

УДК 618.39-018.46-053.13-053.13:57.086.13:612.67:577.151.04

О.В. Оченашко^{1*}, Ю.В. Никитченко², А.Ю. Петренко¹

Многократное введение криоконсервированных клеток фетальной печени стареющим крысам предупреждает возрастные изменения антиоксидантных систем и увеличивает продолжительность жизни

UDC 618.39-018.46-053.13-053.13:57.086.13:612.67:577.151.04

O.V. Ochenashko^{1*}, Yu.V. Nikitchenko², A.Yu. Petrenko¹

Multiple Injections of Cryopreserved Fetal Liver Cells to Ageing Rats Prevent Age-Related Antioxidant System Changes and Increase Lifespan

Реферат: В представленной работе исследовали возможность применения криоконсервированных клеток фетальной печени (кКФП) как геропротекторного средства, оценивая его влияние на прооксидантно-антиоксидантный баланс, физиологические параметры и продолжительность жизни стареющих крыс. Установлено, что многократное введение кКФП (каждые 3 месяца) взрослым крысам (с 13- до 22-месячного возраста) предупреждает изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса печени и крови, которые формируются у старых животных к 25 месяцам жизни. Аналогичные многократные инъекции кКФП старым крысам (с 23 месяцев и до конца жизни) способствуют приросту массы тела, препятствуют ухудшению качества шерстного покрова и увеличивают продолжительность жизни на 100 дней. Результаты работы позволяют рассматривать введение кКФП как перспективный подход для коррекции возрастных изменений, связанных с развитием оксидативного стресса.

Ключевые слова: криоконсервированные клетки фетальной печени, многократное введение, крысы, старение, прооксидантно-антиоксидантный потенциал, продолжительность жизни.

Реферат: У роботі досліджували можливість застосування клітин фетальної печінки (кКФП) як геропротекторного засобу, оцінюючи його вплив на прооксидантно-антиоксидантний баланс, фізіологічні параметри та тривалість життя старіючих щурів. Встановлено, що багаторазове введення кКФП (кожні 3 місяці) дорослим щурам (з 13- до 22-місячного віку) попереджає зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу печінки та крові, що формуються у старих тварин до 25 місяців життя. Аналогічні багаторазові ін'єкції кКФП старим щурам (з 23 місяців до кінця життя) сприяють приросту маси тіла, перешкоджають зниженню якості шерстного покриву та збільшують тривалість життя на 100 днів. Результати роботи дозволяють розглядати введення кКФП як перспективний підхід для корекції вікових змін, пов'язаних із розвитком оксидативного стресу.

Ключові слова: криоконсервовані клітини фетальної печінки, багаторазове введення, щури, старіння, прооксидантно-антиоксидантний потенціал, тривалість життя.

Abstract: In this research the possibility of using the cryopreserved fetal liver cells (cFLCs) as anti-ageing agents, as well as assessment of their effect on prooxidant-antioxidant balance, physiological parameters and lifespan of rats during ageing was investigated. Multiple injections of cFLCs (every 3 months) to adult rats (from 13 to 22 months of age) have been established to prevent changes in prooxidant-antioxidant balance of liver and blood, forming in older animals by 25 months. Similar multiple injections of cFLCs to aged rats (from 23 months to the end of life) contribute to their body weight gain, increase state of hair coat and prolong lifespan by 100 days. The results of research allow considering the cFLC transplantation as a promising approach to correct the age-related changes associated with oxidative stress.

Key words: cryopreserved fetal liver cells, multiple injections, rats, ageing, prooxidant-antioxidant potential, lifespan.

Старение – сложный комплекс процессов, включающих биохимические и морфологические изменения в клетках, тканях и организме в целом. Одной из общепринятых теорий, объясняющей процессы старения на молекулярном уровне, является свободнорадикальная теория (или теория

Ageing is a complex of processes involving biochemical and morphological changes in cells, tissues and body as a whole. One of the generally accepted theories explaining the ageing at molecular level is the free-radical theory (or the theory of oxidative stress) proposed by D. Harman in 1956,

¹Відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Інститут Біології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, м. Харків

¹Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: ochenachko@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: ochenachko@ukr.net

Надійшла 03.10.2018

Прийнята до друку 03.09.2019

Received October, 03, 2018

Accepted September, 03, 2019

© 2019 O.V. Ochenashko, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

окислительного стресса), сформулированная D. Harman в 1956 г., согласно которой возраст-зависимые изменения происходят за счет окислительной модификации макромолекул клеток вследствие накопления активных форм кислорода (АФК) и/или снижения активности антиоксидантных (АО) защитных систем [13].

Установлено, что действию окислительного стресса подвержены не только зрелые окончательно дифференцированные клетки, но и резидентные стволовые клетки организма [28]. В процессе естественного старения снижается их способность к самообновлению, поддержанию постоянства клеточных популяций и функциональной полноценности органов [16].

Исходя из этого современные подходы анти-возрастной терапии предполагают использование агентов, обладающих антиоксидантным действием и/или способностью увеличивать активность эндогенных антиоксидантных защитных систем [31], а также, возможно, количество и функциональную активность резидентных стволовых клеток [20].

В этом аспекте перспективным направлением в медицине является клеточная терапия, особенно применение клеток фетального происхождения, обладающих пластичностью, высоким пролиферативным потенциалом в сочетании с низкой иммуногенностью и способностью продуцировать стадиоспецифические биологически активные соединения, стимулирующие рост и регенерацию тканей. Многообещающим объектом для целей клеточной терапии является фетальная печень раннего срока гестации, которая содержит стволовые и прогениторные клетки мезенхимального, мезодермального (гематопоетические) и энтодермального (гепатические) происхождения, вырабатывающие уникальный и до конца неизученный «коктейль» ростовых факторов и цитокинов (эндотелиальный фактор роста, интерлейкин-6, фактор роста гепатоцитов и др.) [25].

Реализация терапевтического потенциала клеток фетальной печени (КФП) подразумевает применение эффективных методов криоконсервирования, обеспечивающих неограниченное по времени сохранение их уникальных свойств. Ранее нами [24, 29, 30] было показано, что криоконсервирование с медленной скоростью охлаждения на первом этапе под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) позволяет в значительной степени сохранить клеточный состав, жизнеспособность и функцию (колониеобразующую активность) гемопоэтических и мезенхимальных стволовых/прогениторных клеток, которые преобладают в фетальной печени этого срока гестации.

according to which the age-associated changes occur due to an oxidative modification of cell macromolecules as a result of an accumulation of reactive oxygen species (ROS) and/or reduction in the activity of antioxidant defense systems [10].

It has been established that not only terminally differentiated mature cells, but also resident stem cells are exposed to oxidative stress [27]. During natural ageing their ability to self-renewal, maintaining the constancy of cell populations and functional integrity of organs is reduced [13].

On this basis, the current approaches of anti-aging therapy involve the use of agents with antioxidant activity and/or the ability to increase the activity of endogenous antioxidant defense systems [30] and, likely, the amount and functional activity of resident stem cells [18].

