇ СТІНКИ ПРИ ГЕНЕТИЧНО ДЕТЕРМІНОВАНІЙ АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ**

*(Представлено чл.-кор. НАМН України Т. А. Бухтіаровою)*

Вивчали терапевтичний ефект впливу мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) людини на функціональну активність судин щурів з генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ) та щурів з експериментальним цукровим діабетом (ЦД). Отримані дані свідчать, що як при розвитку ГДГ, так і ЦД спостерігається зменшення амплітуди ендотелійзалежного розслаблення (ЕЗР) ізольованих сегментів грудної аорти та сумарного вихідного струму в гладеньком'язових клітинах (ГМК). Трансплантація МСК щурам із ГДГ збільшувала реакції ЕЗР судин та відновлювала провідність через калієві канали ГМК до контрольних значень. Введення МСК щурам з експериментальним ЦД збільшувала чутливість їх судин до ацетилхоліну, але не впливала на величину максимального ЕЗР та щільність вихідних калієвих струмів в ГМК. Таким чином, МСК здатні відновлювати вазодилататорний потенціал стінки судин при розвитку артеріальної гіпертензії, але виявилися недостатньо ефективними при ЦД. Можна припустити, що гіперглікемія, якою супроводжується розвиток ЦД, може пригнічувати функціональну активність МСК та знижувати при цьому ефективність їх дії.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини людини, ендотелійзалежне розслаблення, калієві канали, гладеньком'язові клітини аорти щурів, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет.

Захворювання серцево-судинної системи різного генезу залишаються найбільш поширеними серед працездатного населення, тому і проблема їх лікування є першочерговою. Встановлено, що велика кількість судинних розладів пов'язана з порушеннями функції місцевих регуляторних механізмів, локалізованих безпосередньо в ендотелії та гладеньких м'язах кровоносних судин [36]. Внаслідок такої

дисфункції виникає пошкодження моторики судинної стінки, що може призвести до вазоспазму — її надлишкового та тривалого скорочення. Однією із хвороб, для яких характерні такі порушення, є артеріальна гіпертензія (АГ), розповсюдженість якої серед дорослого населення України на даний час є найвищою в Європі та сягає 30 %. Добре відомо, що вторинна (симптоматична) АГ та порушення судин-

---

**Інститут фармакології та токсикології НАМН України**

**Відділ експериментальної терапії**

А. І. Соловійов — зав. відділом, д.м.н., професор

І. В. Іванова — с.н.с., к.б.н. (ivanova\_iv@ukr.net)

К. І. Клименко — асп.

І. В. Кізуб — с.н.с., к.б.н.

**Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України**

**Лабораторія біології стовбурових клітин**

І. М. Прудников — зав. лабораторією, д.б.н.

В. М. Цивкін — с.н.с., д.б.н.

© І. В. Іванова, К. І. Клименко, І. В. Кізуб, І. М. Прудников, В. М. Цивкін, А. І. Соловійов, 2013.

ної функції можуть виникати внаслідок ускладнення інших захворювань, одним з яких є цукровий діабет (ЦД). Основними причинами високої смертності хворих на ЦД, що супроводжується АГ та судинною дисфункцією, вважаються ішемічна хвороба серця, ураження мозкового та периферичного кровообігу, а також термінальна ниркова недостатність [6].

Було показано, що АГ та ЦД здатні спричиняти значні зміни у структурі та функціонуванні кровоносних судин: пригнічення ендотеліозалежного розширення (ЕЗР) [38, 39], дисфункцію калієвих іонних каналів плазматичної мембрани судинних клітин [4, 21], підвищену чутливість скоротливого апарату судин до вазоконстрикторних факторів та іонів  $Ca^{2+}$  [29, 32], а також активацію регуляторного ферменту протеїнкінази С [12, 14, 31]. Встановлено, що ендотелій не лише створює фізичний бар'єр між стінками судин та кров'ю, а відіграє істотну роль у регуляції судинного тонуусу за допомогою секреції багатьох медіаторів [28]. Вони, у свою чергу, впливаючи на калієві канали мембран гладеньком'язових клітин (ГМК), здатні викликати звуження або розширення кровоносних судин [22]. Тому оцінка функціонального стану судин в даному дослідженні проводилась за допомогою вимірювання величин ЕЗР та щільності калієвих струмів ГМК, оскільки ці параметри цілком визначають вазодилаторний потенціал судинної стінки.

Останнім часом в якості засобу, що здатен відновлювати пошкоджені тканини та сприяти їх регенерації, застосовуються стовбурові клітини [7, 11]. Трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) успішно проводилась для лікування широкого спектра захворювань [13]. Вважається, що МСК здатні не лише диференціюватися у серцеві та судинні клітини, покращуючи порушену функціональну активність цих органів [15, 23], але і виділяють ще недостатньо вивчені трофічні фактори, які стимулюють процеси регенерації тканин [16]. Також отримані дані, згідно з якими рівень циркулюючих стовбурових клітин-попередників ендотеліоцитів, що продукуються кістковим мозком та мають здатність відновлювати пошкоджений ендотелій [34], зворотно корелює зі ступенем ендотеліальної дисфункції судин людини [9].

