

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ПОСЛЕ НАНЕСЕНИЯ ДЕФЕКТА БОЛЬШЕБЕРЦОВЫХ КОСТЕЙ И КОРРЕКЦИИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Серкина А.Н.

*Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки,
кафедра анатомии человека,
кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, г. Луганск*

Ключевые слова: крысы, каталаза, супероксиддисмутаза, мезенхимальные стволовые клетки.

Резюме: изучено влияние внутривенного введения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на изменение показателей каталазы и супероксиддисмутаза (СОД) в почках крыс после нанесения дефекта большеберцовых костей (ББК). Доказано, что внутривенное введение МСК способствует более быстрому восстановлению показателей каталазы и СОД, и функции почек. Наиболее оптимальными сроками введения являются 3 суток после нанесения дефекта.

Resume: to study the effect of intravenous mesenchymal stem cells injected (MSCs) on changes in catalase and superoxide dismutase (SOD) indices in rat kidneys after infliction of a tibial bone defect (TBD). It has been proven that intravenous administration of MSCs contributes to a more rapid recovery of catalase and SOD, and kidney function. The most optimal time for administration is 3 days after the defect has been applied.

Актуальность. Процент инвалидизации в результате травм, переломов костей, остеопороза и опухолей в настоящее время неуклонно возрастает. Поэтому проблема восстановления структуры кости является одной из важнейших в травматологии [8, 9]. Доказано, что после повреждения костной ткани в кровь попадают продукты воспаления, гибели клеток, активные формы кислорода, продукты перекисного окисления липидов и др. [7]. Все это наряду с централизацией кровообращения, создает предпосылки для возникновения нарушений далеко за пределами травмы, в частности, повреждения функции почек [1,5]. На фоне наблюдающейся ишемии развивается гипоксия почек. Одновременно с этим в ответ на окислительный стресс происходит увеличение образования оксида азота (II), разрушающего клетки и приводящего к запуску апоптоза [5]. Все эти факторы приводят к повреждению структуры нефрона и нарушению функции почек, являющихся одними из важнейших участников в регуляции гомеостаза и адаптации организма к действию неблагоприятных факторов. В последнее время использование стволовых клеток во многих областях медицины, в том числе и регенеративной, показывает хорошие результаты не только благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке, но и проявлению системных эффектов, ускоряющих процессы восстановления [2, 8]. МСК обладают иммуномодулирующими и антиапоптотическими свойствами, за счет секреции биологически активных пептидов, тканевых гормонов, переноса митохондрий и микровезикул с РНК. Они усиливают антимикробную активность моноцитов и нейтрофилов, подавляют синтез воспалительных молекул, NO, угнетают перекисное окисление липидов, апоптоз и гипоксию [1, 3, 4]. В связи с этим

большое значение имеет изучение изменения показателей антиоксидантной защиты клеток почек, в частности, уровней каталазы и СОД, после нанесения костного дефекта и внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток.

Цель: установить влияние внутривенного введения МСК на динамику каталазы и СОД в почечной ткани крыс после нанесения дефекта ББК.

Задачи: 1. Изучить изменение уровней каталазы и СОД в почках после нанесения костного дефекта; 2. Исследовать влияние внутривенного введения МСК на показатели каталазы и СОД в почечной ткани после нанесения дефекта ББК; 3. Установить оптимальные сроки введения стволовых клеток.

Материалы и методы. Материалом служили почки 120 самцов белых беспородных крыс с массой тела 190 – 225 г. Животные распределялись на группы следующим образом: I группа (К) – контрольная, II группа (Д) – животным наносили сквозной дефект ($d=2,00$ мм) на границе проксимального метафиза и диафиза ББК, III группа (СД) – животным наряду с нанесением дефекта вводили в хвостовую вену 5 млн МСК на 3 (СД₃), 10 (СД₁₀), 15 (СД₁₅), 24 (СД₂₄), 45 (СД₄₅) сутки после операции. Для получения МСК питательной средой из ББК вымывали костный мозг, помещали его в среду Игла-МЕМ с L-глутамином, 10% телячьей эмбриональной сывороткой и антибиотиком и выращивали 2 нед в CO₂-инкубаторе HF151UV при 37 °C [2]. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест с трипановым синим. Фенотипирование проводили методом непрямой флуоресценции с помощью маркеров к МСК – моноклональных антител СД-73, СД-105, СД-44, СД-90 и СД-54. Во время проведения эксперимента крысы содержались в стандартных условиях вивария в соответствии с нормами, указанными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей [10]. На 7, 15, 30, 60 и 90 сутки крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом и выделяли почки. После выделения, почки помещали в раствор сахарозы и измельчали в гомогенизаторе. Уровень каталазы определяли реакцией с молибдатом аммония и спектрофотометрией на СФ-46 ($\lambda = 410$ нм), уровень СОД – по реакции аутоокисления адреналина с последующей спектрофотометрией при $\lambda = 347$ нм. Данные обрабатывали методами вариационной статистики (лицензионная версия Microsoft Office Excel), приводили в соответствие с Международной системой единиц, анализировали на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическую достоверность отклонений оценивали с использованием критерия Стьюдента (в случае нормального распределения) либо Манна-Уитни (в случае ненормального распределения). Различие считали достоверным при вероятности ошибки 5% ($p<0,05$) [4].