In this aspect, cell therapy is a promising area in medicine, especially it concerns the use of fetal cells having plasticity, high proliferative potential in combination with low immunogenicity and ability to produce stage-specific biologically active compounds, stimulating tissue growth and regeneration. Fetal liver of early term of gestation, containing stem and progenitor cells of mesenchymal, mesodermal (hematopoietic) and endodermal (hepatic) origin which produce unique and scantily studied 'cocktail' of growth factors and cytokines (endothelial growth factor, interleukin-6, hepatocyte growth factor, *etc.*), is a promising object for cell therapy [24].

Implementation of therapeutic potential of fetal liver cells (FLCs) comprises the use of effective cryopreservation methods, providing an unlimited in time preservation of their unique properties. Previously, we [22, 28, 29] have shown that cryopreservation with a slow cooling rate at the first step under the protection of dimethyl sulfoxide (DMSO) allows to substantially save the cell composition, viability and function (colony-forming activity) of hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells predominating in fetal liver of this gestation term.

Previously in our laboratory, it has been found that cryopreserved fetal liver cells (cFLCs) under allo- and xenogeneic transplantation normalized the balance of prooxidant-antioxidant systems and activated the recovery processes in animals with some experimental pathologies associated with the development of oxidative stress such as hypercholesterolemia in rabbits, liver cirrhosis and chronic alcohol intoxication in rats [9, 11, 16, 17]. The main direction of such an action of cFLCs supposes that the transplantation of fetal cells may be a universal approach, ensuring the reliability of antioxidant defense systems, and as a consequence, the correction of redox balance.

Ранее в нашей лаборатории в условиях алло- и ксенотрансплантации было установлено, что криоконсервированные клетки фетальной печени (кКФП) нормализовали баланс прооксидантно-антиоксидантных систем и активизировали восстановительные процессы у животных с рядом экспериментальных патологий, сопряженных с развитием окислительного стресса: гиперхолестеринемия у кролей, цирроз печени и хроническое отравление алкоголем у крыс [1, 12, 14, 19]. Основная направленность такого действия кКФП позволяет предположить, что введение клеток фетального происхождения может быть универсальным подходом, обеспечивающим повышение надежности АО защитных систем организма, и, как следствие, коррекцию окислительного-восстановительного дисбаланса.

Учитывая существенную роль окислительного стресса в процессах старения, мы посчитали целесообразным изучить геропротекторный эффект кКФП на организм животных при естественном старении.

Цель работы – исследование влияния многократного введения криоконсервированных клеток фетальной печени на прооксидантно-антиоксидантный баланс печени и крови, а также на продолжительность и качество жизни крыс при естественном старении.

Материалы и методы

В эксперименте использовали 80 крыс-самцов линии Вистар двух возрастных групп – взрослые половозрелые (13-месячные) и старые (23-месячные). Исследования проводили в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№3447-IV от 21.02.2006) при соблюдении требований Комитета по биоэтике ИПКиКНАН Украины, согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Все хирургические вмешательства на животных проводили под ингаляционным эфирным наркозом.

Клетки печени выделяли неферментативным методом [23] в стерильных условиях из abortивного материала 8–12 недель гестации (полученного в результате искусственного прерывания беременности после письменного согласия проинформированных доноров). Криоконсервирование проводили под защитой 10% ДМСО с начальной скоростью охлаждения 1 град/мин до -80°C и последующим переносом проб в жидкий азот, где они хранились не менее 2-х месяцев. Непосредственно перед использованием образцы отогревали на водяной бане при 37°C . Типичная су-

Considering a significant role of oxidative stress in ageing, we found it expedient to study geroprotective effect of cFLCs on animals' organism under natural ageing.

The research aim was to study the effect of multiple injections of cFLCs on prooxidant-antioxidant balance of liver and blood, as well as on duration and quality of rat life under natural ageing.

Materials and methods

Experiments were performed in male Wistar rats of two age groups, namely adult sexually mature (13-month-old) and aged animals (23-month-old). The studies were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals against Cruelty' (N 3447-IV of February 21st, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, agreed with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

Liver cells were isolated by non-enzymatic method [21] under sterile conditions using abortive material of 8–12 weeks of gestation (obtained as a result of artificial termination of pregnancy after the written informed consent of donors). Cryopreservation was carried out under the protection of 10% DMSO with an initial cooling rate of 1 deg/min down to -80°C and subsequent transfer of the samples into liquid nitrogen, where they were stored for at least 2 months. The samples were thawed in a water bath at 37°C immediately before using. A typical suspension of cFLCs of this gestation period is a mixture of hematopoietic, mesenchymal stem/progenitor cells and hepatic precursors [22, 28, 29]. Suspensions of cFLCs with a viability of $(68 \pm 6)\%$ (Trypan blue test) were used in the experiment.

Cryopreserved fetal liver cells were injected to femoral vein of rats (10 m / 0.3 ml) every 3 months. The dose of injected cells was selected according to the results of the previous studies, *i. e.* the introduction of 10 million of cFLCs effectively influenced the indices of prooxidant-antioxidant balance and the activity of recovery processes in rats with liver cirrhosis model [16, 17]. The control group of animals received the cell-free medium in equivalent volume.

The experiment consisted of two stages. At the first stage, the effect of multiple injections of FLCs on the indices of rat prooxidant-antioxidant blood system in dynamics from 13 to 25 months of age, as well as on biochemical ones of liver of 25-month-



спензия кКФП этого срока гестации представляет собой смесь гемопоэтических, мезенхимальных стволовых/прогениторных клеток и гепатических предшественников [24, 29, 30]. Для эксперимента использовали суспензии кКФП с жизнеспособностью (68 ± 6) % (тест трипанового синего).

Криоконсервированные клетки фетальной печени вводили в бедренную вену крыс (10 млн/0,3 мл) с интервалом 3 месяца. Дозу вводимых клеток выбирали по результатам предыдущих исследований – введение 10 млн кКФП эффективно влияло на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность восстановительных процессов у крыс с моделью цирроза печени [1, 19]. Контрольная группа животных получала среду криоконсервирования клеток в эквивалентном объеме.

Эксперимент состоял из двух этапов. На первом этапе оценивали влияние серийного введения кКФП на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крови крыс в динамике с 13- до 25-месячного возраста, а также на биохимические показатели печени 25-месячных животных. С учетом полученных данных во второй серии экспериментов оценивали влияние многократного введения КФП на выживаемость (продолжительность жизни), динамику массы тела и состояние шерстного покрова старых крыс (с 23-месячного возраста и до конца их жизни).

Перед каждым введением клеток у 13-, 16-, 19- и 22-месячных животных, а также в конце эксперимента у 25-месячных крыс производили забор крови из хвостовой вены и получали сыворотку для проведения биохимического анализа.

Крыс выводили из эксперимента декапитацией в 25-месячном возрасте. Печень извлекали, охлаждали и выделяли митохондрии и постмитохондриальную фракцию (ПМХ) путем дифференциального центрифугирования.

