

## Влияние мезенхимальных стволовых клеток на показатели апоптоза в паренхиме почек на фоне экспериментального стресса

Демьяненко Е.В.<sup>1</sup>, Глухов А.И.<sup>2</sup>, Грызунова Г.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки» (91045, г. Луганск, ул. 50-летия Обороны Луганска, 1г, Украина); <sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (11991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Россия)

Автор ответственный за переписку: Демьяненко Елена Владимировна, e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua

### Резюме

**Обоснование.** Почки крайне чувствительны к действию различных факторов среды. Стрессовые воздействия вызывают сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия, гиперпродукцию активных форм кислорода, меняют активность компонентов нитроксидазной системы, регулирующих апоптоз. Применение мезенхимальных стволовых клеток может помочь нормализовать функции поврежденных органов в случае патологического процесса.

**Цель исследования.** Исследование проведено для оценки эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток при однократной 24-часовой иммобилизации по динамике показателей апоптоза в почечной ткани – оксида азота (NO) и фрагментированной ДНК.

**Методы.** Исследование проведено на самцах нелинейных белых крыс возрастом 3–4 месяца и массой 225 ± 25 г. Экспериментальный стресс моделировали иммобилизацией животных в фиксирующих камерах в течение 24 часов. О действенности клеточной терапии судили по изменению концентрации исследуемых веществ на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки эксперимента.

**Результаты.** Отмечалось резкое возрастание общего количества нитратов/нитритов и уровня фрагментации ДНК в гомогенатах почечной паренхимы после действия острого стрессора, что может указывать на индукцию апоптоза. Эмпирически доказано, что у животных, получивших мезенхимальные стволовые клетки в качестве лечения, статистически значимо ускорилось восстановление исследуемых показателей в почечной ткани, по сравнению с контрольными значениями.

**Заключение.** Мезенхимальные стволовые клетки защищают клетки от саморазрушения и активизируют репарацию, что делает их перспективными для дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** стресс, апоптоз, оксид азота, фрагментация ДНК, мезенхимальные стволовые клетки

**Для цитирования:** Демьяненко Е.В., Глухов А.И., Грызунова Г.К. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на показатели апоптоза в паренхиме почек на фоне экспериментального стресса. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 138-142. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.21

## Effect of Mesenchymal Stem Cells on Apoptosis Indices in Renal Parenchyma during Experimental Stress

Demianenko E.V.<sup>1</sup>, Glukhov A.I.<sup>2</sup>, Gryzunova G.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lugansk State Medical University (ul. 50-letiya Oborony Luganska 1g, Lugansk 91045, Ukraine); <sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University (ul. Trubetskaya 8, str. 2, Moscow 119991, Russian Federation)

Corresponding author: Elena V. Demianenko, e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua

### Abstract

**Background.** Kidneys are extremely sensitive to various environmental factors. Stress disturbs prooxidant-antioxidant balance, causes hyperproduction of reactive oxygen species, changes activity of the nitroxidergic system components, regulating apoptosis. The use of mesenchymal stem cells can normalize functioning of damaged organs in the pathological process.

**Aim:** to assess the effectiveness of mesenchymal stem cells in a single 24-hour immobilization according to the dynamics of apoptosis indices in renal tissue – nitric oxide (NO) and fragmented DNA.

**Materials and methods.** The study included male nonlinear white rats aged 3 to 4 months and weighing 225 ± 25 grams. Experimental stress was modeled by the immobilization of animals in the fixation chambers within 24 hours. The efficacy of cell therapy was determined by the change in the concentration of the tested substances at 1, 3, 7, 14, 21 and 30 days of the experiment.

**Results.** There was a sharp increase in the total amount of nitrates / nitrites and the level of DNA fragmentation in the homogenates of the renal parenchyma after the action of an acute stressor, which may indicate the induction of apoptosis. It was proved that in animals, receiving mesenchymal stem cells as a treatment, the restoration of the studied parameters in the kidney tissue was significantly accelerated in comparison with the controls values.

