УДК 615.361.013.85.014.41:616.379-008.64-092.4

Ю.А. Демин[1], М.Ю. Демина[1*], В.А. Шаблий[2], А.Н. Сергиенко[3]

# Влияние криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты на провоспалительный статус при экспериментальном сахарном диабете 2 типа

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

Yu.A. Demin[1], M. Yu. Demina[1*], V.A. Shabliy[2], A.N. Sergienko[3]

# Effect of Cryopreserved Placental Mesenchymal Stromal Cells on Pro-Inflammatory State In Experimental Type 2 Diabetes mellitus

**Реферат:** Диабетическая ретинопатия является наиболее распространенным микрососудистым осложнением сахарного диабета и одной из основных причин потери зрения среди лиц трудоспособного возраста. В связи с этим изучение патогенеза, а также разработка новых эффективных методов профилактики и лечения диабетической ретинопатии является одной из актуальных проблем современной офтальмологии. Особый интерес вызывает использование мезенхимальных стромальных клеток, способных проникать в место повреждения сосудов и тканевой ишемии, а также оказывать противовоспалительное действие. В работе дана оценка терапевтической эффективности применения криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты (кМСКП) при экспериментальном сахарном диабете, индуцированном стрептозотоцином и высококалорийной диетой. Полученные результаты показали, что препарат кМСКП оказывает противовоспалительный эффект в виде снижения концентрации С-реактивного белка и фактора некроза опухоли-α в сыворотке крови, что может способствовать предупреждению диабетических микрососудистых осложнений.

**Ключевые слова:** криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки плаценты, стрептозотоциновый сахарный диабет, диабетическая ретинопатия, С-реактивный белок, фактор некроза опухоли-α, провоспалительные цитокины.

**Реферат:** Діабетична ретинопатія є найбільш поширеним мікросудинним ускладненням цукрового діабету й однією з основних причин втрати зору серед осіб працездатного віку. У зв'язку з цим вивчення патогенезу, а також розробка нових ефективних мето-дів профілактики й лікування діабетичної ретинопатії є однією з актуальних проблем сучасної офтальмології. Особливий інтерес викликає використання мезенхімальних стромальних клітин, здатних проникати в місце пошкодження судин і тканинної ішемії та надавати протизапальну дію. У роботі оцінено терапевтичну ефективність застосування кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти (кМСКП) при експериментальному цукровому діабеті, індукованому стрептозотоцином та висококалорійної дієтою. Отримані результати показали, що препарат кМСКП має протизапальний ефект у вигляді зниження концентрації С-реактивного білка та фактора некрозу пухлини-α у сироватці крові, що може сприяти попередженню діабетичних мікросудинних ускладнень.

**Ключові слова:** кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини плаценти, стрептозотоциновий цукровий діабет, діабетична ретинопатія, С-реактивний білок, фактор некрозу пухлини-α, прозапальні цитокіни.

**Abstract:** Diabetic retinopathy is the most common microvascular complications of *Diabetes mellitus* and one of the leading causes of a vision loss among people of working age. In this regard, the study of pathogenesis and development of new effective methods to prevent and treat diabetic retinopathy is one of the urgent tasks of current ophthalmology. Of particular interest is the use of mesenchymal stromal cells capable of penetrating into the injury site of blood vessels and tissue ischemia as well as having an anti-inflammatory effect. The paper assessed a therapeutic efficiency of cryopreserved placental mesenchymal stromal cells (cPMSCs) in experimental diabetes induced by streptozotocin and high-calorie diet. The results demonstrated that the cPMSCs preparation had an anti-inflammatory effect manifested in reducing the concentration of C-reactive protein and tumor necrosis factor-α in the blood serum, likely contributing to the prevention of diabetic microvascular complications.

**Key words:** cryopreserved placental mesenchymal stromal cells, streptozotocin-induced diabetes, diabetic retinopathy, C-reactive protein, tumor necrosis factor α, pro-inflammatory cytokines.