Як відомо, розвиток судинної дисфункції, що виникає при АГ та ЦД, супроводжується підвищенням утворення реактивних форм кисню разом з пониженням рівня антиоксидантів — оксидативним стресом [26, 27]. У попередніх дослідженнях нами було показано, що в мембранах МСК людини та ГМК щурів оксидативний стрес викликає аналогічну іонну каналопатію [30]. Також було встанов-

лено, що введення МСК щурам здатне значно покращувати вазодилаторний потенціал судин, порушений впливом радіаційного опромінення [1]. Тому трансплантація МСК може стати ефективним підходом до терапії також інших захворювань, які супроводжуються судинною дисфункцією, пов'язаною з гіперпродукцією реактивних форм кисню, — таких, як АГ та ЦД.

Метою нашого дослідження була оцінка можливості нормалізації порушеної функціональної активності судин у щурів з розвиненими АГ та ЦД за допомогою трансплантації тваринам МСК людини як потенціального терапевтичного засобу для лікування цих захворювань у майбутньому.

**Матеріал та методи.** Експерименти проводили на статевозрілих самцях (220-250 г) щурів лінії Вістар та спонтанно-гіпертензивних щурів лінії *Okamoto*. Декапітацію тварин здійснювали після попередньої анестезії фенобарбіталом натрію (50 мг/кг). Усі досліди проводили відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших цілях.

Щури були розподілені на групи по 9 тварин: 1 — контрольна група, 2 — щури з генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ, спонтанно-гіпертензивні), 3 — щури з ГДГ, яким трансплантували МСК, 4 — щури зі стрептозотоциніндукованим діабетом та 5 — щури з діабетом, яким вводили МСК.

**Реєстрація скорочувальної активності сегментів аорти щурів.** У тварин видаляли грудну аорту та очищали її від жирової та сполучної тканини. Сегменти судини розміром 2-3 мм фіксували у проточній камері на сталевих гачках з навантаженням 10-20 мН та перфузували термостабілізованим (37 °С) розчином Кребса. Реєстрація скорочень здійснювалась в ізометричному режимі за допомогою аналогово-цифрового перетворювача *Lab-Trax 4/16* (*World Precision Instruments*, США), з'єданого з персональним комп'ютером. Скорочення ізольованих фрагментів аорти викликали додаванням до перфузуючого розчину норадреналіну бітартату (НА,  $10^{-6}$  моль/л). ЕЗР досліджуваних судин викликали кумулятивною аплікацією ацетилхоліну (АХ,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  моль/л) та реєстрували на фоні скорочення, викликаного дією НА. Для проведення досліджень використовували модифікований розчин Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl — 133,0, KCl — 4,7,  $NaHCO_3$  — 16,3,  $NaH_2PO_4$  — 1,38,  $CaCl_2$  — 2,5,  $MgCl_2$  — 1,05, глюкоза — 7,8 (рН 7,4).

**Ізоляція одиночних ГМК аорти щурів.** Сегменти судин щурів вміщували у розчин, що містив

(ммоль/л): NaCl — 140, KCl — 6, MgCl<sub>2</sub> — 3, глюкоза — 10, HEPES — 10, папаїн (11,55 ОД/мг) — 1 мг/мл, дитіотреїтол — 1 мг/мл та бичачий сироватковий альбумін — 1 мг/мл. Тканини інкубували у термостаті (37 °С) протягом 20 хв, відмивали від папаїну у свіжому розчині та проводили їх піпетування. Аліквоти отриманих ізольованих ГМК вміщували у розчин з нормальною концентрацією Ca<sup>2+</sup> (ммоль/л): NaCl — 140, KCl — 5,9, MgCl<sub>2</sub> — 1,2, CaCl<sub>2</sub> — 2,5; HEPES — 10, глюкоза — 11,5 (рН 7,4).

**Електрофізіологія.** Трансміембранні іонні струми досліджували методом фіксації потенціалу (*patch-clamp*) у конфігурації “ціла клітина” з використанням свіжоізольованих ГМК аорти. Іонні струми реєстрували із застосуванням підсилювача *Axopatch 200B* і конвертора *Digidata 1200B* (*Axon Instruments Inc.*, США), сполучених з IBM-сумісним комп’ютером з відповідним програмним забезпеченням (*pClamp software, version 8, Axon Instruments Inc.*). Мембранні струми відфільтровували із частотою зрізу 2 кГц і відцифровували із частотою 10 кГц. Референтний Ag-AgCl електрод був розміщений безпосередньо в камері для клітин об’ємом 200 мкл.