**Conclusion.** Mesenchymal stem cells protect cells from self-destruction and activate reparation, which makes them promising for further study.

**Key words:** stress, apoptosis, nitric oxide, DNA fragmentation, mesenchymal stem cells

**For citation:** Demianenko E.V., Glukhov A.I., Gryzunova G.K. Effect of mesenchymal stem cells on apoptosis indices in renal parenchyma during experimental stress. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 138-142. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.21

## ОБОСНОВАНИЕ

Современный человек постоянно сталкивается с большим разнообразием экстремальных факторов. Это вызывает развитие стресс-реакции – важнейшего универсального защитно-приспособительного комплекса биохимических и физиологических процессов, направленного на мобилизацию сил организма [1]. В явлении адаптации немаловажную роль играют почки. Однако адаптационные реакции, развивающиеся на фоне чрезмерного действия стрессора, могут способствовать возникновению целого ряда патологических изменений. Известно, что при стресс-реакции изменяются макро-структура и микроструктура почек, а следовательно, и функция этого органа [2]. Возникает гипоксия [1, 3], влекущая за собой активацию свободно-радикальных процессов [4, 5], приводящих к оксидантному стрессу [2, 5], изменению синтеза оксида азота (NO) [5]. В почечной паренхиме монооксид азота вырабатывается эндотелиальными, мезангиальными и эпителиальными клетками. NO принимает участие в регуляции кровообращения почек путём поддержания тонуса приносящей артериолы сосудистого клубочка [6, 7], водно-минерального обмена, мочеобразования [7], продукции ренина и ангиотензина II [8], клеточной пролиферации [6, 9]. Однако в больших дозах NO проявляет цитотоксические эффекты, участвует в процессах апоптоза [6, 9]. Кроме того, при его взаимодействии с супероксирадикалом образуется пероксинитрит, который разрушает биологические структуры, индуцирует повреждение генетического материала [7, 9, 10]. При апоптозе под влиянием эндонуклеаз происходит фрагментация ДНК (фДНК), которая начинается на ранних этапах процесса гибели клетки и считается надёжным индикатором апоптоза. Активация процесса запрограммированной клеточной гибели лежит в основе многих патологий почечной ткани [4, 7, 11].

В современном мире клеточная терапия становится альтернативой традиционному лечению многих нозологий [12, 13, 14]. Для этих целей оптимальным считается применение костномозговых мезенхимальных стволовых клеток (МСК) ввиду их высокой миграционной способности, значительной пролиферативной активности и лёгкой индукции дифференцировки [15]. Считается, что МСК осуществляют свой регенераторный и восстановительный потенциал преимущественно благодаря секреции высокоактивных молекул, образованию экзосом, содержащих микроРНК, а также благодаря иммуносупрессивным свойствам [15]. Однако, несмотря на большое число научных изысканий, фундаментальные механизмы эффективности клеточной трансплантации до конца не выяснены.

**Целью исследования** было изучение эффективности применения МСК по динамике таких маркёров апоптоза, как оксид азота и уровень фрагментации ДНК после 24-часовой иммобилизации.

## МЕТОДЫ

Эксперимент проведён на 195 беспородных крысах-самцах возрастом 3–4 месяца, масса тела которых составляла  $225 \pm 25$  г. Распределение животных прошло следующим образом: группа 1 – интактные крысы ( $n = 15$ ); группа 2 – крысы, подвергшиеся действию острого иммобилизационного стресса (контроль) ( $n = 90$ ); группа 3 – крысы, леченные стволовыми клетками после

