

МОБИЛИЗАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VIVO* И *IN VITRO* (В ЭКСПЕРИМЕНТЕ)

А.В. Беляева, В.Ю. Афонин, М.В. Анисович

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
ул. Академика В.Ф. Купревича, д. 5, к. 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь
E-mail: Aleksandra447@yandex.ru

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются самыми распространенными патологиями во всех странах мира. В настоящее время ССЗ стали наиболее частой причиной смерти людей, причём наблюдается тенденция к развитию патологий у более молодой части населения. Поэтому исследователи во всем мире работают над созданием новых эффективных и безопасных препаратов для профилактики и лечения ССЗ.

В данной работе было изучено воздействие физических нагрузок и последующего применения кандесартана цилексетила, который является антагонистом рецепторов ангиотензина II и применяется в качестве антигипертензивного средства длительного действия, и природного антиоксиданта ресвератрола на количество эндотелиальных прогениторных клеток в костном мозге и периферической крови животных. Исследовано влияние кандесартана цилексетила, лозартана и ресвератрола на изменение числа стволовых клеток *in vitro*. Также изучена безопасность кандесартана цилексетила и ресвератрола при совместном использовании в эксперименте.

Материалы и методы. В работе использовались мыши (самцы) линии Balb/C. Животные подвергались физическим нагрузкам (плавание) в течение 2 месяцев, а затем получали кандесартан цилексетил и ресвератрол в различных дозировках и комбинациях в течение 4 недель. Далее проводилось исследование количества клеток CD117+ в костном мозге и в крови с помощью цитометрического анализа.

Для изучения влияния кандесартана цилексетила, лозартана и ресвератрола на процессы мобилизации стволовых клеток CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ и CD31+ *in vitro* были взяты стволовые клетки человека, которые в дальнейшем высевались в ростовой среде (90% среды DMEM (Sigma), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (“HyClone”) с добавлением 0,1% антибиотиков (Antibiotic-antimycotic solution, Sigma) при плотности клеток $10^4/\text{см}^2$ в 6-луночные планшеты. Культуру инкубировали в CO₂-инкубаторе (37⁰C, 5% CO₂), в которую добавлялись кандесартан, лозартан и ресвератрол в различных дозировках и комбинациях. Смена среды проводилась каждые 3 – 4 дня. Перед анализом на проточном цитофлуориметре клетки снимали 0,25% раствором трипсин/ЭДТА, промывали ФСБ (фосфатно-солевым буфером), содержащем 0,1% ФСБ.

Выделение «гейтов» клеток для анализа осуществляли по параметрам прямого и углового светорассеяния (FSC vs SSC), в смешанных линейно-логарифмических режимах (SSC vs FL1, FL2, FL3) или только с применением параметров флуоресценции с логарифмическим усилением сигнала (log/log). В каждом из образцов проводили сбор не менее 10 000 событий. Применялись коммерческие моноклональные антитела («Beckman Coulter», США). Исследования проводились с одноцветными метками.

Также был проведен эксперимент на мышах линии ICR (самцы и самки) по изучению острой токсичности кандесартана цилексетила и ресвератрола в комбинации. Животным совместно вводили исследуемые субстанции в концентрации 2000 мг/кг (соотношение кандесартана и ресвератрола: 1,5 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно). Оценивали весовые индексы органов по следующей формуле:

$$\text{ОКМ} = \frac{A}{B} \times 1000, \text{ где}$$

ОКМ – относительный коэффициент массы органа;

A – масса органа; B – масса тела.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования количества стволовых клеток в костном мозге и периферической крови мышей линии Valb/C получены следующие результаты (таблица 1). Показано, что длительные физические нагрузки не влияют на изменение числа клеток предшественников эндотелия. Установлено, что введение кандесартана в дозе 3 мг/кг приводит к достоверному увеличению количества стволовых клеток в костном мозге и крови по сравнению с контрольными группами животных. Кандесартан в дозе 1,5 мг/кг не оказывает влияние на мобилизацию клеток предшественников эндотелия в костном мозге и не изменяет достоверно процент исследуемого показателя в крови мышей.