Сахарный диабет (СД) остается глобальной медико-социальной проблемой XXI века, которая обусловлена пандемическим характером распространенности заболевания, высоким риском инвалидизации и смертности. Так, по оценкам

*Diabetes mellitus (*DM) is considered to be a global medical and social problem of the 21 century, which is stipulated by a pandemic disease prevalence, high risk of morbidity and mortality. Thus, according to the International Diabetes Federation estimations, the

[1]Харьковская медицинская академия последипломного обучения
[2]ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН», г. Киев
[3]Медицинский центр «Офтальмологическая клиника профессора Сергиенко», г. Киев

***Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:**
ул. Олеся Гончара, 5, г. Харьков, Украина 61023;
тел.: (+38 057) 700-54-64,
электронная почта: mariya_diomina@mail.ru

Поступила 01.10.2015
Принята в печать 10.11.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 371–378.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

[1]Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education, Kharkov, Ukraine
[2]Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
[3]Medical Center 'Professor Sergienko Opthamological Clinic', Kiev, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**
5, Oles Honchar St., Kharkov, Ukraine 61023;
tel.:+380 57 700 5464,
e-mail: mariya_diomina@mail.ru

Received October, 01, 2015
Accepted November. 10, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(4): 371–378.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

International Diabetes Federation, число больных СД за последние 30 лет увеличилось вдвое. Диабетическая ретинопатия (ДР) является наиболее распространенным микрососудистым осложнением СД и одной из основных причин потери зрения у лиц трудоспособного возраста, что является огромной экономической и социальной проблемой.

Своевременное лечение, направленное на торможение развития ДР, может способствовать улучшению качества жизни больных СД и снижению показателей инвалидизации. В связи с этим изучение патогенеза, а также разработка новых эффективных методов профилактики и лечения ДР является одной из актуальных проблем современной офтальмологии.

В последнее десятилетие сердечно-сосудистые заболевания и атеросклероз ассоциируют с состоянием системного «микровоспаления», при котором биомаркеры воспаления соответствуют верхней границе нормы, что особенно характерно для метаболического синдрома и СД 2 типа [15]. Так, в клинических исследованиях Hoorn Study [10, 16, 20] была выявлена важная роль субклинического воспаления в развитии ДР. При этом было отмечено, что увеличение в сыворотке крови содержания провоспалительных цитокинов, адгезивных молекул и активация иммунных клеток при СД коррелируют с прогрессированием ДР [6, 8].

Стволовые клетки человека представляют собой источник антиапоптотических, антинеоангиогенических ростовых факторов, поэтому в офтальмологии возрастает интерес к их использованию для терапии различных ретинальных заболеваний, обусловленных индукцией патологических механизмов и опосредованных действием провоспалительных ростовых факторов (цитокины, хемокины и ген VEGF) [22].

Основные показатели воспалительного состояния – повышенный уровень С-реактивного белка и фактор некроза опухоли-α, являются интегральными маркерами провоспалительного состояния и могут быть использованы для оценки выраженности осложнений СД [12].

Особый интерес вызывает использование мезенхимальных стромальных клеток, способных проникать в место повреждения сосудов и тканевой ишемии, а также оказывать противовоспалительное действие. В настоящей работе использовали мезенхимальные стромальные клетки плаценты (кМСКП). Ранее показано, что в тканях данного органа содержится большое количество стромальных клеток [19]. Кроме того, применение плаценты в лечебных целях не противоречит этинumber of diabetic patients within recent 30 years has doubled. Diabetic retinopathy (DR) is the most common microvascular complication of the DM and is a leading cause of vision loss among the people of working age, that is a huge economic and social problem.

Timely treatment aimed to inhibit the DR development can contribute to improved quality of life in the DM patients and reducing the disability. So, the study of the pathogenesis and development of new effective methods to prevent and treat the DR is one of the urgent problems of current ophthalmology.

During recent decade the cardiovascular diseases and atherosclerosis are associated with the state of 'microinflammation' system, in which the inflammation biomarkers correspond to an upper limit of the norm, which is especially characteristic of metabolic syndrome and type 2 diabetes [15]. For example the clinical Hoorn Study [8, 16, 20] revealed an important role of subclinical inflammation in the DR development. It was noted that an increase of pro-inflammatory cytokines, adhesion molecules in the blood serum, as well as activation of immune cells in DM correlated with DR progression [3, 6].

Human stem cells represent a source of human anti-apoptotic, anti-neoangiogenic growth factors, therefore ophthalmologists have an increasing interest of their use to treat various retinal diseases associated with the induction of pathological mechanisms and mediated by the action of inflammatory growth factors (cytokines, chemokines and VEGF gene) [22].

Basic indices of an inflammation, *i. e.* increased amount of C-reactive protein and tumor necrosis factor-α are integral pro-inflammatory markers and could be used to assess the severity of the DM complications [12].