Содержание ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ПМХ фракции и митохондриях печени определяли по методу Н. Ohkawa и соавт. [21], а в сыворотке крови – по методу Т. Asakawa и соавт. [4] и рассчитывали в эквивалентном количестве малонового диальдегида (МДА), принимая коэффициент молярной экстинкции равным $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Содержание карбонильных групп сывороточных белков определяли спектрофотометрически с помощью 2,4-динитрофенилгидразинового метода [15] и рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Глутатионпероксидазную активность (ГП, GPx, EC 1.11.1.9) измеряли спектрофотометрически

old animals was assessed. Based on the obtained data in the second series of experiments, the effect of multiple injections of FLCs on survival (life-span), body weight gain, state of hair coat in aged rats (from 23 months to the end of life) was evaluated.

In 13-, 16-, 19- and 22-month-old animals, as well as at the end of the experiment in 25-month-old rats the blood were sampled from the tail vein and the serum was obtained for biochemical analysis before each injection of cells.

The rats were decapitated at 25 months of age. The liver was extracted and cooled; mitochondria and post-mitochondrial (PMC) fraction were isolated by differential centrifugation.

The content of TBA-reactive species of lipid peroxidation (LPO) in PMC fraction and liver mitochondria was determined by the method of Ohkawa *et al.* [19], and in the blood serum it was done by the method of Asakawa *et al.* [1] and were calculated in an equivalent amount of malondialdehyde (MDA), taking into account a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

The content of serum protein carbonyl groups was determined spectrophotometrically using the 2,4-dinitrophenylhydrazine method [12] and calculated with a molar extinction coefficient of $22 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Glutathione peroxidase activity (GPx, EC 1.11.1.9) was measured spectrophotometrically in blood serum, PMC fraction and liver mitochondria [20]. The activity was expressed in micromoles of NADPH/min per 1 ml of serum or nanomoles of NADPH/min per 1 mg of protein, taking into account the molar extinction coefficient of $6.22 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Glutathione reductase activity (GR EC 1.6.4.2) was determined spectrophotometrically in PMC fraction and liver mitochondria by the method of Carlsberg *et al.* [4] and expressed in nanomoles of NADPH/min per 1 mg of protein, taking into account the molar extinction coefficient of $6.22 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Glutathione-S-transferase activity (GT EC 2.5.1.18) was measured spectrophotometrically in PMC fraction and liver mitochondria [32] and calculated using a molar extinction coefficient of $9.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Catalase activity (CAT, EC 1.11.1.6) was determined spectrophotometrically in liver PMC fraction [14] and expressed in micromoles of H_2O_2 /min per 1 mg of protein, taking into account molar extinction coefficient for H_2O_2 $39.4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Superoxide dismutase activity (SOD, E.C. 1.15.1.1) was determined spectrophotometrically in blood serum and PMC fractions [3]. Inhibition of 50% of nitrotetrazolium blue reduction rate was assumed



в сыворотке крови, ПМХ фракции и митохондриях печени [22]. Активность выражали в микро-моль НАДФН/мин на 1 мл сыворотки или наномоль НАДФН/мин на 1 мг белка с учетом коэффициента молярной экстинкции $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Глутатионредуктазную активность (ГР, GR EC 1.6.4.2) определяли спектрофотометрически в ПМХ фракции и митохондриях печени по методу I. Carlsberg и соавт. [7] и выражали в наномоль НАДФН/мин на 1 мг белка с учетом коэффициента молярной экстинкции $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Глутатион-S-трансферазную активность (ГТ, GT EC 2.5.1.18) измеряли спектрофотометрически в ПМХ фракции и митохондриях печени [32]. Активность рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Каталазную активность (КАТ, EC 1.11.1.6) определяли спектрофотометрически в ПМХ фракции печени [17] и выражали в микро-моль H_2O_2 /мин на 1 мг белка, принимая коэффициент молярной экстинкции для H_2O_2 $39,4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Супероксиддисмутазную активность (СОД, SOD, EC 1.15.1.1) определяли спектрофотометрически в сыворотке крови и ПМХ фракции [6]. За единицу активности СОД принимали 50%-е ингибирование скорости восстановления нитротетразолия синего и рассчитывали на 1 мл сыворотки или 1 мг белка.

НАДФ⁺-изоцитратдегидрогеназную активность (ИЦДГ, IDH, EC 1.1.1.42) измеряли спектрофотометрически в митохондриях и ПМХ фракции печени [5] и выражали в наномоль НАДФН/мин на 1 мг белка с использованием коэффициента молярной экстинкции $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназную активность (Г6ФДГ, G6PDH, EC 1.1.1.49) определяли спектрофотометрически в ПМХ фракции [34] и выражали в наномоль НАДФН/мин на 1 мг белка с использованием коэффициента молярной экстинкции $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

НАДФ⁺-малатдегидрогеназную активность (МДГ, MDH, EC 1.1.1.40) измеряли в ПМХ фракции спектрофотометрически [3] и выражали в наномоль НАДФН/мин на 1 мг белка с учетом коэффициента молярной экстинкции $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Содержание белка в сыворотке крови, ПМХ фракции и митохондриях печени определяли по методу Лоури в модификации G. Miller [18].

Все измерения проводили на двулучевом спектрофотометре «UV VIS» («Jena», Германия).

Показатель выживаемости старых крыс во второй серии экспериментов рассчитывали по методу Каплан-Мейера [2]. Сравнение кривых выживаемости проводили по методу Гехана с поправкой Йетса.

as SOD unit activity and calculated per 1 ml of serum or 1 mg of protein.

NADP⁺ isocitrate dehydrogenase activity (IDH, EC 1.1.1.42) was measured spectrophotometrically in mitochondria and PMC fraction of liver [2] and expressed in nanomoles of NADPH/min per 1 mg of protein using molar extinction coefficient of $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (G6PDH, EC 1.1.1.49) was determined spectrophotometrically in PMC fraction [34] and expressed in nanomoles of NADPH/min per 1 mg of protein using a molar extinction coefficient of $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

NADP⁺ malate dehydrogenase activity (MDH, EC 1.1.1.40) was measured in PMC fraction spectrophotometrically [31] and expressed in nanomoles of NADPH/min per 1 mg protein, taking into account the molar extinction coefficient of $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Protein content in blood serum, PMC fraction and liver mitochondria were determined by G. Miller modified Lowry method [15].

All the measurements were performed using a UV-VIS spectrophotometer (Jena, Germany).

The survival rate of aged rats at the second stage of experiments was calculated by the Kaplan-Meier method [23]. The survival curves were compared by the Gehan's method with the Yates correction.

Statistical analysis was performed using the OriginPro 2015 (OriginLab, USA) software. The results are presented as mean value \pm standard error of mean ($M \pm \text{SEM}$). The statistical significance of differences between the experimental groups was evaluated by the Mann-Whitney test or the Student's t-test. The data were statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Changes in prooxidant-antioxidant blood balance of ageing rats injected with cFLCs or cryopreservation medium (control) at the age from 13 to 22 months are shown in Fig. 1. It was found that the content of TBA-reactive LPO products in the rat blood serum of the control group did not significantly change up to 22 months of age, then rapidly increased by 25 months up to $(2.7 \pm 0.17) \mu\text{mol MDA/ml}$, that was in 24% higher the initial value of 13-month-old rats (Fig. 1A). In the animals received cFLCs for a long time, the studied index did not change significantly during the observation period, and by the end of the experiment (25 months) it was by 17% lower than in the control.