Результаты и их обсуждения. Полученные в ходе эксперимента данные указывают на то, что уровень каталазы и СОД в почечной ткани после нанесения дефекта ББК зависит от срока наблюдения и изменяется под действием костномозговых МСК.

У контрольных животных уровень каталазы с 7 по 90 сутки изменяется с $70,54 \pm 0,49$ мкмоль/мин·л до $71,17 \pm 0,17$ мкмоль/мин·л. Данная динамика коррелирует с описанными в литературе возрастными особенностями почечной ткани. Во II

группе животных, по сравнению с контрольными, значения показателя резко падали с 7 по 30 сутки на 43,69%, 37,68% и 2,94% (рис 1).

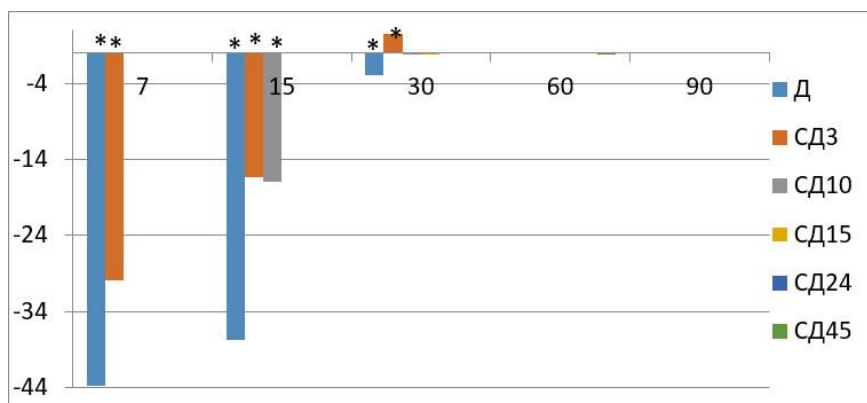


Рис. 1 - Динамика изменения содержания каталазы в почечных гомогенатах в зависимости от срока введения МСК (в % по отношению к группе I).

Примечание: на этом и последующих рисунках: * - обозначает достоверное отличие от соответствующей группы сравнения ($p \leq 0,05$).

У животных группы CD₃ показатели каталазы (в сравнении с группой I) снижались на 7 и 15 сутки на 29,88% и 16,33% и увеличивались на 30 сутки на 2,44%; в сравнении с группой II показатели увеличивались с 7 по 30 сутки на 24,53%, 34,25% и 5,55%. В группе CD₁₀ по сравнению с контрольными животными значения каталазы уменьшались на 15 (на 16,94%) сутки и увеличивались по сравнению с группой Д на 15 и 30 сутки на 33,26% и 2,94% соответственно. У животных, получивших клеточную терапию на 15 сутки после операции (CD₁₅), уровень каталазы повышался на 15 сутки 2,86% в сравнении с крысами группы Д. В группе CD₂₄ значения были выше на 3,04% по сравнению с животными группы II. Введение стволовых клеток на 45 сутки после операции не приводило к достоверным изменениям уровня каталазы. На 60 и 90 сутки эксперимента достоверных отличий в его уровне отмечено не было ни в одной из экспериментальных групп (рис. 2).