Of particular interest is the application of mesenchymal stromal cells capable of penetration into the sites of injury or tissue ischemia of vessels and provide anti-inflammatory effect. In this research we have used the cryopreserved placental mesenchymal stromal cells (cPMSCs). As it was shown previously the tissues of this organ contained a large amount of stromal cells [19]. In addition, the use of placenta for medical purposes has no conflict with the ethical norms because it is a provisional organ, which is usually disposed after a baby birth [1].

The research aim was to estimate the efficiency of cryopreserved placental mesenchymal stem cells to correct a pro-inflammatory state in experimental type 2 *Diabetes mellitus*.

**Materials and methods**

The investigations were carried-out in adult Wistar male rats of 130–160 g with experimental DM of

ческим нормам, поскольку она является провизорным органом, который обычно подлежит утилизации после рождения ребенка [4].

Цель работы – оценка эффективности применения криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты для коррекции провоспалительного состояния при экспериментальном сахарном диабете 2 типа.

**Материалы и методы**

Исследования проводили на модели СД 2 типа на половозрелых самцах лабораторных крыс линии Вистар массой 130–160 г. Крыс содержали при 12-часовом дневном освещении в стандартных условиях вивария (Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины) при температуре 20...25°С, влажности воздуха 50–55%.

Манипуляции с животными проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Для моделирования инсулинорезистентности крыс в течение десяти недель содержали на высокалорийной диете, включающей 15% жиров, 25% сахарозы, 1% желчных кислот, и стандартном питании, составлявшем 59,0% (комбикорм, сочные корма, поваренная соль, жиры *ad libitum* и охлажденная водопроводная кипяченая вода в стеклянных поилках) [11]. Интактные животные получали стандартную диету вивария. Через четыре недели после начала эксперимента крысам, получавшим высококалорийную диету, раз в неделю в течение двух недель внутрибрюшинно вводили цитратный раствор стрептозотоцина в дозе 25 мг/кг массы тела. Контрольным животным по аналогичной схеме внутрибрюшинно вводили цитратный буфер [11]. Введение стрептозотоцина крысам, находившимся на высококалорийной диете, приводило к развитию относительной инсулиновой недостаточности, что подтверждалось повышением уровня базальной гликемии по сравнению с контрольными животными: соответственно (8,35 ± 0,18) ммоль/л и (4,92 ± 0,21) ммоль/л. В тоже время, показатели постпрандиальной гипергликемии у экспериментальных крыс свидетельствовали о развитии инсулинорезистентности и интолерантности к глюкозе ((6,86 ± 0,26) и (11,85 ± 0,56) ммоль/л), что позволяет говорить о наличии у них СД 2 типа.

Через 7 суток после последней инъекции стрептозотоцина всех экспериментальных животных

type 2. The rats were maintained at a 12-hr daylight in standard animal house conditions (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) at 20...25°C with 50–55% air humidity.

Manipulations with the animals were performed in accordance with the General Principles of the Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for the Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

To simulate the insulin resistance the rats within ten weeks were kept on a high calorie diet consisting of 15% fat, 25% sucrose, 1% bile acids, and the standard food, which made 59.0% (feed-stuff, succulent feed, salt, fats *ad libitum* and chilled boiled tap water in glass drinkers) [10]. Intact animals received a standard vivarium diet. Four weeks after the experiment start the rats which received a high-calorie diet, were intraperitoneally injected with streptozotocin citrate solution at 25 mg/kg body weight once a week for two weeks. Control animals were similarly injected intraperitoneally with citrate buffer [10]. Streptozocin introduction to rats, being on the high-calorie diet, resulted in a development of relative insulin deficiency, confirmed by an elevated level of basal glycemia comparing to control animals: 8.35 ± 0.18 and 4,92 ± 0,21 mmol/l, correspondingly. At the same time the indices of postprandial hyperglycemia in experimental rats showed the development of insulin resistance and glucose intolerance (6.86 ± 0.26 and 11.85 ± 0.56 mmol/l), allowing to suggest the occurence of type 2 DM.

Seven days later the last streptozotocin injection all the experimental animals were divided into groups. Cryopreserved placental mesenchymal stem cells were intravenously injected at a concentration of $1.1\times10^6$ and intravitreally in the concentration of $0.1\times10^6$ both to intact animals (group control + cPMSCs) and to the rats with type 2 DM ( group DM + cPMSCs). Rats of the DM + placebo group received 0.9% NaCl solution of the corresponding volume according to a similar protocol.