The reduced level of TBA-reactive species after FLCs introduction was accompanied with a reduced level of carbonyl groups, a known marker of oxi-

Статистический анализ выполняли с помощью пакета программ «OriginPro 2015» («OriginLab», США). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистическую значимость различий между экспериментальными группам оценивали по критерию Манна-Уитни или t -критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждения

Изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса крови стареющих крыс, которым в возрасте от 13 до 22 месяцев вводили кКФП или среду криоконсервирования (контроль), приведены на рис. 1. Установлено, что содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ в сыворотке крови крыс контрольной группы значимо не изменялось до 22-месячного возраста, затем быстро возрастало к 25 месяцам до ($2,7 \pm 0,17$) мкмоль МДА/мл, что на 24% превышало исходное значение, характерное для 13-месячных крыс (рис. 1, А). У животных, длительное время получавших кКФП, исследуемый показатель существенно не изменялся в течение всего срока наблюдения, и к концу эксперимента (25 месяцев) был на 17% ниже, чем в контроле.

Параллельно со снижением ТБК-активных продуктов после введения кКФП в сыворотке крови наблюдалось уменьшение уровня карбонильных групп, накопление которых является известным маркером оксидативного повреждения белков [9]. Так, если в сыворотке крови контрольных 25-месячных крыс содержание карбонильных групп составляло ($2,66 \pm 0,19$) нмоль/мг белка, то после введения кКФП оно снижалось более чем на 30% и составляло ($2,02 \pm 0,16$) нмоль/мг белка (табл. 1).

Результаты исследования антиоксидантной ферментативной защиты крови показали, что активность СОД в контрольной группе монотонно снижалась в течение всего срока наблюдения, и у 25-месячных животных была на 30% ниже, чем у 13-месячных (рис. 1, В). У 19- и 25-месячных животных после введения кКФП активность фермента была выше контроля. При этом у старых 25-месячных животных СОД сохраняла активность, характерную для взрослых 13-месячных крыс.

Активность ГП – основного фермента, утилизирующего гидроперекиси липидов в крови, – у контрольных крыс начинала снижаться после 19-месячного возраста, а к 25 месяцам составляла 56% от исходного ее уровня (рис. 1, С). У животных, которым вводили кКФП, активность ГП с возрастом значимо не изменялась.

дательного повреждения белков [6]. В частности в сыворотке крови контрольных 25-месячных крыс содержание карбонильных групп было ($2,66 \pm 0,19$) нмоль/мг белка, а после введения кКФП оно снижалось более чем на 30% и составило ($2,02 \pm 0,16$) нмоль/мг белка (табл. 1).

Результаты исследования ферментативной системы антиоксидантной защиты крови показали, что активность СОД в контрольной группе постепенно снижалась в течение всего срока наблюдения, и у 25-месячных животных была на 30% ниже, чем у 13-месячных (рис. 1, В). У 19- и 25-месячных животных после введения кКФП активность фермента была выше контроля. При этом у старых 25-месячных животных СОД сохраняла активность, характерную для взрослых 13-месячных крыс.

Активность ГП, основного фермента, утилизирующего гидроперекиси липидов в крови, – у контрольных крыс начинала снижаться после 19 месяцев, а к 25 месяцам составляла 56% от исходного ее уровня (рис. 1, С). У животных, которым вводили кКФП, активность ГП с возрастом значимо не изменялась.

В 25 месяцев крыс, которым вводили кКФП, удаляли из эксперимента и исследовали прооксидантно-антиоксидантный потенциал печени. Предполагая, что митохондрии имеют относительно независимую антиоксидантную систему, ее показатели определяли отдельно в митохондриях и постмитохондриальной (цитозольной) фракции печени.

Таблица 1 показала, что у животных, которым вводили кКФП в течение длительного времени, содержание ТБА-реактивных веществ в PMC фракции печени было на 36% ниже, чем в контрольной группе. В то же время, в митохондриях этот показатель в контрольной и кКФП-группах не различался.

В PMC фракции печени 25-месячных крыс, которым вводили кКФП, активность ГП была на 46% ниже, а активность каталазы – на 30% выше, чем в контрольной группе (табл. 2). Кроме того, активность ГТ и СОД не различалась между контрольной и кКФП-группами.

При исследовании активности ферментов антиоксидантной системы печени с использованием восстановительных эквивалентов (GSH и NADPH) было обнаружено, что активность NADP⁺-зависимой ИДГ и Г6ПДГ в PMC фракции печени крыс, которым вводили кКФП, была в 2,14 и 1,71 раза выше, соответственно, чем в контрольной группе (табл. 3). В то же время, введение кКФП не оказало значимого влияния на активность ГР и NADP⁺-зависимой МДГ в PMC фракции печени.

В митохондриях старой крысы, которым вводили кКФП, активность ГП в ответ на длительное введение кКФП увеличилась на 48,8% по сравнению с контролем. Активность других ферментов печени крыс