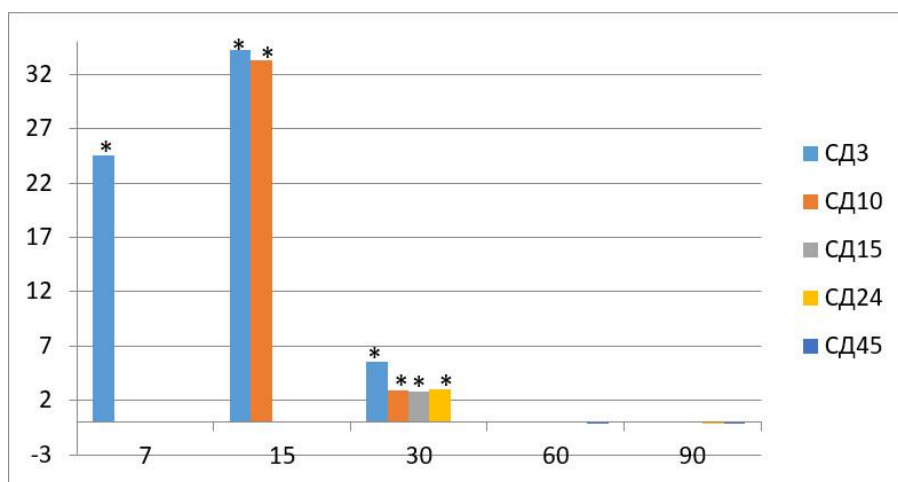


Рис. 2 - Динамика изменения содержания каталазы в почечных гомогенатах в зависимости от срока введения МСК (в % по отношению к группе II).

Уровень другого показателя работы антиоксидантной системы – СОД – в контрольной группе животных увеличивался с 7 по 90 сутки с $0,88 \pm 0,01$ ЕА/мл до $0,98 \pm 0,01$ ЕА/мл. После нанесения дефекта происходит снижение уровня данного показателя на 7 (на 15,34%), 15 (на 11,02%) и 30 (на 10,78%) по сравнению с контролем (рис. 3).

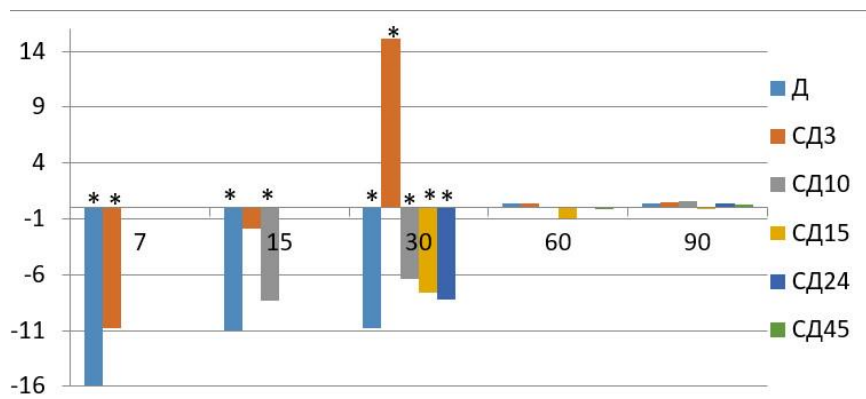


Рис. 3 - Динамика изменения содержания СОД в почечных гомогенатах в зависимости от срока введения МСК (в % по отношению к группе I)

У животных группы СД₃ показатели СОД (в сравнении с группой I) снижались на 7 сутки на 10,80% и увеличивались на 30 сутки на 15,19%; в сравнении с группой II показатели увеличивались с 7 по 30 сутки на 5,37%, 10,33% и 29,11%. В группе СД₁₀ по сравнению с контрольными животными значения СОД уменьшались на 15 (на 8,34%) и 30 (на 6,35%) сутки и увеличивались (по сравнению с группой Д) на эти же сроки на 3,02% и 4,96% соответственно. У животных группы СД₁₅ на 30 сутки уровень СОД снижался на 7,66% (по сравнению с I группой животных) и увеличивался на 3,50% в сравнении с крысами группы Д. В группе СД₂₄ значения были ниже на 8,22% по сравнению с животными группы I. На 45 сутки после операции не наблюдалось достоверных изменений уровня СОД. На поздние сроки наблюдения (60 и 90 сутки) нами не выявлено достоверных отличий данного показателя ни в одной группе животных (рис. 4).

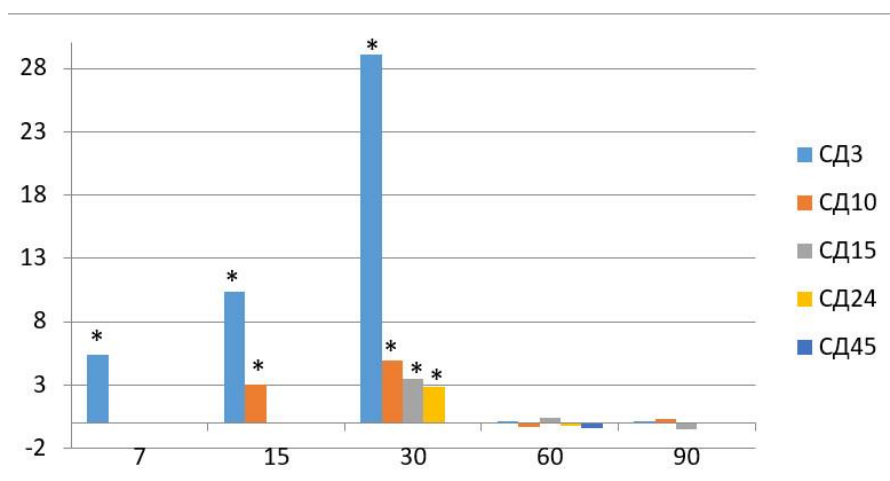


Рис. 4 - Динамика изменения содержания СОД в почечных гомогенатах в зависимости от срока введения МСК (в % по отношению к группе II).