The concentration of C-reactive protein was determined in blood serum by semi-quantitative latex agglutination method with a sensitivity of 0.8–1.0 mg/l of C-reactive protein (CRP) [9].

The concentration of tumor necrosis factor-α in the blood serum of experimental animals was found by enzyme immunoassay using the Vector-Best kits (Russia).

To isolate and culture PMSCs the female rats at pregnancy day 21 were sacrificed by asphyxiation with

разделили на группы. Криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки плаценты вводили внутривенно в концентрации $1{,}1\times10^6$ и интравитреально в концентрации $0{,}1\times10^6$ интактным животным (группа «контроль + кМСКП») и крысам с СД 2 типа (группа «СД + кМСКП»). Крысы группы «СД + плацебо» получали 0,9%-й раствор NaCl соответствующего объема по аналогичной схеме.

Концентрацию С-реактивного белка определяли в сыворотке крови с помощью полуколичественного метода латексной агглютинации с чувствительностью 0,8–1,0 мг/л С-реактивного белка (СРБ) [2].

Концентрацию фактора некроза опухоли-α в сыворотке крови экспериментальных животных определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов фирмы «Вектор-Бест» (Россия).

Для выделения и культивирования МСКП самок крыс на 21-е сутки беременности выводили из эксперимента путем асфиксии двуокисью углерода непосредственно перед получением плаценты. Плаценту отбирали с плодов мужского пола, затем промывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса с добавлением 50 нг/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина. Хорион измельчали с помощью хирургических ножниц и щипцов на фрагменты размером приблизительно (2–5)×(2–5)×(2–5) мм, а затем промывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Образцы помещали в чашки Петри («Sarstedt», США) с питательной средой DMEM, содержащей высокую концентрацию глюкозы и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС; «Hyclone», США). Культивирование проводили в стандартных условиях при 37°С, влажности 90% и 5% $CO_2$. Культурную среду заменяли два раза в неделю. Клетки снимали с помощью 0,05%-го раствора трипсина («Bionorm», Германия) при конфлюэнсе колоний 70%, плотность посева клеток составляла 5 000 кл/см$^2$. Адгезировавшие к пластику МСКП из крысиной плаценты снимали с помощью 0,05%-го раствора трипсин-ЭДТА («Biochrom», Германия). Для ингибирования трипсина в суспензию клеток вносили ФБС до конечной концентрации 15%. Клетки отмывали от раствора Трипсина путем центрифугирования 5 мин при 300g, осадок ресуспендировали в растворе Хенкса. Криоконсервирование МСКП проводили с помощью программного замораживателя «ЗП-6.00.00.00» (СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков). Процесс охлаждения проводили со скоростью 1 град/мин от 20 до –6°С, осуществляли carbon dioxide directly prior to the placenta obtaining. The placentas were collected from male fetuses, then washed in Hanks balanced salt solution supplemented with 50 ng/ml streptomycin and 100 IU/ml penicillin. Using surgical scissors and forceps the chorion was cut into fragments of about (2–5)×(2–5)×(2–5) mm size and washed with Hanks balanced salt solution. The samples were placed into Petri dishes (Sarstedt, USA) with DMEM, supplemented with a high concentration of glucose and 10% fetal bovine serum (FBS Hyclone, USA). Culturing was performed under standard conditions at 37°C, 90% humidity and 5% $CO_2$. Culture medium was replaced twice a week. The cells were detached by means of 0.05% tripsin (Bionorm, Germany) at 70% confluence, the seeding density was 5,000 cells/cm$^2$. Adhered to plastic PMSCs of rat placenta were detached with 0.05% tripsin-EDTA solution (Bionorm, Germany). Trypsin inhibition was done by introduction of PBS in a final concentration of 15% into a cell suspension. The cells were washed free of trypsin by centrifugation for 5 min at 300g, the pellet was re-suspended in Hanks' solution. Cryopreservation of PMSCs was done using the programmable freezer ZP-6.00.00.00 (Special Designing and Construction Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine). The cooling process was started at 1 deg/min rate from 20 down to –6°C, crystallization was initiated. Then the samples were at –6°C for 10 min. After the crystallization was complete the cryocontainers were cooled at a rate 0.3 deg/min down to –35°C/min, then with 5 deg/min down to –50°C and 10 deg/min down to –140°C, afterwards the biomaterial was transferred into liquid nitrogen (–196°C) for a long-term storage [11].