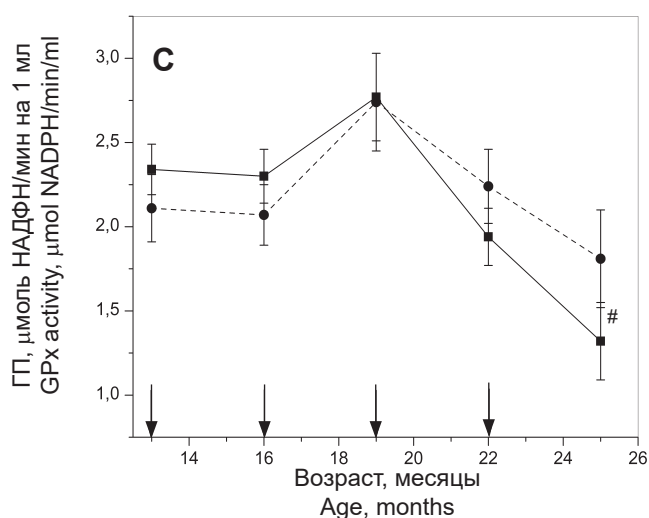
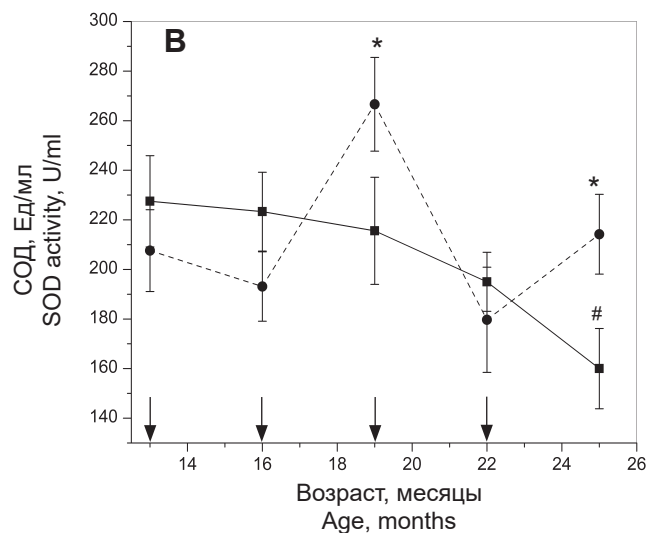
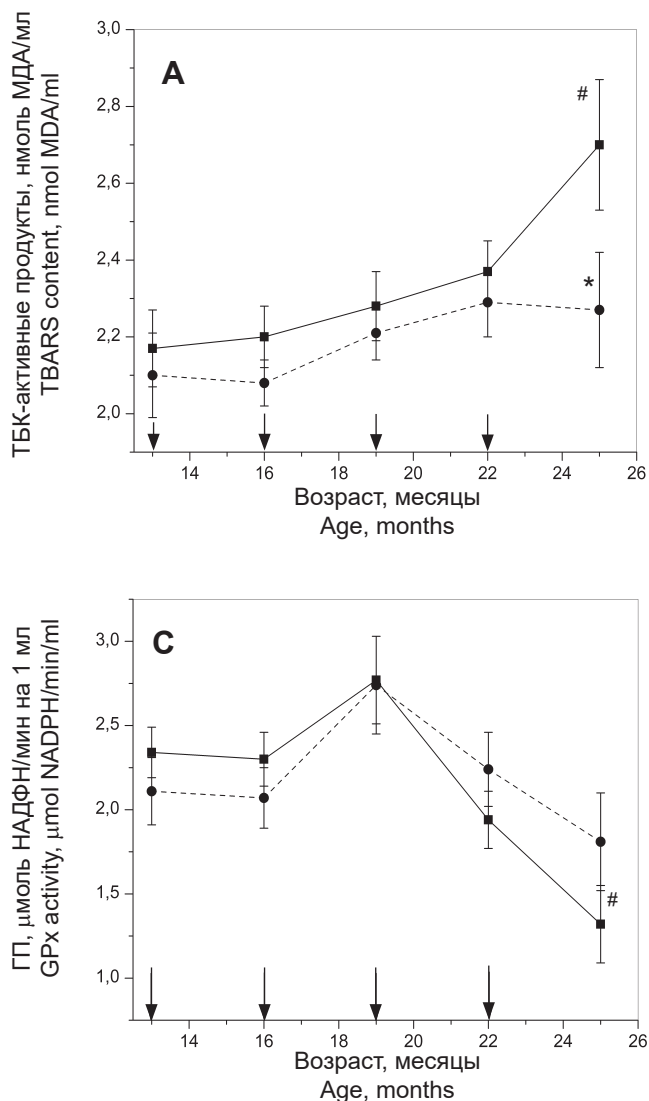


Рис. 1. Динамика прооксидантно-антиоксидантного баланса сыворотки крови стареющих крыс в контрольной группе и после многократного введения кКФП: **А** – ТБК-активные продукты, **В** – супероксиддисмутаза, **С** – глутатионпероксидаза. Стрелками на шкале указано время введения кКФП. Разница статистически значима по сравнению с контрольной группой (*) и исходным уровнем (#), $p < 0,05$.

Fig. 1. Dynamics of blood serum prooxidant-antioxidant balance of ageing rats in the control (sham-transplanted) group and after multiple cFLC injections: **A** – TBA-reactive species, **B** – Superoxide dismutase, **C** – Glutathione peroxidase. Arrows on the scale indicates the time of cFLC injection. Differences are statistically significant if compared with the control (*) and initial level (#), $p < 0.05$.

По достижении 25-месячного возраста крыс выводили из эксперимента и исследовали прооксидантно-антиоксидантный потенциал печени. Учитывая, что митохондрии имеют относительно независимую систему антиоксидантной защиты, ее показатели определяли отдельно в митохондриях и постмитохондриальной (цитозольной) фракции печени.

Из табл. 1. видно, что у животных, которым длительное время вводили кКФП, содержание ТБК-активных продуктов в ПМХ фракции печени было на 36% ниже, чем в контроле. В то же время в митохондриях этот показатель в контрольной и кКФП группах значимо не отличался.

В ПМХ фракции печени 25-месячных крыс, которым многократно вводили кКФП, активность ГП была на 46%, а активность каталазы – на 30% выше, чем в контроле (табл. 2). При этом активность ГТ и СОД между экспериментальными группами существенно не отличалась.

of this experimental group also changed in a similar way: GT, GR, and IDH increased by 64.8, 48.8, and 46.0%, respectively (Table 4).

The findings on the state of pro- and antioxidant systems in liver of aged rats showed that after multiple injections of cFLCs, the activity of antioxidant enzymes in both mitochondrial and PMC (cytosolic) fractions was increased. Such a rise was accompanied by stimulation of the formation of reducing equivalents (GSH and NADPH) necessary for the functioning of GP and GT. This is proven by higher activities of GR, G6PDH and IDH if compared with the control. Moreover, the effect of cFLCs is mainly directed to activation of pentose phosphate pathway for the formation of NADPH and does not affect the activity of NADP⁺-dependent MDH, involved into pyruvate metabolism and 90% of it localized in PMC fraction [35].

Thus, at the first stage of experiment, it was found that multiple injections of cFLCs had a positive effect on ageing rats, that was manifested in supported activity of antioxidant enzymes defense and decreased level of macromolecule oxidation products in liver and blood. It should be assumed

Таблица 1. Прооксидантный потенциал печени и крови старых крыс (25 месяцев) в контрольной группе и после многократных инъекций кКФП ($n = 5-6$)
Table 1. Prooxidant potential of liver and blood serum of aged rats (25 months-old) in the control (sham-transplanted) group and after multiple cFLC injections ($n = 5-6$)

Показатели Indices	Экспериментальные группы Experimental groups	
	Контроль Control	кКФП cFLCs
Карбонильные группы белков сыворотки крови, нмоль/мг белка плазмы Carbonyl groups in blood serum, nmol/mg of serum protein	2,66 ± 0,19	2,02 ± 0,16*
ТБК-активные продукты ПМХ фракции печени, нмоль МДА/мг белка TBA-reactive species in liver PMC fraction, nmol of MDA/mg of protein	0,355 ± 0,036	0,226 ± 0,037*
ТБК-активные продукты митохондрий печени, нмоль МДА/мг белка TBA-reactive species in liver mitochondrial fraction, nmol of MDA/mg of protein	0,634 ± 0,177	0,612 ± 0,081

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.

При исследовании активности ферментов, обеспечивающих глутатионзависимую антиоксидантную систему печени восстановительными эквивалентами (GSH и НАДФН) обнаружено, что НАДФ⁺-зависимые ИЦДГ и Г6ФДГ активности в ПМХ фракции печени крыс, которым вводили кКФП, были в 2,14 и 1,71 раза выше соответственно, чем в контрольной группе (табл. 3). При этом введение кКФП не оказывало существенного влияния на ГР и НАДФ⁺-зависимую МДГ активности ферментов ПМХ фракции печени.