На початку кожного експерименту електродний потенціал нівелювали до нуля. Компенсації струмів витоку при реєстрації трансміембранних струмів не проводили, клітини з великим струмом витоку з досліджуваного виключали. Амплітуди струмів виражали як пА/пФ. Мембранну ємність клітин оцінювали шляхом інтегрування ємнісних струмів, що виникають при гіперполяризуючому зсуві потенціалу на 10 мВ, після електронного усунення струмів через ємність піпетки за допомогою *Clampfit software*. Усі експерименти проводили при температурі 20 °С. Скляні електроди для вимірювання трансміембранного струму виготовляли з бороселікатних скляних капілярів (*Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, Великобританія*). Електроди, що мали опір 2-5 МОм, заповнювали розчином такого складу (ммоль/л): KCl — 140, Na<sub>2</sub>ATP — 1; MgCl<sub>2</sub> — 1, EGTA — 0,3; HEPES — 10, рН 7,2.

**Вимірювання артеріального тиску (АТ)** проводили неінвазивним методом у хвостовій артерії щурів за допомогою сфігмоманометра S-2 (*HSE, Німеччина*).

**Індукція цукрового діабету.** Діабет був індукований одноразовою внутрішньоочеревиною ін’єкцією стрептозотоцину (*STZ*) з розрахунку 60-65 мг/кг. *STZ* розчиняли у цитратному буферному розчині, який містив 9 % NaCl та 10 мМ цитрату (рН 4,6). Визначення експериментального діабету проводили за наявності гіперглікемії. Концентрацію глюкози у плазмі крові вимірювали через

30 діб після ін’єкції *STZ* та у день експерименту в усіх групах досліджуваних тварин. Концентрацію глюкози визначали глюкозомером *Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцарія)*.

**Виділення та культивування МСК.** Зразки кісткового мозку були взяті у здорових чоловіків-добровольців 45-50 років після одержання їх письмової згоди. МСК були виділені методом негативної селекції з використанням моноклональних антитіл до поверхневих клітинних антигенів (*Human RosetteSep Mesenchymal Stem Cell Enrichment Cocktail, StemCell Inc.: Glycophorin A, CD3, CD14, CD19, CD66b, CD38*) після центрифугування у *Ficoll-Нураке* (питома маса 1,077). Збагачені зразки клітин піддавали лізуванню у хлориді амонію для видалення залишків еритроцитів. Потім зразки ресуспендували у середовищі *MesenCult medium (StemCell Inc.)* з додаванням відповідних факторів, що стимулюють зростання МСК (*Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements*). Клітини інкубували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 95 % вологості, 5 % CO<sub>2</sub> та 37 °С. Через 5 діб клітини, що не прикріпилися, були вилучені при зміні середовища. Щільність клітин та їх морфологію контролювали за допомогою інвертованого мікроскопа. МСК культивували у тому ж середовищі з додаванням наступних факторів росту: *rhu SDF-1α, rhuFGF-1β, rhuEGF, rhuPDGF, rhuHIF (Prospec Co., CHO-grade)*. Фактори росту додавали в культуру 2 рази на тиждень у концентрації 10, 5, 5, 10 та 20 нг/мл, відповідно. Клітини, що прикріпилися, утворювали колонії протягом 3-7 діб. Коли первинна культура МСК досягала рівня конфлуентності 80-90 %, клітин обробляли 0,25 % трипсином і субкультивували у трьох послідовних пасажах. Наприкінці культивування всі МСК відокремлювали від дна флаконів за допомогою 0,25 % трипсину та 1 ммоль/л EDTA. Потім МСК ресуспендували у середовищі для трансплантації (без сироватки, 0,9 % NaCl) і вводили у хвостову вену у кількості 16-20·10<sup>6</sup> клітин на одну тварину на 30 добу після ін’єкції *STZ* щурам із розвиненим ЦД та одночасно щурам з ГДГ. Експерименти проводили на 25-30 добу після введення тваринам МСК.

**ПЛР-аналіз фенотипу МСК** проводили для оцінки їх якості, яка є невід’ємною складовою успіху даної терапії. З досліджуваних МСК виділяли РНК із використанням набору *RNeasy Mini Kit (Quiagen, США)* з наступним додаванням ДНКазу I (*GE Healthcare-Amersham Bioscience, США*). Синтез комплементарної ДНК (кДНК) здійснювали з використанням зворотної транскриптази *SuperScript III™ (Invitrogen, США)* та набору праймерів відповідно до протоколу виробника, після чого до отриманої кДНК додавали РНКазу *H (Hoffmann-La*

*Roche*, США). Для проведення ПЛР використовували *Tfi* ДНК-полімераза (*Invitrogen*, США). Для пошуку праймерів, специфічних до обраних ПЛР-матриць та температурою плавлення 60 °С, було використано програму *Primer-BLAST*. До продуктів ПЛР, проведеної з даним набором праймерів, додавали рестриктазу *EaeI* (*Fermentas*, США) відповідно до протоколу виробника для підтвердження специфічності праймерів. Електрофоретичне розділення аліквот (15 мкл) продуктів ПЛР проводили у 2 % агарозному гелі з додаванням безпечного для ДНК барвника *SYBR* (*Invitrogen*) після чого візуалізували в УФ-світлі.

