

УДК: 616-003.93;
616.379-008.64; 616-
001.4-039.22

DOI: 10.24412/2075-4094-2024-1-3-6

EDN JVUTHS **



**ПОИСК ПЕРСПЕКТИВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА
ПОСТНАТАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК КОЖИ, ИЗМЕНЕННЫХ
МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ В *IN VITRO* ЭКСПЕРИМЕНТЕ
(краткое сообщение)**

Р.И. КОКАЕВ, А.А. ИСЛАЕВ, Г.С. КОКАЕВ, Е.А. ТАКОЕВА

Институт биомедицинских исследований — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Северная Осетия - Алания Респ, м.р-н Пригородный, с.п. Михайловское, Михайловское с, ул. Вильямса, д. 1, 363110, Россия, e-mail: romesh_k@mail.ru

Аннотация: Нарушение регенерации, а также исходящие из этого трофические нарушения и длительные процессы восстановления у людей, страдающих заболеваниями, сопровождающимися повышенным уровнем сахара, на сегодняшний день остается актуальной причиной множества тяжелых осложнений таких заболеваний, как сахарный диабет и метаболический синдром. Основными причинами нарушения регенерации при этих заболеваниях являются, как сама гипергликемия, так и накапливающиеся продукты гликозилирования белков, прямо или опосредованно через рецепторные взаимодействия, угнетающие пролиферацию, активирующие продукцию активных форм кислорода и запускаящие различные пути апоптоза. **Материал и методы исследования.** С целью коррекции нарушений нами был определен состав комплекса фитоадаптогенов: *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea* и *Acanthopanax senticosus*. Работа проводилась на первичных культурах фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток, полученных из кожи крыс линии *Wistar*. **Результаты и их обсуждение.** В культурах клеток, инкубируемых в среде с повышенным уровнем глюкозы и конечными продуктами гликирования, отмечены морфологические изменения клеток, свидетельствующие о негативном влиянии этих факторов на метаболические процессы, наряду со снижением пролиферативной активности. Применение комплексного фитоадаптогена уменьшило проявления микроскопических признаков дегенеративных изменений, как и привело к некоторому восстановлению пролиферативной активности и выживаемости дермальных прогениторных клеток. **Заключение:** компоненты фитокомплекса обладают способностью к восстановлению регенераторного потенциала стволовых клеток, скомпрометированных метаболическими нарушениями, для уточнения механизмов которых необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: регенерация, сахарный диабет, конечные продукты гликирования, фибробласты, мезенхимальные стромальные клетки, фитоадаптогены.

**SEARCHING FOR PROSPECTS FOR RESTORING THE REGENERATIVE POTENTIAL
OF POSTNATAL PROGENITORY SKIN CELLS ALTERED BY METABOLIC DISORDERS IN
AN IN VITRO EXPERIMENT (short report)**

R.I. KOKAEV, A.A. ISLAEV, G.S. KOKAEV, E.A. TAKOEVA

Institute of Biomedical Investigations – the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, North Ossetia - Alania Rep., Prigorodny metropolitan area, s.p. Mikhailovskoe, Mikhailovskoe village, Williams street, building 1, 363110, e-mail: romesh_k@mail.ru

Abstract. Impaired regeneration, as well as resulting trophic disorders and long-term recovery processes in people suffering from diseases accompanied by high sugar levels, today remains a pressing cause of many severe complications of diseases such as diabetes mellitus and metabolic syndrome. **The main causes** of impaired regeneration in these diseases are both hyperglycemia itself and the accumulating products of protein glycosylation, directly or indirectly through receptor interactions that inhibit proliferation, activate the production of reactive oxygen species and trigger various apoptosis pathways. In order to correct the violations, we determined the composition of the complex of phytoadaptogens: *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea* and *Acanthopanax senticosus*. **The work** was carried out on primary cultures of fibroblasts and mesenchymal stromal cells obtained from the skin of Wistar rats. In cell cultures incubated in a medium with elevated levels of glucose and advanced glycation end products, morphological changes in cells were observed, indicating a negative effect of these factors on metabolic processes, along with a decrease in proliferative activity. The use of a complex phytoadaptogen reduced the manifestations of microscopic signs of degenerative changes, as well as led to some restoration of the proliferative activity and survival of dermal progenitor cells. **Conclusion:** the components of

the phytocomplex have the ability to restore the regenerative potential of stem cells compromised by metabolic disorders, to clarify the mechanisms of which further research is necessary.

Key words: regeneration, diabetes mellitus, advanced glycation end products, fibroblasts, mesenchymal stromal cells, phytoadaptogens.