В митохондриях печени старых крыс активность ГП в ответ на длительное введение кКФП увеличивалась на 48,8% по сравнению с контролем. Подобным образом изменялась активность

that the established changes in the pro- and anti-oxidant systems occur in the whole body, whereas in blood and liver they are similar. According to the free radical theory of ageing, the obtained results may indicate the geroprotective effect of FLCs, therefore, at the next stage of experiment, the possibility of using FLCs as a means of increasing the survival and lifespan of aged animals was investigated.

In the second series of experiments, the animals were observed from 23 months of age until the end of life. The medium or cFLCs was injected every 3 months as in previous series of experiments.

The survival rate of experimental animals many times injected with FLCs was higher than in the control group during the all observation period

Таблица 2. Активность антиоксидантных ферментов в постмитохондриальной фракции печени старых крыс (25 месяцев) в контрольной группе и после многократного введения кКФП ($n = 5-6$)

Table 2. Antioxidant enzymes activities in the postmitochondrial fraction of liver of aged rats (25 months-old) in the control (sham-transplanted) group and after multiple cFLC injections ($n = 5-6$)

Показатели Indices	Экспериментальные группы Experimental Groups	
	Контроль Control	кКФП cFLCs
Глутатионпероксидаза, нмоль НАДФН/мин на 1 мг белка Glutathione peroxidase, nmol NADPH/min/mg of protein	64,6 ± 10,5	94,6 ± 7,6*
Глутатион-S-трансфераза, нмоль ХНБ/мин на 1 мг белка Glutathione-S-transferase, nmol CDB/min/mg of protein	410,8 ± 49,1	438,4 ± 35,6
Супероксиддисмутатаза, усл. ед/мин на 1 мг белка Superoxide dismutase, conventional U/min/mg of protein	1830,2 ± 199,1	1724,4 ± 140,6
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /мин на 1 мг белка Catalase, μmol H ₂ O ₂ /min/mg of protein	105,0 ± 7,7	137,5 ± 19,0

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.

Таблица 3. НАДФ⁺-дегидрогеназная и глутатионредуктазная активности постмитохондриальной фракции печени старых крыс (25 месяцев) в контрольной группе и после многократного введения кКФП (нмоль НАДФН/ мин на 1 мг белка (*n* = 5–6))

Tablee 3. NADP⁺-dehydrogenase and glutathione reductase activities in postmitochondrial fraction of aged rat liver (25-months-old) in the control group and after multiple cFLC injections (nmol NADPH/min/mg of protein (*n* = 5–6))

Показатели Indices	Экспериментальные группы Experimental groups	
	Контроль Control	кКФП cFLCs
Изоцитратдегидрогеназная активность Isocitrate dehydrogenase activity	39,7 ± 16,7	85,1 ± 11,4*
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназная активность Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity	1,75 ± 0,18	3,00 ± 0,44*
Малатдегидрогеназная активность Malate dehydrogenase activity	14,1 ± 1,7	17,9 ± 4,8
Глутатионредуктазная активность Glutathione reductase activity	65,8 ± 2,4	69,1 ± 3,2

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, *p* < 0,05.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the control, *p* < 0.05.

и других ферментов печени этой экспериментальной группы: ГТ, ГР и ИЦДГ увеличивались на 64,8, 48,8 и 46,0% соответственно (табл. 4).

Результаты исследования состояния про- и антиоксидантных систем печени старых крыс показали, что после многократного введения кКФП увеличивалась активность антиоксидантных ферментов как в митохондриальной, так и ПМХ (цитозольной) фракциях. Такое увеличение сопровождалось стимуляцией образования восстановительных эквивалентов (GSH и НАДФН), необходимых для работы ГП и ГТ. Об этом свидетельствуют более высокие по сравнению с контролем активности ГР, Г6ФДГ и ИЦДГ. Причем действие кКФП направлено в основном

(Fig. 2). Comparison of survival curves performed using the Gehan's method with the Yates correction showed their significant difference. The median of survival curves of rats in the control group was 830 days. After the administration of cFLCs, the average lifespan of animals increased by 12% (up to 930 days, *p* < 0.05).

In the experiment, the change in body weight, state of hair coat of animals within the first 180 days was controlled, whereas a gradual reduction of the number of surviving rats in all the groups. This was crucial for the correct statistical processing of the results at a distant observations.

The changes in body weight of ageing experimental animals are presented in Fig. 3. In rats of

Таблица 4. Антиоксидантный потенциал митохондриальной фракции печени старых крыс (25 месяцев) в контрольной группе и после многократных инъекций кКФП (*n* = 5–6)

Tablee 4. Antioxidant potential of liver mitochondrial fraction of aged rats (25-months-old) in the control group (sham-transplanted) and after multiple cFLC injections (*n* = 5–6)

Показатели Indices	Экспериментальные группы Experimental groups	
	Контроль Control	кКФП cFLCs
Глутатионпероксидазная активность, нмоль НАДФН/мин на 1 мг белка Glutathione peroxidase activity, nmol NADPH/min/mg of protein	94,1 ± 10,3	140,0 ± 14,9*
Глутатион-S-трансферазная активность, нмоль ХНБ/мин на 1 мг белка Glutathione-S-transferase activity, nmol CDB/min/mg of protein	202,7 ± 42,0	334,0 ± 17,8*
Глутатионредуктазная активность, нмоль НАДФН/мин на 1 мг белка Glutathione reductase activity, nmol NADPH/min/mg of protein	25,4 ± 3,2	37,8 ± 4,1*
Изоцитратдегидрогеназная активность, нмоль НАДФН/мин на 1 мг белка Isocitrate dehydrogenase activity, nmol NADPH/min/mg of protein	79,1 ± 13,2	115,5 ± 6,9*

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, *p* < 0,05.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the control, *p* < 0.05.

на активацию пентозофосфатного пути образования НАДФН и не влияет на активность НАДФ⁺-зависимой МДГ, которая участвует в метаболизме пирувата и на 90% локализована в ПМХ фракции [35].

Таким образом, на первом этапе эксперимента было установлено, что многократные инъекции кКФП оказывают позитивный эффект на организм стареющих крыс, что проявлялось в поддержании активности ферментативной антиоксидантной защиты и снижении уровня продуктов окисления макромолекул в печени и крови. Следует полагать, что установленные изменения в про- и антиоксидантной системах происходят и во всем организме, поскольку в крови и печени они имеют сходный характер. Согласно свободнорадикальной теории старения полученные результаты могут свидетельствовать о геропротекторном эффекте КФП, поэтому на следующем этапе эксперимента исследовали возможность применения КФП в качестве средства, увеличивающего выживаемость и продолжительность жизни старых животных.

Во второй серии экспериментов животных наблюдали с 23-месячного возраста и до конца жизни. Введение кКФП или среды криоконсервирования проводили также, как и в предыдущей серии – каждые 3 месяца.

Выживаемость экспериментальных животных, которым многократно вводили КФП, была выше, чем в контрольной группе в течение всего срока наблюдения (рис. 2). Сравнение кривых выживаемости, проведенное с помощью критерия Гехана с поправкой Йейтса, показало их значимое отличие. Медиана выживаемости крыс контрольной группы составила 830 дней. После введения кКФП средняя продолжительность жизни животных увеличилась на 12% (до 930 дней, $p < 0,05$).