The results were statistically processed by the method of variation statistics. The pattern of characteristic distribution in the sample was determined using the Shapiro-Wilk test, and dispersion equality of characteristic distribution was established by Leuven criterion. Multiple comparisons of data with a normal distribution were performed using ANOVA and Student-Newman-Keuls method, in other cases the rank analysis of variation by Kruskal-Wallis test and the comparison of mean values by Dunn's one were carried-out [13]. The differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

**Results and discussion**

The performed studies revealed that type 2 *Diabetes mellitus* was accompanied by the inflammation development, confirmed by almost 9-fold increase of CRP concentration in blood serum of experimental animals if compared with the intact ones (Table 1).

инициацию кристаллообразования. В течение 10 мин препараты находились при температуре –6°С. После завершения этапа кристаллизации криоконтейнеры охлаждали со скоростью 0,3 град/мин до –35°С, затем – 5 град/мин до –50°С и 10 град/мин до –140°С, после чего биоматериал переносили в жидкий азот (–196°С) для долгосрочного хранения [3].

Статистический анализ полученных результатов был проведен методами вариационной статистики. Определение характера распределения признака в выборке осуществляли с использованием критерия Шапиро-Уилка, а равенство дисперсий распределения признака – с помощью критерия Левена. Для множественных сравнений данных с нормальным распределением использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и метод Стьюдента-Ньюмена-Кейлса, в других случаях – ранговый анализ вариаций по Крускалу-Уоллису и сравнение средних критерием Дана. В случае, когда распределение признаков отличалось от нормального, данные были представлены в виде медианы (*Me*), минимальных и максимальных значений (*min*, *max*) [1]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

**Таблица 1.** Влияние кМСКП на концентрацию С-реактивного белка в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа (*Me*, *min*, *max*), *n* = 6

**Table 1.** Effect of cPMSCs on C-reactive protein concentration in blood serum of rats with type 2 *Diabetes mellitus* (*Me*, *min*, *max*), *n* = 6

| Группа<br>Group | Концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови, мг/л<br>C-reactive protein concentration in blood serum, mg/l | | |
|---|---|---|---|
| | Me | Min | Max |
| Интактный контроль<br>Intact | 2,00 | 1,00 | 4,00 |
| Контроль + кМСКП<br>Control + cPMSCs | 2,00<br>$p_1 > 0,05$ | 1,00 | 4,00 |
| СД + плацебо<br>DM + placebo | 16,00<br>$p_1 < 0,001$ | 16,00 | 32,00 |
| СД + кМСКП<br>DM + cPMSCs | 7,00<br>$p_1 < 0,01$<br>$p_2 < 0,001$ | 4,00 | 8,00 |

**Примечание:** $p_1$ – при сравнении с интактным контролем; $p_2$ – при сравнении с группой «СД + плацебо».

**Note:** $p_1$ – if compared with the intact control; $p_2$ – if compared with DM+placebo group

## Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что СД 2 типа сопровождается развитием воспалительного процесса, что подтверждается почти 9-кратным повышением концентрации СРБ в сыворотке крови экспериментальных животных по сравнению с интактными (табл. 1).

Введение криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты животным с СД 2 типа приводило к значительному снижению концентрации СРБ в сыворотке крови по сравнению с крысами, получавшими плацебо (табл. 1).

Подтверждением развития провоспалительного состояния на данной модели СД было повышение концентрации фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) в сыворотке крови экспериментальных животных более чем в 3 раза (табл. 2).

Известно, что ФНО-α, как и другие провоспалительные цитокины, активирует NF-kB- и c-JNK-зависимые сигнальные пути в периферических тканях, что приводит к усилению инсулинорезистентности, развитию эндотелиальной дисфункции и протромботическим состояниям [14].

В сыворотке крови крыс, которым вводили кМСКП снижалась интенсивность воспалительного процесса, о чем свидетельствовало уменьшение концентрации ФНО-α на 30% по сравнению с группой животных, получавших плацебо (табл. 2).

Administration of cryopreserved placental mesenchymal stem cells (cPMSCs) to animals with type 2 *Diabetes mellitus* resulted in a significant decrease of CRP concentration in blood serum if compared with the rats which received placebo (Table 1).