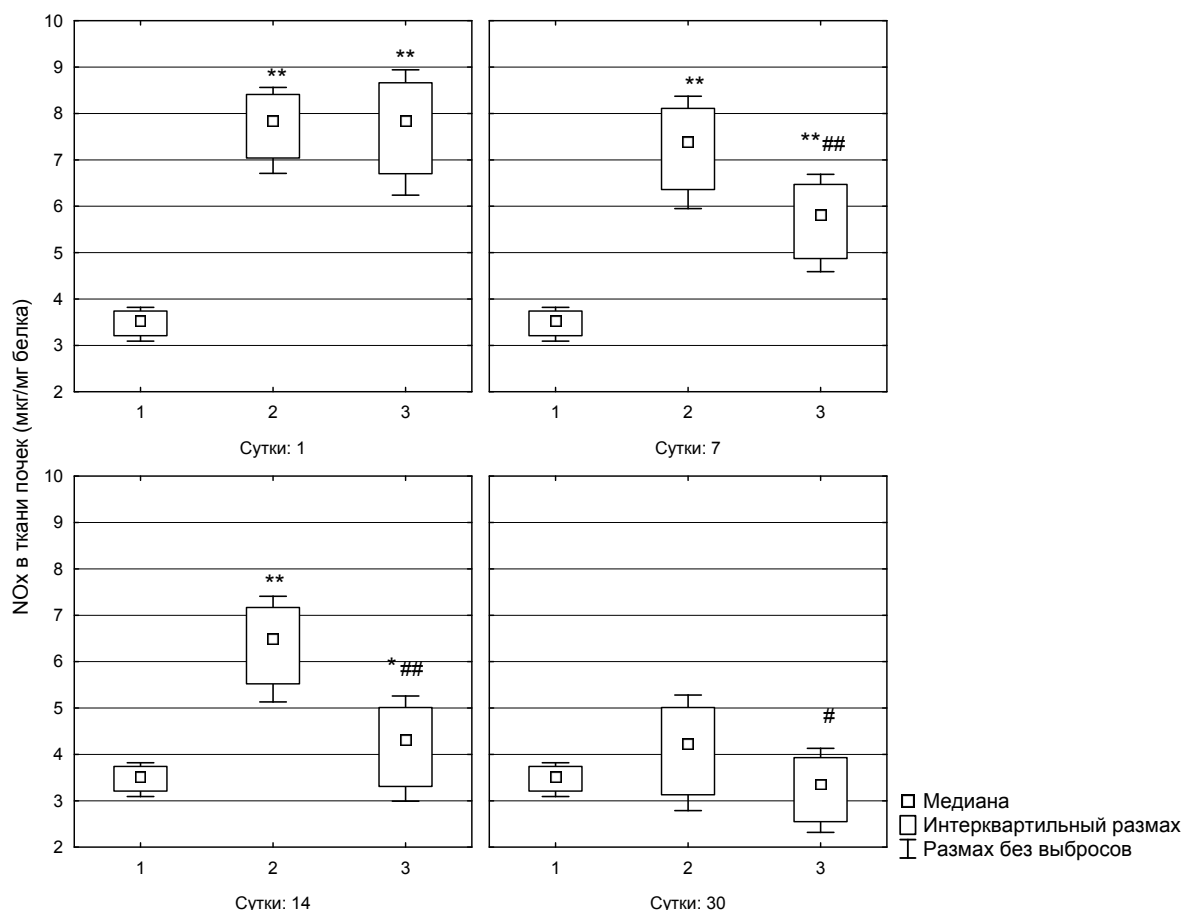
окончания действия стрессора ( $n = 90$ ). Моделирование иммобилизационного стресса проводилось размещением крыс в фиксирующих камерах, исключающих возможность осуществления каких-либо движений. Экспозиция длилась 24 часа. По истечении сроков фиксации крысы группы 2 внутривенно получали по 1 мл физиологического раствора, крысы группы 3 – по  $5 \cdot 10^6$  МСК. Процедуры осуществлялись согласно «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (1986). С целью получения культуры МСК после применения эфирного наркоза половозрелых животных декапитировали. В стерильных условиях извлекали бедренные и большеберцовые кости, полости которых промывали питательной средой для извлечения костного мозга. Срок культивирования составлял 14 суток в питательной среде с добавлением жидкой эмбриональной телячьей сыворотки в условиях  $CO_2$ -инкубатора HF15UV («Heal Force», Китай) с заменой половины среды каждые 5 дней. Жизнеспособность оценивали по тесту с трипановым синим. Для фенотипирования культуры использовали метод непрямой флуоресценции с помощью маркеров к МСК. Предварительно наркотизированных эфиром крыс декапитировали на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки после внутривенного введения средств коррекции. Извлекали почки, гомогенизировали их в среде выделения. Суммарную концентрацию нитратов и нитритов устанавливали с помощью реактива Грисса на спектрофотометре СФ-46 (длина волны 540 нм). Количество фрагментированной ДНК определяли цветной дифениламиновой реакцией с последующей спектрофотометрией на СФ-46 (длина волны 570 нм) и выражали в процентном соотношении выделенной ДНК к её общему содержанию в исследуемом образце.