Введение. Длительная гипергликемия, как спутник метаболических нарушений, возникающих при сахарном диабете (СД) и метаболическом синдроме (МС), посредством реакции Майяра, может приводить к эндогенному образованию конечных продуктов гликирования (КПГ) [1, 7]. В работах ряда исследователей были продемонстрированы эффекты КПГ на пролиферацию, жизнеспособность и апоптоз первичных мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток (МСК), полученных из различных источников. Изучалось влияние, как на мононуклеары, ЭКП периферической, пуповинной крови и костного мозга, на МСК костного мозга, МСК жировой ткани, где во всех исследованиях был отмечен дозозависимый эффект контакта КПГ с клетками [4, 5, 9, 10, 12, 13]. Все эффекты КПГ на клетки можно разделить в соответствии с их различными механизмами действия. Так КПГ могут связываться со специфическими рецепторами клеточной поверхности, например, рецептором КПГ (рКПГ), и вызывать продукцию активных форм кислорода (АФК) и воспалительных цитокинов или активацию внутриклеточных путей запуска апоптоза. КПГ могут образовывать перекрестные связи с белками внутри клетки, такими как внутриклеточные домены различных рецепторов, или с белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген [6], что приводит к изменению структурных и функциональных свойств этих белков и, следовательно, функции органов. КПГ оказывают пагубное влияние на различные типы стволовых клеток, что приводит к нарушению регенерации и проявляется в длительном заживлении ран, и восстановлении после перенесённых заболеваний, появлению трофических повреждений кожи и глубоких тканей. При всём обилии исследований посвящённых эффектам КПГ, остается множество противоречивых данных по влиянию их на потенциал МСК *in situ* в регенераторной медицине. Выяснение всех механизмов воздействия КПГ на стволовые клетки, а также путей профилактики их эффектов, может способствовать повышению эффективности регенеративной медицины при терапии стволовыми клетками.

Цель работы – определение возможных путей коррекции регенераторного потенциала прогениторных клеток кожи – фибробластов и МСК, изменённых гипергликемией и влиянием конечных продуктов гликозилирования в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы исследования. На данном этапе исследования мы определились в выборе состава фитокомплекса, эффективность которого уже была показана коллегами из Лаборатории хронопатофизиологии и фитотерапии ИБМИ ВНИЦ РАН [3]. Это комплекс из таких известных своими лечебными свойствами и богатых фитоконпонентами травы, как Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra*), Родиола розовая (*Rhodiola rosea*) и Элеутерококк колючий (*Acanthopanax senticosus*).

Культура клеток. Исследование проводилось на первичных культурах прогениторных клеток (в том числе фибробластов и МСК) кожи и подкожной клетчатки, получаемых от крыс линии Вистар. Забор биологического материала проводился в соответствии с правилами и этическими нормами ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Фибробласты и мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки кожи (МСК-К) и подкожной жировой клетчатки (МСК-ПЖК) получали стандартным отработанным методом, в соответствии с протоколом. Полученные, в ходе культивирования, первичные прогениторные клетки, по достижению необходимой массы, были поделены, клетки из каждого источника, на 4 серий (всего 8 серий). Пассажи производился в 12 луночные культуральные планшеты, по 10 тыс. на лунку. Через 24 часа от пассажа, стандартные питательные среды были заменены на соответствующие сериям эксперимента.

Рядом авторов [8, 11], для получения КПГ, было предложено термостатирование фетальной сыворотки с высоким уровнем рибозы в CO_2 инкубаторе. В результате чего, в полученных средах определялись различные классы КПГ, вызывающие активацию соответствующих рецепторов. Исходя из чего, влияние КПГ моделировалось содержанием клеток в заранее приготовленной среде, содержащей фетальную сыворотку, полученную путем преинкубирования, и повышенную концентрацию глюкозы. С целью создания гипергликемии использовалась стандартная питательная среда (ДМЕМ с глутамином и глюкозой 1 г/л + Сыворотка эмбриональная телячья + антибиотик-антимикотик) с дополнительным введением глюкозы, для получения соответствующей концентрации 16-20 ммоль/л.

Оценка состояния клеточных культур, количества и морфологии клеток проводилась путем визуализации с помощью фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе (*Zeiss AxioVert.A1 F1*), на 5 сутки. Оценка общего количества клеток и процента живых клеток производилась на автоматическом счетчике клеток (*BioRad TC20*) с использованием красителя – трипанового синего (в соответствии с инструкцией).