The evidence of pro-inflammatory state aggravation in the studied DM model was more than thriple increasing of concentration of tumor necrosis factor α (TNF-α) in the blood serum of experimental animals (Table 2).

It is known, that TNF-α, as other pro-inflammatory cytokines, activates NF-kB and c-JNK-dependent signaling pathways in peripheral tissues, resulting in an increased insulin resistance, the development of endothelial dysfunction and prothrombotic states [14].

The inflammation intensity was decreased in the blood serum of rats treated with cPMSCs, as evidenced by reduction of TNF-α concentration by 30% if compared with the group of animals which received placebo (Table 2).

Thus, the use of cPMSCs led to reduction of pro-inflammatory markers, decrease of inflammation in rats with type 2 *Diabetes mellitus*, which could contribute to the prevention and further progression of DR.

Various biochemical, hemorheologic and immunological mechanisms may be involved into the damage of blood vessels at DR. Recently, the numerous clinical and laboratory studies emphasized the inflammation, characterized by both systemic and local manifestations

Таким образом, применение кМСКП приводит к уменьшению содержания провоспалительных маркеров, снижению интенсивности воспалительного процесса у крыс с СД 2 типа, а значит, может способствовать профилактике и дальнейшему прогрессированию ДР.

Биохимические, гемореологические и иммунологические механизмы могут быть задействованы в повреждении сосудов при ДР. В последние годы в результате многочисленных клинических и лабораторных исследований в качестве важного фактора патогенеза выделяют воспаление, характеризующееся как системным, так и локальным проявлением (стекловидное тело и водянистая влага) [6].

При СД воспаление приводит к развитию увеличенной сосудистой проницаемости в сетчатке (диабетический макулярный отек) и неоваскуляризации (пролиферативная ДР) [21].

Некоторыми исследователями было высказано предположение о потенциальной роли воспалительных медиаторов, в частности ФНО-α, в развитии ДР. Высокий уровень ФНО-α выявлялся в стекловидном теле, сыворотке и глазных фиброваскулярных мембранах у больных с ДР [13, 17, 18]. Кроме того было показано, что полиморфизм гена ФНО-α обусловлен повышенной чувствительностью к данному осложнению СД. Обнаружено, что концентрация ФНО-α в сыворотке крови зависит от стадии ДР и достигает максимального уровня при пролиферативной форме патологии [7].

При анализе уровня ФНО-α в сыворотке крови животных с СД было установлено, что при комбинированном введении кМСКП значимо снижается его уровень (более 30%, $p < 0{,}001$) по сравнению с группой животных, получавших плацебо.

Интегральным маркером провоспалительного состояния является повышенный уровень СРБ, который стимулирует секрецию других провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-6 и ФНО-α [18]. Результаты проведенных исследований показали, что в сыворотке крови крыс с СД, получавших комбинированные инъекции кМСКП, почти вдвое снизилась концентрация СРБ по сравнению с контрольной группой животных с СД 2 типа ($p < 0{,}001$).

**Таблица 2.** Влияние кМСКП на концентрацию фактора некроза опухоли-α в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа ($X \pm S_x$), $n = 6$

**Table 2.** Effect of cPMSCs on concentration of tumor necrosis factor α in blood serum of rats with type 2 *Diabetes mellitus* ($X \pm S_x$), $n = 6$

| Группа<br>Group | Концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови, мг/л<br>C-reactive protein concentration in blood serum, mg/l |
|---|---|
| Интактный контроль<br>Intact | 2,00 |
| Контроль + кМСКП<br>Control + cPMSCs | 2,00<br>$p_1 > 0{,}05$ |
| СД + плацебо<br>DM + placebo | 16,00<br>$p_1 < 0{,}001$ |
| СД + кМСКП<br>DM + cPMSCs | 7,00<br>$p_1 < 0{,}01$<br>$p_2 < 0{,}001$ |

**Примечание:** $p_1$ – при сравнении с интактным контролем; $p_2$ – при сравнении с группой «СД + плацебо».

**Note:** $p_1$ – if compared with the intact control; $p_2$ – if compared with DM+placebo group

## Выводы

Снижение концентрации СРБ, а также повышение более чем в 3 раза концентрации ФНО-α в сыворотке крови экспериментальных животных свидетельствуют о выраженном противовоспалительном действии кМСКП, способствующем предупреждению диабетических микрососудистых осложнений.