**Реактиви.** Папаїн був отриманий від *Fluka Chemie AG* (Швейцарія), норадреналін бітарат, ацетилхолін, компоненти розчину Кребса, *EGTA*, стрептозотин, бичачий сироватковий альбумін — від *Sigma Chemicals Co* (США).

**Статистика.** Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з розрахунком середнього арифметичного та стандартної помилки середнього значення ( $M \pm m$ ), використанням однофакторного дисперсійного аналізу (*One-Way ANOVA*) та тесту Т'юки за наявності достовірної різниці. Величини ефективної концентрації ( $EC$ ) виражали як  $pD_2$  ( $-lg EC$ ).

**Результати та їх обговорення.** Виявлено, що в МСК були відсутні гематопоетичні клітинні маркери (*CD14*, *CD34*, *CD45*) та присутні маркери МСК людини (*CD29*, *CD44*, *CD71*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD166*). Результати досліджень показали, що трансплантовані клітини відповідали критеріям визначення МСК людини та розмножилися без втрат їх диференційних можливостей.

Одноразове внутрішньоочеревинне введення щурам стрептозотину (65 мг/кг), який є селективно токсичним по відношенню до бета-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, викликало хронічну гіперглікемію. Цей показник було використано для верифікації розвитку ЦД. До початку індукції ЦД рівень глюкози в крові щурів становив ( $6,7 \pm 0,1$ ) ммоль/л. На день експерименту (60-65 діб) у крові діабетичних тварин він становив ( $25,6 \pm 1,7$ ) ммоль/л ( $P < 0,05$ ).

У щурів з ГДГ рівень АТ становив ( $157,0 \pm 1,9$ ) мм рт. ст., що вірогідно відрізнялося від тварин контрольної групи — ( $111,3 \pm 2,3$ ) мм рт. ст. ( $P < 0,05$ ). Хронічна гіперглікемія у щурів із експериментальним ЦД за 60 діб супроводжувалася підвищенням систолічного АТ від ( $112,7 \pm 2,2$ ) мм рт. ст. до ( $138,2 \pm 3,6$ ) мм рт. ст. ( $P < 0,05$ ), що свідчить про розвиток АГ, асоційованої із ЦД [6]. Проте даний рівень АТ був вірогідно нижчим у порівнянні зі щурами з ГДГ ( $P < 0,001$ ).

Трансплантація МСК щурам істотно не змінювала АТ в обох експериментальних групах та не впливала на рівень глюкози в крові щурів з експериментальним ЦД.

Аналіз отриманих даних показав, що сегменти аорти здорових щурів, попередньо скорочених НА ( $10^{-6}$  моль/л), відповідали на дію АХ у концентраціях  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  моль/л дозо-залежним розслабленням (рис. 1, 2). Максимальна амплітуда вазодилатації судин щурів контрольної групи становила ( $86,1 \pm 2,4$ ) %. У щурів з ГДГ спостерігалось істотне зменшення величини АХ-індукованого розслаблення відносно контролю — до ( $32,2 \pm 3,4$ ) % ( $P < 0,001$ ) (див. рис. 1). Аналіз результатів показав, що розвиток АГ впливає також на чутливість ефекторних елементів судин до дії АХ: середня ефективна концентрація АХ ( $EC_{50}$ ), що виражена як логарифм концентрації  $lg [AX]$ , становила при цьому  $-6,4 \pm 0,1$  та вірогідно відрізнялась від контролю:  $-7,6 \pm 0,1$ ,  $P < 0,01$  (див. рис. 1). Отримані дані свідчать про те, що у щурів з ГДГ ЕЗР аорти пригнічуються на усьому діапазоні концентрацій АХ. Як показано на рис. 1, трансплантація МСК щурам з ГДГ приводила до вірогідного підвищення величини розслаблення судинних сегментів: до ( $60,5 \pm 4,6$ ) % ( $P < 0,001$ ). Значення  $lg [AX]$  при цьому також вірогідно змінювалось до  $-7,8 \pm 0,2$  ( $P < 0,001$ ) і практично не відрізнялося від контролю (див. рис. 1). Дані результати доводять, що МСК людини здатні відновлювати реакції ЕЗР судин, пригнічені внаслідок розвитку АГ.