Данные обрабатывали программой Statistica 10.0 по критерию Манна – Уитни. Результаты расценивались как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведённое исследование показало, что общее содержание нитратов/нитритов в ткани почек после 24-часовой иммобилизации зависит от длительности постиммобилизационного периода и существенно изменяется под действием аллогенных МСК (рис. 1).

После 24-часового иммобилизационного стресса отмечалось резкое увеличение суммарного количества конечных метаболитов оксида азота (NOx), по сравнению с исходными значениями, на 1-е и 3-и сутки наблюдения как в контрольной (на 122,44 % и 136,36 % соответственно;  $p < 0,001$ ), так и в экспериментальной (на 122,73 % и 130,86 % соответственно;  $p < 0,001$ ) группах. В дальнейшем у крыс, перенёвших стресс, отмечалось постепенное его снижение, при этом на 7-е сутки после иммобилизации превышение цифр интактных животных составило 109,94 % ( $p < 0,001$ ), на 14-е – 84,375 % ( $p < 0,001$ ), на 21-е – 60,51 % ( $p < 0,001$ ), а к концу исследования содержание NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> приближалось к интактным значениям. У крыс, получавших клеточную терапию, концентрация нитратов/нитритов на 7-е сутки статистически значимо снижалась на 21,38 % относительно контроля ( $p < 0,001$ ), на 14-е сутки – на 33,59 % ( $p < 0,001$ ), на 21-е сутки – на 33,27 % ( $p < 0,001$ ), на 30-е сутки – на 20,8 % ( $p < 0,001$ ). С 21-х суток мониторинга показатели животных, леченных МСК, статистически значимо не отличались от первоначальных.



**Рис. 1.** Динамика суммарного содержания оксида азота (NOx) в почечной ткани при 24-часовом иммобилизационном стрессе и введении МСК: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$  относительно интактной группы; # –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,001$  относительно группы контроля.

**Fig. 1.** Dynamics of the total content of nitric oxide (NOx) in the kidney tissue with 24-hour immobilization stress and the introduction of MSC: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$  compared to the intact group; # –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,001$  compared to the group of control.

Что касается фрагментации ДНК, то после 24-часовой иммобилизации на 1-е и 3-и сутки содержание фДНК значительно увеличилось, по сравнению с интактными животными, как во группе 2 (на 225,75 % и 329,66 % соответственно;  $p < 0,001$ ), так и в группе 3 (на 229,66 % и 309,95 % соответственно;  $p < 0,001$ ) группах. У контрольных животных цифры фДНК превышали интактные на 7-е сутки мониторинга на 289,87 % ( $p < 0,001$ ), на 14-е сутки – на 260,75 % ( $p < 0,001$ ), на 21-е сутки – на 160,03 % ( $p < 0,001$ ). У крыс, леченных МСК, отмечалось статистически значимое снижение уровня фДНК относительно контроля, однако он был статистически значимо выше интактных цифр. Так на 7-е сутки наблюдения уровень фДНК у экспериментальных животных статистически значимо превышал интактные значения на 184,01 % ( $p < 0,001$ ), но был ниже группы контроля на 28,13 % ( $p < 0,05$ ). На 14-е и 21-е сутки эксперимента уровень фДНК у крыс опытной группы превышал интактные значения на 111,19 % ( $p < 0,001$ ) и 58,08 % ( $p < 0,05$ ) соответственно и был на 41,46 % ( $p < 0,001$ ) и 39,21 % ( $p < 0,001$ ) ниже контрольных. К концу исследования не было статистически значимой разницы между показателями фрагментации ДНК у крыс групп 1 и 3. У животных группы 2 данный критерий превышал интактные значения на 87,4 % ( $p < 0,001$ ), опытные – на 41,36 % ( $p < 0,001$ ). Изменения интенсивности процессов фрагментации ДНК