(vitreous and aqueous humor) as an important factor in pathogenesis [3].

Inflammation at DM is involved in the development of increased vascular permeability in retina (diabetic macular edema) and neovascularization (proliferative DR) [21].

Some researchers have shown the potential role of inflammatory mediators such as TNF-α during DR development. A high level of TNF-α was found in vitreous humor, serum and ocular fibrovascular membranes in the patients with DR [13, 17, 18]. Furthermore, there was shown that the polymorphism of TNF-α gene was associated with an increased sensitivity to this DM complication. It was shown that TNF-α concentration in blood serum depended on DR stage and achieved a maximum level at a proliferative form of pathology [5].

When analyzing the TNF-α level in blood serum of animals with *Diabetes mellitus* it has been shown that combined administration of cPMSCs leads to a significant reduction of its level (more than 30%, $p < 0.001$) if compared with the animal group treated with placebo.

An increased level of CRP, stimulating the secretion of other pro-inflammatory cytokines, particularly IL-6 and TNF-α is an integral marker of proinflammatory state [18]. The study results have shown that almost twofold reduction of CRP concentration was found in blood serum of rats with *Diabetes mellitus* treated with combined injections of cPMSCs if compared with the group of control animals with type 2 *Diabetes mellitus* ($p < 0.001$).

## Литература


1. Гланс С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. Ю.А. Данилова. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Пат. 38911, Україна, МПК G01N 33/544. Спосіб визначення концентрації С-реактивного білка експрес-методом / Заявник і патентовласник ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України». – № u 200810068; заявл. 04.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. №2. – 6 с.
3. Пат. 46673 А, Україна, МПК A01N 1/02. Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини / Г.С. Лобинцева. – № u2002010343. – заявл. 14.01.2002; опубл. 15.05.2002, Бюл. №5.
4. Abdulrazzak H., Moschidou D., Jones G. et al. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues // J. R. Soc. Interface. – 2010. – Vol. 7, Suppl. 6. – P. S689–S706.
5. Cacicedo J.M. Benjachareowong S., Chou E. et al. Palmitate-induced apoptosis in cultured bovine retinal pericytes: roles of NAD(P)H oxidase, oxidant stress, and ceramide // Diabetes. – 2005. – Vol. 54, №6. – P. 1838–1845.
6. Doganay S., Evereklioglu C., Er H. Comparison of serum NO, TNF-α, IL-1, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus // Eye. – 2002. – Vol. 16, №2. – P. 163–170.
7. Joussen A.M., Poulaki V., Mitsiades N. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression // The FASEB Journal. – 2002. – Vol. 16, №3. – P. 438–440.
8. Hernandez C., Segura R.M., Fonollosa A. et al. Interleukin–8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy // Diabetic Medicine. – 2005. – Vol. 22, №6. – P. 719–722.
9. Kastelan S., Tomic M., Gverovic Antunica A et al. Inflammation and pharmacological treatment in diabetic retinopathy // Mediators of Inflammation. – 2013. – 2013:213130.
10. Klein B.E.K., Knudtson M.D., Tsai M.Y., Klein R. The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy // Archives of Ophthalmology. – 2009. – Vol. 127, №9. – P. 1175–1182.
11. Lin S., Yang J., Wu G. et al. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy // J. Biomed. Sci. – 2010. – Vol. 17, Suppl. 1. – P. 46–56.
12. Maury E., Ehala-Aleksejev K., Guiot Y. et al. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2007. – Vol. 293. – P. E656–E665.
13. Mohammad G., Siddiquei M.M., Abu El-Asrar A.M. Poly (ADP-ribose) polymerase mediates diabetes-induced retinal neuropathy // Mediators of Inflammation. – 2013. – Vol. 2013. – 510451.
14. Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11, №2. – P. 85–97.
15. Ridker P.M., Buring J.E., Cook N.R., Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events // Circulation. – 2003. – Vol. 107, №3. – P. 391–397.
16. Spijkerman A.M., Gall M.A., Tarnow L. et al. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in type 2 diabetes // Diabetic Medicine. – 2007. – Vol. 24, №9. – P. 969–976.
17. Stitt A.W., Lois N., Medina R.J. et al. Advances in our understanding of diabetic retinopathy // Clinical Science. – 2013. – Vol. 125, №1. – P. 1–17.
18. Tomic M., Ljubic S., Kastelan S. The role of inflammation and endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy // Collegium Antropologicum. – 2013. – Vol. 37, Suppl. 1. – P. 51–57.