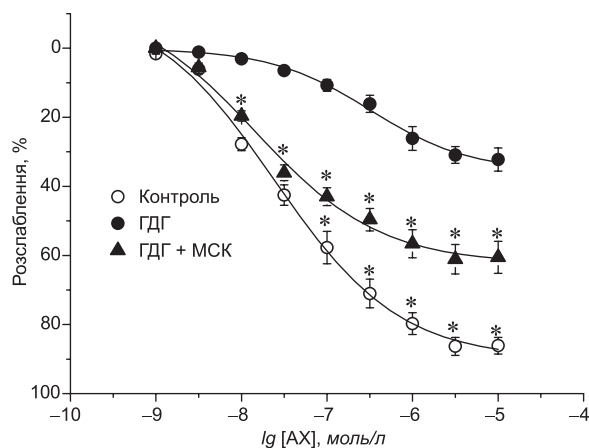


Рис. 1. Вплив ацетилхоліну (АХ,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  моль/л) на тонус попередньо скорочених норадреналіном ( $10^{-6}$  моль/л) препаратів аорти контрольних щурів, щурів з генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ) та щурів з ГДГ, яким вводили мезенхімальні стовбурові клітини (ГДГ + МСК); \* —  $P < 0,05$  порівняно з ГДГ.

У ході експериментів було виявлено, що максимальне АХ-розслаблення судинних сегментів, отриманих від щурів із ЦД, становило ( $49,5 \pm 4,6$ ) %

( $P < 0,001$  відносно контролю), а  $I_g [AX]$  дорівнював  $-6,9 \pm 0,04$ ,  $P < 0,001$  (див. рис. 2). Введення діабетичним тваринам МСК не змінювало максимальну амплітуду розслаблення на АХ— ( $54,5 \pm 4,6$ ), але величина  $I_g [AX]$  при цьому достовірно змінювалась і становила  $-7,2 \pm 0,05$  ( $P < 0,001$  порівняно із ЦД), що свідчить про підвищення під впливом МСК чутливості судинної стінки до АХ (див. рис. 2). Отже, трансплантація МСК щурам із ЦД поліпшила чутливість судин до АХ, але не впливала на величину їх максимальної вазодилатації.

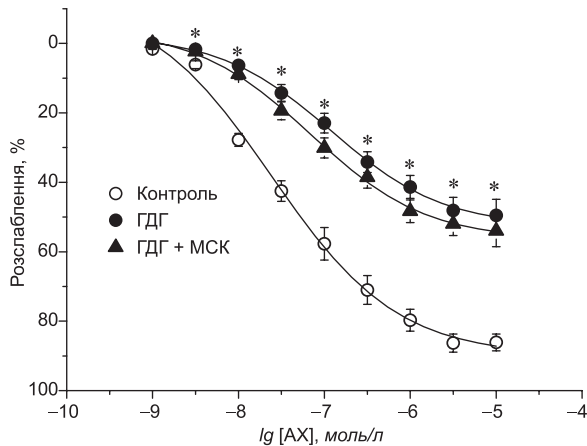


Рис. 2. Вплив ацетилхоліну (АХ,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  моль/л) на тонус попередньо скорочених норадреналіном ( $10^{-6}$  моль/л) препаратів аорти контрольних щурів, щурів з експериментальним цукровим діабетом (ЦД) та щурів із ЦД, яким вводились мезенхімальні стовбурові клітини (ЦД + МСК); \* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

В електрофізіологічних дослідженнях у відповідь на ступінчасту деполяризацію плазматичної мембрани ГМК від  $-100$  до  $+70$  мВ через кожні 3 с за підтримуючого потенціалу  $-60$  мВ було зафіксовано сумарний вихідний струм. Отримані дані показали, що у щурів з ГДГ сумарний вихідний струм був значно пригнічений: при максимальному рівні деполяризації мембрани  $+70$  мВ щільність його амплітуди становила ( $38,7 \pm 2,0$ ) пА/пФ та була значно знижена порівняно з контролем — ( $84,7 \pm 4,1$ ) пА/пФ,  $P < 0,001$  (рис. 3). Трансплантація щурам МСК викликала різке підвищення щільності вихідного калієвого струму, який відновлювався до контрольних значень, а при максимальній деполяризації мембрани навіть дещо перевищував їх — ( $110,1 \pm 5,1$ ) пА/пФ,  $P < 0,05$  (див. рис. 3). Тобто можна стверджувати, що МСК здатні усувати дисфункцію каналів плазматичної мембрани ГМК щурів з розвинутою АГ.

Вольт-амперні характеристики вихідних струмів у ГМК тварин із ЦД продемонстрували також

пригнічену амплітуду їх щільності, що дорівнювала ( $40,1 \pm 3,6$ ) пА/пФ,  $P < 0,001$  порівняно з контролем (рис. 4). Уведення діабетичним щурам МСК, на відміну від групи з ГДГ, вірогідно не підвищувало величину струму, а навіть спричиняло тенденцію до його зниження: ( $32,5 \pm 3,7$ ) пА/пФ,  $P > 0,05$  порівняно із ЦД (див. рис. 4).