В ходе эксперимента контролировали изменение массы тела и состояние шерстного покрова животных в течение первых 180 дней, поскольку при постепенном уменьшении количества выживших крыс в группах данных для корректной статистической обработки результатов на более поздних сроках наблюдения было недостаточно.

Обнаруженные особенности изменения массы тела экспериментальных животных при старении представлены на рис. 3. У крыс контрольной группы данный показатель увеличился на

the control group, this index increased by 9% to day 85 of the experiment, and did not significantly change later. In the animals injected with cFLCs, there was observed a distinct dependence of the change in body weight on the time of cells introduction. In 40 days after the first administration of cFLCs, the body weight of the animals significantly increased by 12% compared to the initial one. Body weight gain was also found after the second injection of cells. Herewith in experimental rats receiving FLCs, this index was significantly higher than in the control group during the whole observation period.

The state of hair coat in the control group of animals was gradually worsened during ageing (Table 5), *i. e.* the coat gained yellowish tint, became dull, and the thickness of the hair coat decreased. These changes, evaluated with 5-point scale, reached significant differences to day 120 of experiment (relative to the initial state). Moreover, in the animals injected with cFLCs, the state of the hair coat did not change significantly during 180 days of observation.

The main idea of this research was to confirm or reject the hypothesis that an transplantation of fetal cells is a universal approach for correcting of free radical processes. The results of previous studies were the basis for this assumption, *i. e.* in allo- and xenotransplantation of cFLCs normalized the state of antioxidant defense systems

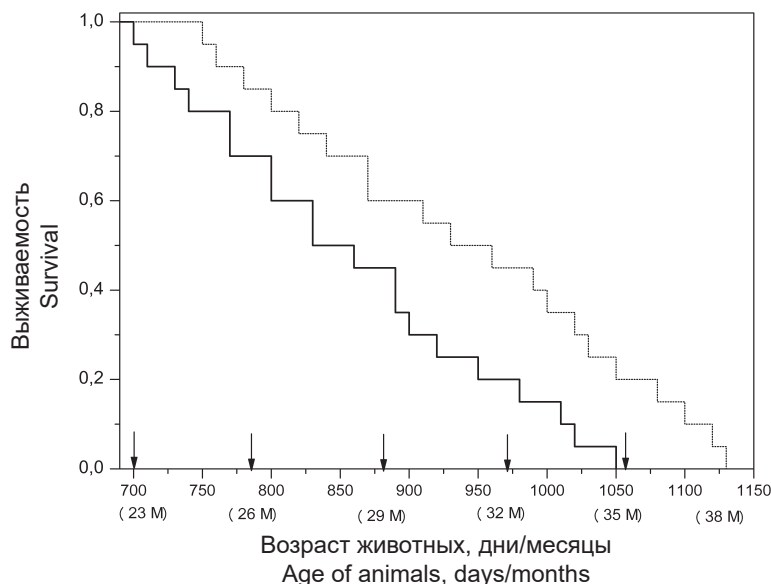


Рис. 2. Эффект многократного введения кКФП на выживаемость крыс при их естественном старении. Продолжительность жизни крыс без (контроль, $n = 20$) и с повторными инъекциями кКФП ($n = 20$). Стрелками на шкале указано время введения кКФП.

Fig. 2. Effect of multiple cFLC injections on the rats survival during their natural ageing. The lifespan of rats without (control, sham-transplanted rats, $n = 20$) and with multiple cFLC injections ($n = 20$). Arrows on scale indicate the time of cFLC injection.

9% к 85-му дню эксперимента, а в последующем значимо не изменялся. У животных, которым вводили кКФП, прослеживалась четкая зависимость изменения массы тела от срока введения клеток. Через 40 дней после первого введения кКФП масса тела животных значимо увеличилась на 12% по сравнению с исходной. Прирост массы наблюдался также после второго введения клеток. При этом у подопытных крыс, получавших кКФП, данный показатель был значимо выше, чем в контрольной группе в течение всего срока наблюдения.

Состояние шерстного покрова у животных контрольной группы в процессе старения постепенно ухудшалось (табл. 5): шерсть приобретала желтоватый оттенок, становилась тусклой, снижалась густота покрова. Эти изменения, оцениваемые по 5-бальной шкале, достигали значимых отличий к 120 дню эксперимента (относительно исходного состояния). При этом у животных, получавших кКФП, состояние шерстного покрова существенно не изменялось в течение 180 дней наблюдения.

Основная идея исследования состояла в подтверждении или опровержении гипотезы о том, что введение клеток фетального происхождения является универсальным подходом для коррекции нарушений регуляции свободнорадикальных процессов. Основанием для этого предположения были результаты предыдущих исследований: в условиях алло- и ксенотрансплантации кКФП оказывали нормализующее действие на состояние АО защитных систем организма животных с рядом экспериментальных патологий, сопряженных с развитием окислительного стресса (цирроз печени [1], хроническое алкогольное поражение печени у крыс [12] и гиперхолестеринемия у кролей [14]).

Исходя из этого, на первом этапе исследовали влияние многократного введения КФП на содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов крови и печени крыс при естественном старении. Введение кКФП начинали с 13 месяцев, т. е. взрослому животному без выраженных признаков старения, и заканчивали в 25-месячном возрасте, соответствующему старческому, когда в организме крыс наблюдаются признаки старения, связанные с развитием оксидативного стресса [8, 27]. Исследуя динамику прооксидантно-антиоксидантного баланса крови, нам удалось установить, что накопление продуктов ПОЛ и снижение активности антиоксидантных ферментов начинаются с 19-месячного возраста. К концу эксперимента (25 месяцев) у контрольных крыс активность

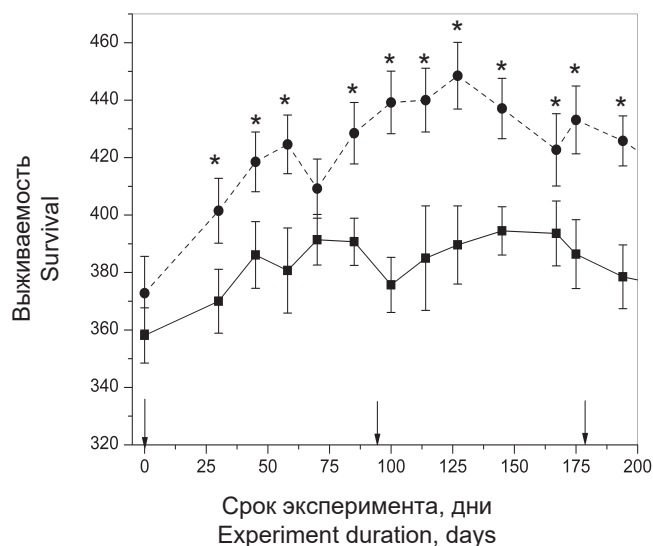


Рис. 3. Динамика массы тела старых крыс в процессе естественного старения в контрольной группе и после серии инъекций кКФП ($n = 6-20$). Стрелками на шкале указано время введения кКФП; * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 3. Dynamics of body weight in aged rats during their natural aging in the control group (sham-transplanted) and after multiple cFLC injections. ($n = 6-20$). Arrows on scale indicates the time of multiple cFLC injections; * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.

of animals with some experimental pathologies associated with the development of oxidative stress, namely liver cirrhosis [16], chronic alcoholic liver damage in rats [8] and hypercholesterolemia in rabbits [11].