Таблица 1 – Результаты анализа количества стволовых клеток в костном мозге и периферической крови мышей линии Valb/C после физических нагрузок и введения кандесартана, цилексетила и ресвератрола

№	Группа	Количество клеток CD117+ в костном мозге, %	Количество клеток CD117+ в периферической крови, %
1	контроль 1 (интактный)	11,63 ± 0,55	6,34 ± 1,37
2	контроль 2 (плавал)	12,41 ± 0,94	7,93 ± 0,99
3	канд.3 мг/кг	17,47 ± 1,70	14,74 ± 1,16
4	канд.1,5 мг/кг	11,03 ± 0,80	9,43 ± 1,28
5	канд.1,5 мг/кг и ресв. 10 мг/кг	19,08 ± 1,74	17,40 ± 2,13
6	канд.1,5 мг/кг и ресв. 30 мг/кг	19,32 ± 2,12	19,60 ± 2,80
7	канд.1,5 мг/кг и ресв. 50 мг/кг	26,98 ± 1,29	25,55 ± 5,14
		P ₁₋₃ <0,05 P ₁₋₅ <0,05 P ₁₋₆ <0,05 P ₁₋₇ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 P ₂₋₅ <0,05 P ₂₋₆ <0,05 P ₂₋₇ <0,05 P ₃₋₄ <0,05 P ₃₋₇ <0,05 P ₄₋₅ <0,05 P ₄₋₆ <0,05 P ₄₋₇ <0,05 P ₅₋₇ <0,05 P ₆₋₇ <0,05	P ₁₋₃ <0,05 P ₁₋₅ <0,05 P ₁₋₆ <0,05 P ₁₋₇ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 P ₂₋₅ <0,05 P ₂₋₆ <0,05 P ₂₋₇ <0,05 P ₃₋₄ <0,05 P ₄₋₅ <0,05 P ₄₋₆ <0,05 P ₄₋₇ <0,05

Совместное использование кандесартана, цилексетила в дозе 1,5 мг/кг и ресвератрола в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг и 50 мг/кг после того, как животные подвергались изнурительным физическим нагрузкам, привело к значительному увеличению числа клеток CD117+ как в костном мозге, так и в периферической крови по сравнению с контрольными группами 1 и 2, а также группой мышей, которой вводили только кандесартан в дозе 1,5 мг/кг. Наибольшее увеличение исследуемого показателя было у животных, получавших кандесартан и цилексетил в дозе 1,5 мг/кг и ресвератрол в дозе 50 мг/кг (таблица 1).

Изучение влияния субстанций на изменение числа клеток CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ и CD31+ *in vitro* позволило сделать следующие выводы (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты анализа количества стволовых клеток in vitro при использовании кандесартана, цилексетила, лозартана и ресвератрола

№	Группа	CD117+, %	CD34+, %	CD117+/CD34+, %	CD31+, %
1	контроль	0,30±0,06	7,70±0,58	1,25±0,03	17,90±0,69
2	канд. 15мкг/мл	0,60±0,12	7,10±0,40	2,15±0,38	19,05±1,59
3	канд.1,5мкг/мл и ресв.50 мкг/мл	0,25±0,03	7,75±1,18	1,05±0,09	14,05±0,26
4	лозартан 20мкг/мл	0,55±0,03	4,25±0,84	1,35±0,03	24,75±0,61
5	лозар.2мкг/мл+ресв.50мкг/мл	0,60±0,13	8,15±0,03	1,70±0,06	10,55±1,70
		P ₁₋₄ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 P ₃₋₄ <0,05 P ₃₋₅ <0,05	P ₁₋₄ <0,05 P ₂₋₄ <0,05 P ₂₋₅ <0,05 P ₄₋₅ <0,05	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₅ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 P ₂₋₄ <0,05 P ₃₋₄ <0,05 P ₃₋₅ <0,05 P ₄₋₅ <0,05	P ₁₋₃ <0,05 P ₁₋₄ <0,05 P ₁₋₅ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 P ₂₋₄ <0,05 P ₂₋₅ <0,05 P ₃₋₄ <0,05 P ₃₋₅ <0,05 P ₄₋₅ <0,05

Выявлено, что лозартан в концентрации 20 мкг/мл увеличивает количество клеток CD117+, CD31+ и снижает число CD34+. Показано, что кандесартан в дозе 15 мкг/мл, а также лозартан в дозе 2 мкг/мл и ресвератрол в дозе 50 мкг/мл приводят к стимуляции образования клеток с поверхностными клеточными маркерами CD117+/CD34+. Сочетанное использование кандесартана и лозартана с ресвератролом уменьшает процент клеток с CD31+ по сравнению с контролем. Введение в культуру клеток монопрепаратов кандесартана и лозартана значительно увеличивает количество клеток CD31+ по сравнению с другими группами.