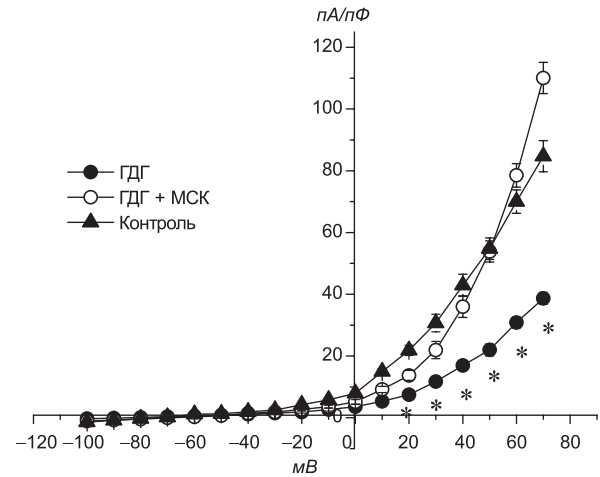


Рис. 3. Вольт-амперна характеристика сумарного вихідного калієвого струму в ізолюваних ГМК грудної аорти контрольних щурів, щурів з генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ) та щурів з ГДГ, яким трансплантували мезенхімальні стовбурові клітини (ГДГ + МСК); \* —  $P < 0,05$  порівняно з ГДГ + МСК.

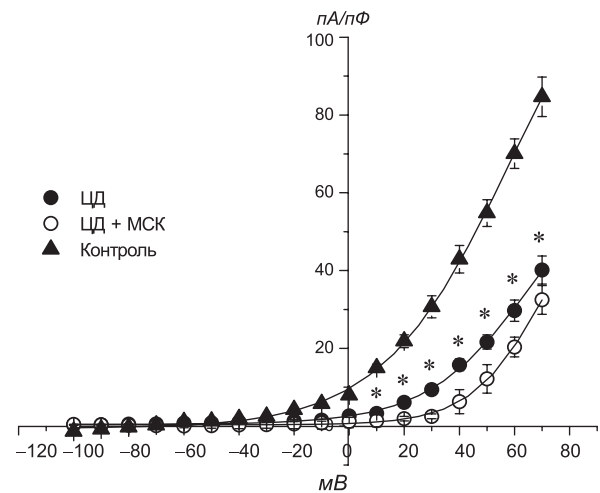


Рис. 4. Вольт-амперна характеристика сумарного вихідного калієвого струму в ізолюваних ГМК грудної аорти контрольних щурів, щурів зі стрептозотоксично індукованим цукровим діабетом (ЦД) та щурів з ЦД, яким трансплантувались мезенхімальні стовбурові клітини (ЦД + МСК); \* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Отже, результати дослідження показали, що при розвитку ГДГ виникають ендотеліальна дис-

функція та іонна каналопатія, подібні до тих, що мають місце при експериментальному ЦД. Відомо, що механізми розвитку ендотеліальної дисфункції, яка виникає при АГ та ЦД, багато в чому подібні між собою: зниження секреції та біодоступності оксиду азоту, поява оксидативного стресу, механічне пошкодження ендотелію, що виникає при високому напруженні зсуву (у стані підвищеного кров'яного тиску) [19, 25-27, 35].

Трансплантація МСК щурам з ГДГ викликала істотне відновлення функціональної активності ендотелію та іонних каналів, а у тварин із ЦД лише поліпшила чутливість судинної стінки до АХ, не впливаючи на інші параметри судинної активності. Відносна неефективність лікування щурів з експериментальним ЦД доводить, що, очевидно, існують чинники, які перешкоджають здатності трансплантованих клітин вижити, розмножуватись, та/або негативно впливають на їх хоумінг або паракринні властивості. Хоч причини цього досі ще недостатньо вивчені, існують результати досліджень, які доводять, що гіперглікемічний стан за розвитку ЦД може бути одним з таких чинників [2, 3, 20]. Показано, що висока концентрація глюкози може індукувати апоптоз та знижувати швидкість проліферації ендотеліальних [10] та гладеньком'язових

[24] клітин. Також показано, що у хворих на діабет людей зменшується кількість клітин-попередників ендотеліоцитів [8, 18]. Дані дослідження впливу високого рівня глюкози на МСК досить суперечливі. Так, більшість дослідників вважають, що МСК мають досить високу резистентність до гіперглікемії [17, 37], але існують і ті, що вказують на протилежне [33]. Проводилися експерименти, в яких порівнювали функціональну активність МСК, отриманих із кісткового мозку, сальника та підшкірного жиру в умовах гіперглікемії. Результати показали, що МСК з кісткового мозку мали найменшу резистентність до впливу високого рівня глюкози [5].