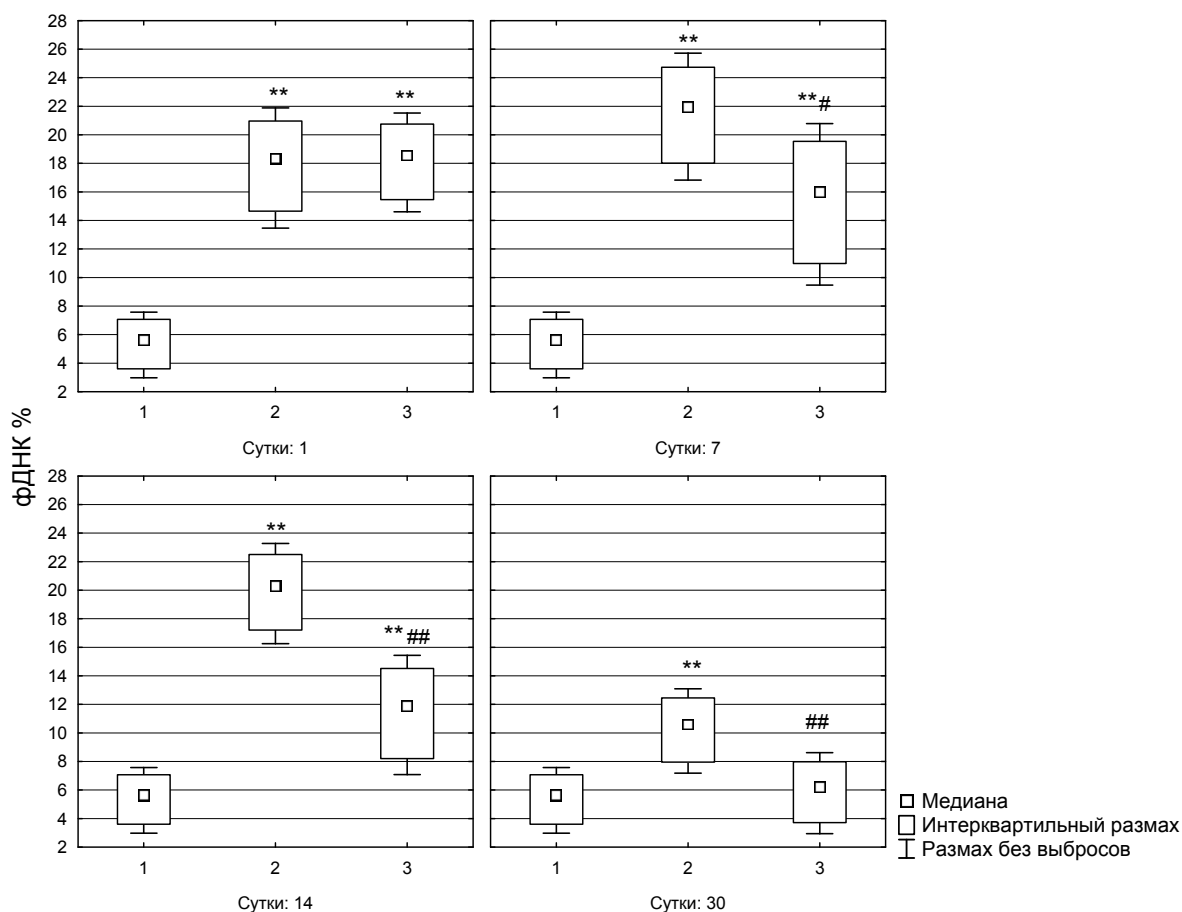
в гомогенате вещества почек крыс исследуемых групп при 24-часовой иммобилизации после введения МСК продемонстрированы на рисунке 2.