Установлено, что совместное действие кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозе 50 мкг/мл приводит к достоверному снижению числа клеток с CD117+ *in vitro* по сравнению с эффектом использования монопрепарата кандесартана в дозе 15 мкг/мл. Различий в проценте клеток с CD117+ при сочетанном использовании лозартана в дозе 2 мкг/мл и ресвератрола в дозе 50 мкг/мл по сравнению с эффектом применения только лозартана в дозе 20 мкг/мл отмечено не было.

Результаты исследования острой токсичности кандесартана цилексетила и ресвератрола в эксперименте на мышах линии ICR представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты исследования острой токсичности кандесартана цилексетила и ресвератрола

Группа	m тела	m сердца	ОКМ	m селез	ОКМ	m почек	ОКМ	m легких	ОКМ	m печени	ОКМ	m мозга	ОКМ
контр ♂	34,80±0,76	0,19±0,01	5,42±0,25	0,12±0,01	3,45±0,28	0,60±0,02	17,11±0,36	0,25±0,01	7,08±0,22	2,00±0,04	57,58±1,76	0,54±0,01	15,54±0,35
канд. и ресв. (♂)	31,77±0,99	0,15±0,01	4,84±0,21	0,11±0,01	3,52±0,23	0,49±0,02	15,47±0,46	0,22±0,01	6,91±0,44	1,97±0,08	62,01±0,73	0,55±0,05	17,22±0,86
контр ♀	29,04±0,59	0,14±0,01	4,96±0,24	0,15±0,01	5,18±0,36	0,36±0,03	12,22±0,73	0,22±0,02	7,74±0,63	1,58±0,04	54,52±0,55	0,45±0,04	15,36±1,02
канд. и ресв. (♀)	29,23±0,80	0,15±0,01	5,16±0,26	0,14±0,01	4,74±0,28	0,39±0,01	13,24±0,40	0,23±0,02	7,98±0,78	1,62±0,03	55,63±0,84	0,52±0,02	17,82±0,73

Установлено, что действие выбранных субстанций в комбинации соответствует действию веществ IV класса токсичности, то есть является малотоксичным.

Заключение. Установлено, что длительные физические нагрузки не оказывают влияния на изменение числа клеток предшественников эндотелия. Применение кандесартана в дозе 3 мг/кг, а также сочетанное использование кандесартана цилексетила в дозе 1,5 мг/кг и ресвератрола в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг и 50 мг/кг увеличивают количество стволовых клеток с CD117+ как в костном мозге, так и в периферической крови мышей линии Balb/C. Исследование стимулирующих эффектов кандесартана цилексетила, лозартана и ресвератрола на процессы дифференцировки стволовых клеток позволило выявить значительные изменения показателей числа клеток CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ и CD31+ *in vitro* при применении выбранных субстанций. В результате исследования острой токсичности комплекса кандесартана цилексетила и ресвератрола выявлено, что данная комбинация субстанций является безопасной.

MOBILIZATION OF STEM CELLS *IN VIVO* AND *IN VITRO* (IN EXPERIMENT)

A.V. Beliayeva, V.Yu. Afonin, M.V. Anisovich
The Institute of Bioorganic chemistry NAS of Belarus

Summary

At present study we investigate the influence of physical training and following use of candesartan and resveratrol at different dosages and combinations on the mobilization of endothelial progenitor cells of Balb/C mice. It is shown that candesartan at 3 mg/kg dose and complex of candesartan at 1,5 mg/kg dose with resveratrol at 10, 30, 50 mg/kg doses increase the number of stem cells CD117+ in bone marrow and blood after physical training. Candesartan, losartan and resveratrol change the number of endothelial progenitor cells CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ and CD31+ *in vitro*. It is found that complex of candesartan and resveratrol is safety combination and effective in stimulation of formation of stem cells.