Результаты и их обсуждение. Изучение морфологии клеток в фазовом контрасте. В морфологической картине полученных культур клеток кожи в условиях нормогликемии (в стандартной питательной среде) по сравнению с клетками контрольных серий с добавлением фитокомплекса (КФА) отличий не

наблюдалось. В культурах отмечался большой процент звездчатых, полигональных, распластанных форм клеток, соответствующих морфологической картине МСК и фибробластов с различным ядром, ядрышками (от 2 до 3), неравномерной плотностью цитоплазмы и перинуклеарной зернистостью, наблюдаемой при наличии секреторной активности. Наблюдались двух и более ядерные клетки.

В сериях культур клеток с высоким уровнем глюкозы (гипергликеией) и КПП в питательной среде (рис.1 А,Б) морфология клеток несколько отличалась от фоновых серий. Так, околюдерная зернистость в цитоплазме большинства клеток стала менее заметной. Сама цитоплазма была более неоднородной, у многих клеток с вакуолизацией и признаками распада. Появились множественные, вытянутые, истонченные отростки цитоплазматической мембраны. Увеличилось количество двух и более ядерных клеток. Отмечалось большое количество клеток, открепившихся от поверхности пластика. В культурах клеток с добавлением фитокомплекса на фоне гипергликемии и КПП отмечались подобные изменения, однако с меньшей выраженностью дегенеративных изменений.

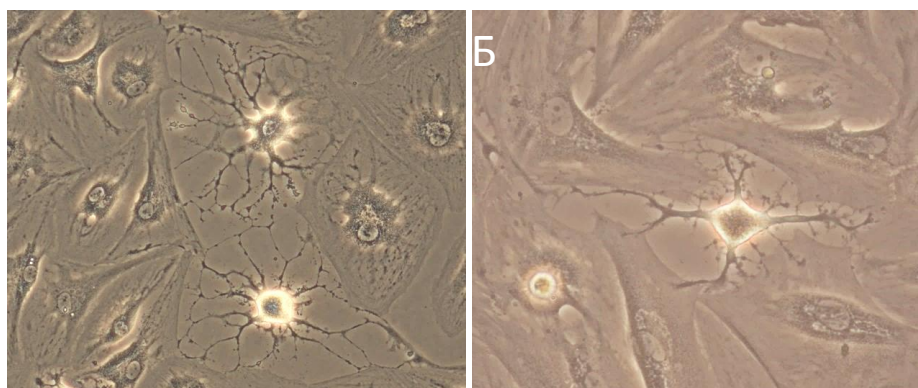


Рис. 1. Микроскопия в фазовом контрасте фибробластов и МСК кожи культивируемых в питательной среде с высокой концентрацией глюкозы и КПП (А), в среде с высокой концентрацией глюкозы и КПП с добавлением КФА (Б). $\times 400$

Оценка пролиферации и выживаемости клеток производилась через 5 дней инкубации клеток с помощью автоматического счетчика клеток. Дермальные фибробласты и МСК по приросту клеток в контрольной группе (с добавлением КФА) не отличались от таковых, содержащихся на стандартной питательной среде (рис.2). Однако процент живых клеток в среде с КФА оказался несколько выше ($p < 0,05$). Влияние глюкозы и КПП значительно снизили пролиферативную активность дермальных прогениторных клеток ($p < 0,001$), однако абсолютное число живых клеток соответствовало таковому в культуре со стандартной средой, при этом процент выживших оказался, на фоне снижения общего количества клеток, выше таковых ($p < 0,05$). Применение фитокомплекса на фоне КПП и глюкозы стабилизировало пролиферативный показатель, увеличив прирост клеток больше, чем в среде с гипергликемией и КПП ($p < 0,05$), а также значительно увеличило процент живых клеток ($p < 0,01$).