Полученные результаты подтверждают антиапоптотический эффект аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на фоне ишемического процесса.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Эмпирически установлено, что действие острого стрессора влечёт за собой резкое увеличение суммарного содержания нитратов/нитритов и уровня фрагментации ДНК в гомогенатах почечной паренхимы, что может указывать на индукцию апоптоза. Также экспериментально подтверждено, что в группе животных, у которых в качестве средства терапии применялись мезенхимальные стволовые клетки, статистически значимо ускорялось восстановление исследуемых показателей в почечной ткани, по сравнению с контрольными значениями.

Положительные эффекты МСК могут указывать на подавление ими перекисного окисления липидов, повышение антиоксидантных свойств, что объясняется активной продукцией проангиогенных и антиапоптотических цитокинов, регуляцией воспаления и иммунных процессов, улучшением регенерации клеток почечной ткани, повышением устойчивости к гипоксии [13, 14, 15].



**Рис. 2.** Изменение количества фрагментированной ДНК при 24-часовом иммобилизационном стрессе и введении МСК: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$  относительно интактной группы; # –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,001$  относительно группы контроля.

**Fig. 2.** Change in the amount of fragmented DNA with 24-hour immobilization stress and MSK injection: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$  compared to the intact group; # –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,001$  compared to the group of control.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опытным путём доказано, что 24-часовой иммобилизационный стресс сопровождается интенсификацией ренального апоптоза, что подтверждается гиперпродукцией монооксида азота и нарастанием количества фрагментированной ДНК.

Применение аллогенных МСК в качестве средства коррекции при острой иммобилизации способствовало более быстрому восстановлению показателей, а следовательно, функционального состояния почек опытных крыс, по сравнению с контролем, что свидетельствует о перспективности дальнейших исследований использования клеточной терапии при различных состояниях.

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Кузьменко Е.В. Современные представления о проявлениях механизмов психоэмоционального стресса. *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. 2013; 26(2): 95-106.
- Souza DB, Silva D, Silva CMC, Sampaio FJB, Costa WS, Cortez CM. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res*. 2011; 34: 424-429. doi: 10.1159/000328331

- Vere CC, Streba CT, Streba LM, Ionescu AG, Sima F. Psychosocial stress and liver disease status. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 2980-2986. doi: 10.3748/wjg.15.2980
- Тягушева Ф.А., Зубина И.М., Митрофанова О.В. Оксидативный стресс и хроническая болезнь почек. *Нефрология*. 2007; 11(3): 29-47.
- Хужахметова Л.К., Теплый Д.Л. Особенности свободнорадикальных процессов при иммобилизационном стрессе у крыс в онтогенезе. *Естественные науки. Физиология*. 2016; 4(57): 72-78.
- Марков Х.М. Окись азота в физиологии и патологии почек. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 1996; 7: 73-78.
- Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB, et al. The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int*. 2002; 61(3): 782-785. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00220.x
- Lopez B, Salom MG, Arregul B, Valero F, Fenoy FJ. Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II. *Hypertension*. 2003; 42: 1150-1156. doi: 10.1161/01.HYP.0000101968.09376.79
- Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2000; 4: 30-34.
- Brown G, Borutaite CV. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Biol Med*. 2002; 33(11): 1440-1450. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01112-7
- Цаликова Ф.Д. Апоптоз в патогенезе нефропатий. *Нефрология и диализ*. 1999; 1(2-3): 127-130.

12. Гринь В.К. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в кардиологии и травматологии. *Журнал НАМН Украины*. 2011; 17(1): 67-75.