Данные нашего исследования свидетельствуют о резком снижении уровня каталазы и СОД в почечных гомогенатах после нанесения дефекта ББК. Причем степень выраженности отклонений зависит от сроков исследования и максимальна на 7 сутки после операции. Данная динамика свидетельствует об истощении запасов антиоксидантной системы и активации процессов ПОЛ, а также повреждении клеток почек, являющихся очень чувствительными к действию стрессовых факторов [3, 8]. Нами установлено, что внутривенное введение МСК после костной травмы приводит к достоверному увеличению показателей ферментативного звена антиоксидантной системы, а значит, снижению ПОЛ и повреждения почечной паренхимы. При этом функциональная активность почек восстанавливается быстрее. Эти эффекты стволовых клеток проявляются за счет снижения продукции конечных метаболитов оксида азота, активных форм кислорода, уменьшения фрагментации ДНК и апоптоза, увеличения продукции факторов роста и противовоспалительных цитокинов, иммуносупрессии, усиления антибактериальной активности моноцитов и нейтрофилов, уменьшения гипоксии [6, 10]. Оптимальными сроками введения МСК, по нашим данным, являются 3 сутки после нанесения дефекта. При этом восстановление показателей наблюдается уже с 7 суток по сравнению с оперированными животными.

Выводы: 1. Нанесение костного дефекта сопровождается снижением активности каталазы и СОД – ферментативного звена антиоксидантной системы почечной ткани – из-за увеличения образования активных форм кислорода. Такая динамика демонстрирует высокую чувствительность ткани почек к окислительному стрессу; 2. Использование в качестве корректора МСК на ранние сроки после нанесения дефекта приводит к скорейшему восстановлению уровня исследуемых показателей, а значит, и функции почек; 3. Наш эксперимент подтверждает целесообразность дальнейшего исследования влияния МСК на восстановление функций других органов и тканей после нанесения дефекта кости.

Литература

1. Андреева, Е. Р. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и внеклеточный матрикс: особенности регуляции при гипоксии / Е. Р. Андреева, Д. К. Матвеева // Физиология человека. – 2018. – Т. 44. – № 6. – С. 104–114.
2. Васильев, А. В. Ниши стволовых клеток и регенеративная медицина / А. В. Васильев, Е. А. Воротеляк, В. В. Терских // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102. – № 3. – С. 241–261.
3. Демьяненко, Е. В. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты сыворотки крови и почечной ткани крыс при остром иммобилизационном стрессе / Е. В. Демьяненко // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – №6. – С.78–88.
4. Кирпатовский В.И. Возможности клеточной терапии в восстановлении нарушенной функции органов мочеполовой системы / В.И. Кирпатовский // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2016. – № 1 (56). – С.60–67.
5. Хужахметова Л.К., Теплый Д.Л. Особенности свободнорадикальных процессов при иммобилизационном стрессе у крыс в онтогенезе // Естественные науки. Физиология. 2016. – № 4 (57). – С.72–78.
6. An Overview on Stem Cells in Tissue Regeneration / Rajasekar Seetharaman, Anjum Mahmood, Prashant Kshatriya, et al. // Curr Pharm Des. – 2019. – №25(18). – P. 2086–2098.

7. Bone regeneration and stem cells. / K. Arvidson, B. M. Abdallah, L. A. Applegate, N. Baldini, E. Cenni, E. Gomez-Barrena, et al. // J. Cell. Mol. Med. – 2011. – №15. P. 718–746.
8. Einhorn T. A., Gerstenfeld L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. / T. A. Einhorn, L. C. Gerstenfeld // Nat. Rev. Rheumatol. – 2015. – №11. P. 45–54.
9. Figliomeni A., Signorini V., Mazzantini M. One year in review 2018: progress in osteoporosis treatment. / Figliomeni A., Signorini V., Mazzantini M. // Clin. Exp. Rheumatol. – 2018. – №36(6). P. 948-958.
10. Ke Y., Ji J. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: new insights, tools, and hopes / Eiman Abdel Meguid, Yuehai Ke, Junfeng Ji, Ahmed H K El-Hashash // J. Cell. Physiol. – 2018. – T. 233, №3. – P. 1825–1835.