Підсумовуючи вищевказане, можна припустити, що МСК може бути ефективним засобом для відновлення судинної функції при АГ. Низька ефективність впливу трансплантації МСК на судинну дисфункцію при експериментальному ЦД може пояснюватись негативним впливом гіперглікемії на ці клітини. Підвищений рівень глюкози може пригнічувати функціональну активність МСК, їх паракринні властивості та процеси хоумінгу. Враховуючи це, можливо, з метою корекції судинної дисфункції при ЦД потрібно збільшувати дози трансплантованих МСК або застосовувати інші, більш стійкі до гіперглікемії типи МСК.

### Список використаної літератури

1. Соловьев А. И., Прудников И. М., Цивкин В. Н. и др. Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток человека для восстановления нормальной функции эндотелия и кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости в гладкомышечных клетках аорты облученных крыс // Журн. АМН України, 2009. — 15, № 3. — С. 460-475.
2. Andreas L., Young G., Robyn A. et al. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic  $\beta$ -cells *in vivo* // Diabetes. — 2004. — 53. — P. 616-623.
3. Castro R. F., Jackson K. A., Goodell M. A. et al. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo* // Science. — 2002. — 297, № 5585. — P. 1299.
4. Coleman H. A., Tare M., Parkington H. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. — 2004. — 31, № 9. — P. 641-649.
5. Dhanasekaran M., Indumathi S., Rajkumar J. S. et al. Effect of high glucose on extensive culturing of mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat, omentum fat and bone marrow // Cell Biochem. Function. — 2013. — 31. — P. 20-29.
6. Epstein M., Sowers J. R. Diabetes mellitus and hypertension // Hypertension. — 1992. — 19. — P. 403-418.
7. Freedman S. B., Isner J. M. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease // Ann. Intern. Med. — 2002. — 136. — P. 54-71.
8. Gallagher K. A., Liu Z. J., Xiao M. et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 $\alpha$  // J. Clin. Invest. — 2007. — 117. — P. 1249-1259.
9. Hill J. M., Zalos G., Halcox J. P. et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk // N. Engl. J. Med. — 2003. — 348. — P. 593-600.
10. Kageyama S., Yokoo H., Hattori K. T. High glucose-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells involves up-regulation of death receptors // Cardiovasc. Diabetol. — 2011. — 10. — P. 73. doi:10.1186/1475-2840-10-73.
11. Kawamoto A., Gwon H., Iwaguro H. et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia // Circulation. — 2001. — 103. — P. 634-637.
12. Kizub I., Pavlova A., Ivanova I. et al. Protein kinase C-dependent inhibition of BK<sub>Ca</sub> current in rat aorta smooth muscle cells following g-irradiation // Int. J. Radiat. Biol. — 2010. — 86. — P. 291-299.
13. Korblyng M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair — A new therapeutic concept? // N. Engl. J. Med. — 2003. — 349. — P. 570-582.
14. Koya D., King G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications // Diabetes. — 1998. — 47. — P. 859-866.
15. LaBarge M. A., Blau H. M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury // Cell. — 2002. — 111. — P. 589-601.

16. Li F., Whyte N., Niyibizi C. Differentiating multipotent mesenchymal stromal cells generate factors that exert paracrine activities on exogenous MSCs: Implications for paracrine activities in bone regeneration. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2012. — 5. — P. 475-479.
17. Li Y. M., Schilling T., Benisch P. et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. — 363. — P. 209-215.
18. Loomans C. J., de Koning E. J., Staal F. J. et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes // *Diabetes.* — 2004. — 53. — P. 195-199.
19. Mehta J., Lopez L., Chen L. et al. Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol // *Am. J. Cardiol.* — 1994. — 74. — P. 901-990.
20. Meza-Zepeda L. A., Noer A., Dahl J. A. et al. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence // *J. Cell. Mol. Med.* — 2008. — 12. — P. 553-563.
21. Mori A., Suzuki S., Sakamoto K. et al. Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of BK<sub>Ca</sub> channels is attenuated in diabetic rats // *Eur. J. Pharmacol.* — 2011. — 669. — P. 94-99.
22. Nilius B., Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // *Physiol. Rev.* — 2001. — 81. — P. 1415-1459.
23. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2003. — 99. — P. 152-157.
24. Peiry C., Lafuente N., Matesanz N. et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide // *Br. J. Pharmacol.* — 2001. — 133. — P. 967-974.
25. Puddu P., Puddu G., Zaca F. et al. Endothelial dysfunction in hypertension // *Acta Cardiol.* — 2000. — 55. — P. 221-232.
26. Sagar S. Oxygen free radicals in essential hypertension // *Mol. Cell Biochem.* — 1992. — 111. — P. 103-108.
27. Schaffer S. W., Jong C. J., Mozaffari M. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: Unifying hypothesis of diabetes revisited // *Vasc. Pharmacol.* — 2012. — 57, № 5-6. — P. 139-149.
28. Schalkwijk C. G., Stehouwer D. A. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction // *Clin. Sci.* — 2005. — 109. — P. 143-159.
29. Soloviev A., Bershtein S. The contractile apparatus in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats possess increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C // *J. Hypertens.* — 1992. — 10. — P. 131-136.
30. Soloviev A., Tishkin S., Ivanova I. et al. Reactive oxygen species inhibit Slo1 BK<sub>Ca</sub> channels in undifferentiated human mesenchymal stem cells // *Abstr. of Physiology.* — 2012. — Edinburg International Conference Centre, UK. — P. 150.
31. Soloviev A., Tishkin S., Parshikov A. et al. Depression of endothelium-dependent relaxation despite normal release of nitric oxide in the aorta of spontaneously hypertensive rats: Possible role of protein kinase C // *Endothelium-dependent hyperpolarizations.* — Harwood Acad. Pub. — 1999. — P. 289-296.
32. Sowers J. R. Insulin resistance and hypertension // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2004. — 286. — P. H1597-H1602.
33. Stolzing A., Coleman N., Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells // *Rejuvenation Res.* — 2006. — 9. — P. 31-35.
34. Szmítko P. E., Fedak P. W., Weisel R. D. et al. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. // *Circulation.* — 2003. — 107. — P. 3093-3100.
35. Taddei S., Viridis A., Ghiadoni L. et al. Endothelial dysfunction in hypertension // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* — 2001. — 38. — P. 11-14.
36. Verma S., Buchanan M., Anderson T. J. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease // *Circulation.* — 2003. — 108. — P. 2054-2059.
37. Weil B. R., Abarbanell A. M., Herrmann J. L. et al. High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2009. — 296. — P. 735-743.
38. Williams S. B., Cusco J. A., Roddy M. A. et al. Impaired nitric oxidemediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 1996. — 27. — P. 567-574.
39. Xu J., Zou M. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction // *Circulation.* — 2009. — 120, № 13. — P. 1266-1286.