13. Кирпатовский В.И. Возможности клеточной терапии в восстановлении нарушенной функции органов мочеполовой системы. *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии*. 2016; 1(56): 60-67. doi: 10.17223/1814147/56/9

14. Момыналиев К.Т., Огай В.Б., Хорошун Е.В., Бабенко Н.Н., Каабак М.М. Клеточные технологии в трансплантации почки. *Нефрология и диализ*. 2014; 16(4): 439-452.

15. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7: 125. doi: 10.1186/s13287-016-0363-7

#### REFERENCES

1. Kuzmenko EV. Modern ideas on the manifestations of psychoemotional stress mechanisms. *Uchenyye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya «Biologiya, khimiya»*. 2013; 26(2): 95-106. (In Russ.)

2. Souza DB, Silva D, Silva CMC, Sampaio FJB, Costa WS, Cortez CM. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res*. 2011; 34: 424-429. doi: 10.1159/000328331

3. Vere CC, Streba CT, Streba LM, Ionescu AG, Sima F. Psychosocial stress and liver disease status. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 2980-2986. doi: 10.3748/wjg.15.2980

4. Tyagusheva FA, Zubina IM, Mitrofanova OV. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Nefrologiya*. 2007; 11(3): 29-47. (In Russ.)

5. Khuzhakhmetova LK, Teplyi DL. Features of free-radical processes during immobilization stress in rats in ontogenesis. *Estestvennye nauki. Fiziologiya*. 2016; 4(57): 72-78. (In Russ.)

6. Markov KhM. Nitric oxide in the physiology and pathology of the kidneys. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 1996; 7: 73-78. (In Russ.)

7. Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB, et al. The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int*. 2002; 61(3): 782-785. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00220.x

8. Lopez B, Salom MG, Arregul B, Valero F, Fenoy FJ. Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II. *Hypertension*. 2003; 42: 1150-1156. doi: 10.1161/01.HYP.0000101968.09376.79

9. Zenkov NK, Menshchikova EB, Reutov VP. NO-synthase in normal conditions and in pathology of various genesis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2000; 4: 30-34.

10. Brown G, Borutaite CV. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Biol Med*. 2002; 33(11): 1440-1450. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01112-7

11. Tsalikova FD. Apoptosis in nephropathy pathogenesis. *Nefrologiya i dializ*. 1999; 1(2-3): 127-130. (In Russ.)

12. Grin VK. Application of autologous mesenchymal stem cells in cardiology and traumatology. *Zhurnal NAMN Ukrainy*. 2011; 17(1): 67-75. (In Russ.)

13. Kirpatovsky VI. Potential of cell therapy in restoring of damaged functions of urogenital system organs. *Voprosy rekonstruktivnoy i plasticheskoy khirurgii*. 2016; 1(56): 60-67. doi: 10.17223/1814147/56/9. (In Russ.)

14. Momynaliev KT, Ogay VB, Khoroshun EV, Babenko NN, Kaabak MM. Cell technologies in renal transplantation. *Nefrologiya i dializ*. 2014; 16(4): 439-452. (In Russ.)

15. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7: 125. doi: 10.1186/s13287-016-0363-7

#### Сведения об авторах

**Демьяненко Елена Владимировна** – ассистент кафедры медицинской химии, ГУ «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки», e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua <https://orcid.org/0000-0003-4717-3630>

**Глухов Александр Иванович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: professor.gluhov.a.i@gmail.com

**Грызунова Галина Константиновна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: galinagryzunova49@mail.ru

#### Information about the authors

**Elena V. Demianenko** – Teaching Assistant at the Department of Medical Chemistry, Lugansk State Medical University, e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua <https://orcid.org/0000-0003-4717-3630>

**Aleksandr I. Glukhov** – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Sechenov First Moscow State Medical University, e-mail: professor.gluhov.a.i@gmail.com

**Galina K. Gryzunova** – Cand. Sc. (Biol.), Associate Professor at the Department of Biological Chemistry, Sechenov First Moscow State Medical University, e-mail: galinagryzunova49@mail.ru