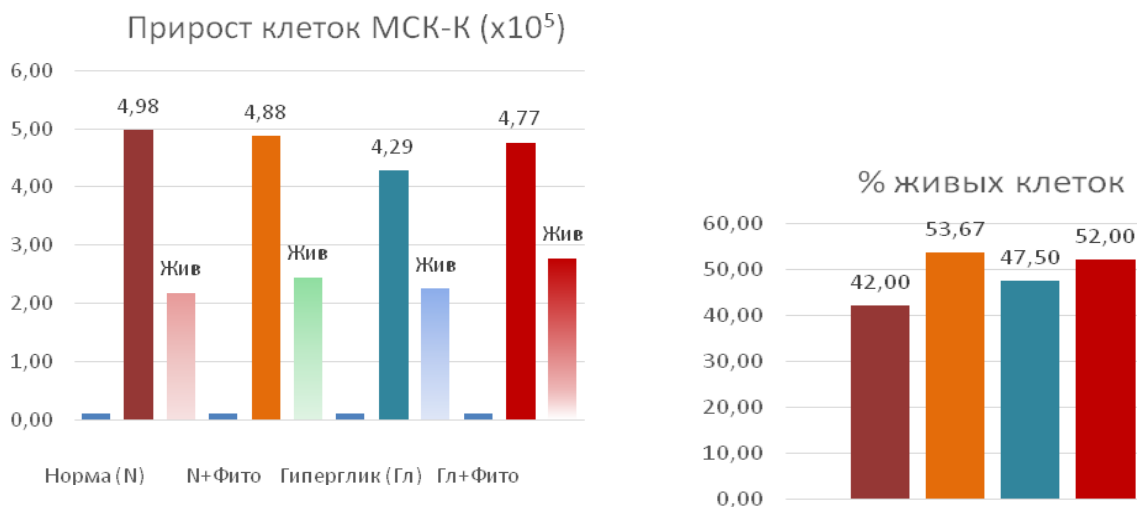


Рис. 2. Оценка пролиферации и выживаемости клеток дермы, определяемая на автоматическом счетчике клеток с использованием красителя – трипанового синего

Заключение. Повышенная концентрация глюкозы и КПП обладают множеством путей реализации негативного влияния на различные типы постнатальных прогениторных клеток, в нашем эксперименте проявившиеся в изменении как морфологии постнатальных прогениторных клеток кожи крыс, так и снижении их пролиферативной активности. Добавление фитокомплекса в среду культивации клеток привело к положительному пролиферативному эффекту и повышению выживаемости клеток. Обнаруженные эффекты компонентов фитокомплекса требуют дальнейших исследований для подтверждения дополнительными методами и уточнения механизмов их. В свою очередь, потенциальное устранение негативного воздействия КПП и повышенной концентрации глюкозы на стволовые клетки может улучшить их регенераторные свойства, и жизнеспособность, что может открыть новые терапевтические возможности трансплантации стволовых клеток, как эффективного направления регенеративной медицины.

Литература

1. Гаврилова А.О., Северина А.С., Шамхалова М.Ш., Шестакова М.В. Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе диабетической нефропатии // Сахарный диабет. 2021. Т. 24, N 5. С.461–469.
2. Дзампаева Ж.В., Датиева Ф.С., Мрикаева О.М. Перспективы использования фитоадаптогенов в комплексном лечении и профилактике заболеваний пародонта // Вестник новых медицинских технологий. 2020. N 3. С.26–31.
3. Kumar Pasupulati A., Chitra P.S., Reddy G.B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy // Biomol Concepts. 2016. Vol. 7, N 5-6. P.293-309.
4. Li Y., Wang L., Zhang M., Huang K., Yao Z., Rao P., Cai X., Xiao J. Advanced glycation end products inhibit the osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signalling pathway via DNA methylation // Cell Prolif. 2020. Vol. 53, N 6. P.e12834.
5. Zhang M., Li Y., Rao P. Blockade of receptors of advanced glycation end products ameliorates diabetic osteogenesis of adipose-derived stem cells through DNA methylation and Wnt signalling pathway // Cell Proliferation. 2018. Vol. 51, N 5, article e12471.
6. Chang M., Zhang B., Tian Y. AGEs decreased SIRT3 expression and SIRT3 activation protected AGEs-induced EPCs' dysfunction and strengthened anti-oxidant capacity // Inflammation. 2017. Vol. 40, N 2. P. 473–485.
7. Chen Q., Shen Z., Mao Y. Inhibition of microRNA-34a mediates protection of thymosin beta 4 in endothelial progenitor cells against advanced glycation endproducts by targeting B-cell lymphoma 2 //Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2019. Vol. 97, N 10. P.945–951.
8. Li Y., Zhou Q., Pei C. Hyperglycemia and advanced glycation end products regulate miR-126 expression in endothelial progenitor cells //Journal of Vascular Research. 2016. Vol.53, N 1-2. P. 94–104.
9. Shen C., Li Q., Zhang Y. C. Advanced glycation endproducts increase EPC apoptosis and decrease nitric oxide release via MAPK pathways // Biomedicine & pharmacotherapy - Biomedecine & pharmacotherapie . 2010. Vol. 64, N 1. P. 35–43.
10. Sun C., Liang C., Ren Y. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways // Basic Research in Cardiology. 2009. Vol. 104, N 1. P. 42–49.
11. Deluyker D., Evens L., Bito V. Advanced glycation end products (AGEs) and cardiovascular dysfunction: focus on high molecular weight AGEs // Amino Acids. 2017. Vol. 49, N 9. P. 1535–1541.
12. Kume S., Kato S., Yamagishi S., Inagaki Y., Ueda S., Arima N., Okawa T., Kojiro M., Nagata K. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone // J Bone Miner Res. 2005. Vol. 20, N 9.– P.1647-1658.
13. Niu Y., Xie T., Ge K., Lin Y., Lu S. Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products // Am J Dermatopathol. 2008. Vol. 30, N 4. P.344-351.