## Conclusions

A reduction of CRP concentration, as well as the increase of TNF-α one more than thrice in blood serum of experimental animals testify to the pronounced anti-inflammatory effect of cPMSCs, which may contribute to the prevention of diabetic microvascular complications.

## References


1. Abdulrazzak H., Moschidou D., Jones G. et al. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. J R Soc Interface 2010; 7(Suppl. 6): S689–S706.
2. Cacicedo J.M. Benjachareowong S., Chou E. et al. Palmitate-induced apoptosis in cultured bovine retinal pericytes: roles of NAD(P)H oxidase, oxidant stress, and ceramide. Diabetes 2005; 54(6): 1838–1845.
3. Doganay S., Evereklioglu C., Er H. Comparison of serum NO, TNF-α, IL-1, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. Eye 2002; 16(2): 163–170.
4. Glantz S.A. Primer of biostatistics. Moscow: Praktika; 1998.
5. Joussen A.M., Poulaki V., Mitsiades N. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. The FASEB Journal 2002; 16(3): 438–440.
6. Hernandez C., Segura R.M., Fonollosa A. et al. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. Diabetic Medicine 2005; 22(6): 719–722.
7. Kastelan S., Tomic M., Gverovic Antunica A et al. Inflammation and pharmacological treatment in diabetic retinopathy. Mediators of Inflammation 2013: 2013:213130.
8. Klein B.E.K., Knudtson M.D., Tsai M.Y., Klein R. The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 2009; 127(9): 1175–1182.
9. Kozar V.V., Kudrya M.Ya. Determination method of C-reactive protein concentration by express method. Patent 38911 (Ukraine), IPC G01N 33/544.
10. Lin S., Yang J., Wu G. et al. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy. J Biomed Sci 2010; 17(Suppl. 1): 46–56.
11. Lobyntseva G.S. Preservation method of human hematopoietic cells. Patent 46673 A (Ukraine), IPC A01N 1/02.
12. Maury E., Ehala-Aleksejev K., Guiot Y. et al. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 293: E656–E665.
13. Mohammad G., Siddiquei M.M., Abu El-Asrar A.M. Poly (ADP-ribose) polymerase mediates diabetes-induced retinal neuropathy. Mediators of Inflammation 2013; 2013:510451.
14. Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11, №2. – 85–97.
15. Ridker P.M., Buring J.E., Cook N.R., Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events // Circulation. – 2003. – Vol. 107, №3. – P. 391–397.
16. Spijkerman A.M., Gall M.A., Tarnow L. et al. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in type 2 diabetes. Diabetic Medicine 2007; 24(9): 969–976.
17. Stitt A.W., Lois N., Medina R.J. et al. Advances in our understanding of diabetic retinopathy. Clinical Science 2013; 125(1): 1–17.

19.Tsagias N., Koliakos I., Lappa M. et al. Placenta perfusion has hematopoietic and mesenchymal progenitor stem cell potential // Transfusion. – 2011. – Vol. 51, №5. – P. 976–985.
20. van Hecke M.V., Dekker J.M., Nijpels G. et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn study // Diabetologia. – 2005. – Vol. 48, №7. – P. 1300–1306.
21.Vincent H.K., Innes K.E., Vincent K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity // Diabetes Obes. Metab. – 2007. – Vol. 9, №6. – P. 813–839.
22.Volarevic V., Arsenijevic N., Lukic M.L., Stojkovic M. Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of Diabetes mellitus // Stem Cells. – 2011. – Vol. 29. – P. 5–10.

18.Tomic M., Ljubic S., Kastelan S. The role of inflammation and endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Collegium Antropologicum 2013; 37(Suppl. 1): 51–57.
19.Tsagias N., Koliakos I., Lappa M. et al. Placenta perfusion has hematopoietic and mesenchymal progenitor stem cell potential. Transfusion 2011; 51(5): 976–985.
20.van Hecke M.V., Dekker J.M., Nijpels G. et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn study. Diabetologia 2005; 48(7): 1300–1306.
21.Vincent H.K., Innes K.E., Vincent K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. Diabetes Obes Metab 2007; 9(6): 813–839.
22.Volarevic V., Arsenijevic N., Lukic M.L., Stojkovic M. Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of Diabetes mellitus. Stem Cells 2011; 29: 5–10.