Одержано 20.04.2013

**МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТОЛОВОЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА  
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО ВОССТАНОВЛЕНИЯ  
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ  
ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ  
ГИПЕРТЕНЗИИ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

И. В. Иванова, К. И. Клименко, И. В. Кизуб, И. М. Прудников\*, В. Н. Цивкин\*, А. И. Соловьев

Государственное учреждение “Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины”,  
03680 Киев

\*Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, 01024 Киев

Изучали терапевтический эффект влияния мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека на функциональную активность сосудов крыс с генетически детерминированной гипертензией (ГДГ)

и крыс с экспериментальным сахарным диабетом (СД). Полученные данные свидетельствуют, что при развитии как ГДГ, так и СД наблюдается уменьшение амплитуды эндотелийзависимого расслабления (ЭЗР) изолированных сегментов грудной аорты и суммарного выходящего тока в гладкомышечных клетках (ГМК). Трансплантация МСК крысам с ГДГ увеличивала реакции ЭЗР аорты и восстанавливала проводимость через калиевые каналы ГМК до контрольных значений. Введение МСК крысам с экспериментальным СД повышало чувствительность их сосудов к ацетилхолину, но не влияло на величину максимального ЭЗР и плотность выходящих калиевых токов в ГМК. Таким образом, МСК способны восстанавливать вазодилаторный потенциал стенки сосудов при развитии артериальной гипертензии, но оказались недостаточно эффективными при СД. Можно предположить, что гипергликемия, которой сопровождается развитие СД, может подавлять функциональную активность МСК и снижать при этом эффективность их воздействия.

## HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AS A POTENTIAL THERAPEUTIC APPROACH TO VESSEL FUNCTION RECOVERY IN GENETICALLY DETERMINED ARTERIAL HYPERTENSION AND DIABETES MELLITUS

I. V. Ivanova, K. I. Klimenko, I. V. Kizub, I. M. Prudnikov\*, V. N. Tsyvkin\*, A. I. Soloviev

State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology NAMS Ukraine", 03057 Kyiv

\*A. A. Bogomolets Institute of Physiology NAS Ukraine, 01024 Kyiv

A study was made to determine therapeutic effects of human mesenchymal stem cells (hMSC) on the vascular activity of rats with genetically determined hypertensive (GDH) and rats with experimental diabetes mellitus (DM). The results obtained showed that development of both GDH and DM was accompanied with a decrease in the amplitude of endothelium-dependent relaxation (EDR) of thoracic aorta rings and total outward current in smooth muscle cells (SMC). Transplantation of hMSC to rats with GDH increased reactions of aorta's EDR and restored conductivity through SMC's  $K^+$ -channels to control values. Administration of SMC to rats with experimental DM increased the sensitivity of their vessels to acetylcholine, but had no effect on the level of maximal EDR and density of outward  $K^+$  current in SMC. Thus, hMSC were able to restore vasodilatory capacity of vascular walls at the development of arterial hypertension, but turned out to be insufficiently effective in diabetes mellitus. A possible assumption may be hyperglucemia, which accompanied the development of DM is capable of inhibiting the hMSC functional activity and thus reducing their effectiveness.