References

1. Gavrilova AO, Severina AS, Shamhalova MSh, Shestakova MV. Rol' konechnykh produktov glikirovaniya v patogeneze diabeticheskoy nefropatii [the role of glycation end products in the pathogenesis of diabetic nephropathy]. Saharnyj diabet. 2021;24(5):461-9. Russian.
2. Dzampaeva ZhV, Datieva FS, Mrikaeva OM. Perspektivy ispol'zovaniya fitoadaptogenov v kompleksnom lechenii i profilaktike zabolevanij parodonta. Vestnik novykh medicinskih tehnologij. 2020;3:26–31. Russian.
3. Kumar Pasupulati A, Chitra PS, Reddy GB. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. Biomol Concepts. 2016;7(5-6):293-309.
4. Li Y, Wang L, Zhang M, Huang K, Yao Z, Rao P, Cai X, Xiao J. Advanced glycation end products

inhibit the osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling pathway via DNA methylation. *Cell Prolif.* 2020;53(6):e12834.

5. Zhang M, Li Y, Rao P. Blockade of receptors of advanced glycation end products ameliorates diabetic osteogenesis of adipose-derived stem cells through DNA methylation and Wnt signalling pathway. *Cell Proliferation.* 2018;51(5):e12471.

6. Chang M, Zhang B, Tian Y. AGEs decreased SIRT3 expression and SIRT3 activation protected AGEs-induced EPCs' dysfunction and strengthened anti-oxidant capacity. *Inflammation.* 2017; 40(2):473–485.

7. Chen Q, Shen Z, Mao Y. Inhibition of microRNA-34a mediates protection of thymosin beta 4 in endothelial progenitor cells against advanced glycation endproducts by targeting B-cell lymphoma 2. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2019;97(10):945–951.

8. Li Y, Zhou Q, Pei C. Hyperglycemia and advanced glycation end products regulate miR-126 expression in endothelial progenitor cells. *Journal of Vascular Research.* 2016;53(1-2):94–104.

9. Shen C, Li Q, Zhang YC. Advanced glycation endproducts increase EPC apoptosis and decrease nitric oxide release via MAPK pathways. *Biomedicine & pharmacotherapy - Biomedecine & pharmacotherapie.* 2010; 64(1):35–43.

10. Sun C, Liang C, Ren Y. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Basic Research in Cardiology.* 2009; 104(1):42-9.

11. Deluyker D, Evens L, Bito V. Advanced glycation end products (AGEs) and cardiovascular dysfunction: focus on high molecular weight AGEs. *Amino Acids.* 2017;49(9). P. 1535–1541.

12. Kume S, Kato S, Yamagishi S, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, Okawa T, Kojiro M, Nagata K. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res.* 2005;20(9):1647-58.

13. Niu Y, Xie T, Ge K, Lin Y, Lu S. Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(4):344-351.

Библиографическая ссылка:

Кокаев Р.И., Ислаев А.А., Кокаев Г.С., Такоева Е.А. Поиск перспектив восстановления регенераторного потенциала постнатальных прогениторных клеток кожи, измененных метаболическими нарушениями в *in vitro* эксперименте (краткое сообщение) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2024. №1. Публикация 3-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-1/3-6.pdf> (дата обращения: 14.02.2024). DOI: 10.24412/2075-4094-2024-1-3-6. EDN JVUTHS*

Bibliographic reference:

Kokaev RI, Islaev AA, Kokaev GS, Takoeva EA. Poisk perspektiv vosstanovlenija regeneratornogo potenciala postnatal'nyh progenitornykh kletok kozhi, izmenennykh metabolicheskimi narushenijami v *in vitro* jeksperimente (kratkoe soobshhenie) [Searching for prospects for restoring the regenerative potential of postnatal progenitory skin cells altered by metabolic disorders in an *in vitro* experiment (short report)]. *Journal of New Medical Technologies, e-edition.* 2024 [cited 2024 Feb 14];1 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-1/3-6.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2024-1-3-6. EDN JVUTHS

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-1/e2024-1.pdf>

**идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после выгрузки полной версии журнала в eLIBRARY