Based on this, at the first stage, the effect of multiple injections of cFLCs on the content of TBA-reactive LPO products and activity of antioxidant enzymes of rat blood and liver during natural ageing was studied. Introduction of cFLCs was initiated at 13 months of animals' age, *i. e.* an adult animal with no pronounced signs of ageing, and the observation was terminated at animals' age of 25 months, corresponding to senile one, when the signs of ageing in rats are associated with oxidative stress development [5, 26]. Studying the dynamics of prooxidant-antioxidant blood balance, revealed that accumulation of lipid peroxidation products and a decrease in the activity of antioxidant enzymes began at the animals age of 19 months. By the end of the experiment (25 months of animals' age) in the control rats, the activity of SOD and GP was significantly decreased (by 30 and 44%, respectively). A decrease of antioxidant enzyme activity was accompanied by 24% increase in the level of LPO products.

Multiple injections of cFLCs were noted to have a slight effect on the dynamics of prooxidant-

Таблица 5. Состояние шерстного покрова стареющих крыс в контрольной группе и после серии инъекций кКФП ($n = 9-20$), оценка в баллах

Table 5. Hair coat condition in aging rats in the control group and after multiple cFLC injections ($n = 9-20$)

Срок эксперимента/возраст животных, сутки/месяцы Experiment duration/animals age, days/months	Экспериментальные группы Experimental groups	
	Контроль Control	кФП cFLC
0 (23)	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1
30 (24)	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1
60 (25)	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1
90 (26)	4,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1
120 (27)	3,6 ± 0,2*.#	4,3 ± 0,2
150 (28)	3,5 ± 0,2*	4,1 ± 0,2
180 (29)	3,5 ± 0,1*.#	3,9 ± 0,2

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с исходным состоянием (*) и группой кКФП (#), $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with initial state (*) and group of cFLCs (#), $p < 0.05$.

СОД и ГП значительно снижалась (на 30 и 44% соответственно). Снижение активности антиоксидантных ферментов сопровождалось увеличением на 24 % уровня продуктов ПОЛ.

Интересно, что серийное введение кКФП мало влияло на динамику показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови, вплоть до терминальной стадии эксперимента – 25 месяцев, когда возрастные изменения были максимальными. В этот срок серийное введение кКФП предотвращало возраст-ассоциированное снижение активности антиоксидантных ферментов и увеличение уровня окислительной модификации липидов и белков.

Сходные результаты были получены и при изучении влияния серийного введения КФП на прооксидантно-антиоксидантный баланс в ПМХ (цитозольной) и митохондриальной фракциях печени. Действительно, в печени старых крыс (25-месячных), которым многократно вводили КФП, увеличивалась активность некоторых антиоксидантных ферментов (ГП, каталазы) и ферментов, участвующих в их обеспечении восстановительными эквивалентами (ГР, ГТ, ИЦДГ, Г6ФДГ). Интересно отметить, что повышенная активность антиоксидантных ферментов, наблюдаемая после введения кКФП, сопровождалась снижением уровня ТБК-активных продуктов в цитозоле, но не в митохондриях. Можно предположить, что активация ферментативной системы антиоксидантной защиты в ПМХ является достаточной для утилизации активных форм кислорода и их контроля. В то же время в мито-

antioxidant blood system indices, up to the terminal stage of the experiment (25 months), when the age-related changes were maximal. During this period, multiple injections of cFLCs prevented an age-related decrease of antioxidant enzyme activity and an increase in the level of oxidative modification of lipids and proteins.

When studying the effect of multiple injections of cFLCs on prooxidant-antioxidant balance in PMC (cytosolic) and mitochondrial fractions of liver similar results were obtained. Moreover, in liver of aged rats (25-month-old), which were multiple many times injected with cFLCs, the activity of some antioxidant enzymes (GP, catalase) and the ones involved into providing by the reducing equivalents (GR, GT, IDH, G6PDH) was increased. It is notable that the increased activity of antioxidant enzymes observed after the administration of cFLCs was accompanied with a decreased level of TBA-reactive species in cytosol, but not in mitochondria. The activation of enzymatic system of antioxidant protection in PMC fraction can be assumed to be sufficient for utilization of reactive oxygen species and controlling them. Herewith, in mitochondria, where high doses of ROS are formed under physiological conditions as obligate products of oxidative phosphorylation [7] the antioxidant protection system stimulated by introduction of cFLCs does not reduce their level.

Thus, after multiple injections of cFLCs for 12 months, the content of LPO products and the activity of antioxidant enzymes (SOD and GP) in blood of aged rats returned to normal level of adult animals.



хондриях, где при физиологических условиях образуются высокие дозы АФК как облигатные продукты окислительного фосфорилирования [10], стимулированная введением кКФП система антиоксидантной защиты не снижает их уровень.

Таким образом, в результате серийных инъекций кКФП в течение 12 месяцев содержание продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов (СОД и ГП) в крови старых крыс нормализовались до уровня взрослых животных.

В последствии, когда такой эффект был обнаружен, на втором этапе эксперимента исследовали влияние кКФП на продолжительность и качество жизни старых животных. Многократное введение кКФП не только увеличивало медиану выживаемости экспериментальных животных на 100 дней, но также способствовало приросту массы тела и препятствовало ухудшению качества шерстного покрова.

Следует отметить, что увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных после введения МСК фетального происхождения (из амниотической мембраны) и костного мозга молодых животных продемонстрировано и в других исследованиях [26, 33]. На модели животных с ускоренным старением такой эффект сочетался со снижением уровня оксидативного стресса и увеличением активности АО ферментов [33], что согласуется с результатами нашей работы.

Можно полагать, что выраженное геропротекторное действие кКФП, направленное на поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса, связано с их высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом, а также паракринными эффектами ростовых факторов и цитокинов, которые секретируют эти клетки. В частности, показана возможность паракринного влияния интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 на увеличение экспрессии гена MnСОД гепатоцитов [11], что является важным для нашего исследования, поскольку экспрессия генов ряда АО ферментов существенно снижается при старении [26]. Однако точный механизм влияния кКФП на состояние антиоксидантно-прооксидантного баланса остается до конца неясным и требует дальнейшего изучения.

Использование клеток фетального происхождения в регенеративной медицине имеет ограничение, связанное с опасностью неконтролируемой пролиферации введенных клеток и образованием опухолей. В нашем исследовании длительное наблюдение за животными после многократного введения кКФП не выявило негативных последствий или развития побочных эффектов, что мо-

Thereafter, when such an effect was discovered, at the second stage of experiment, the effect of cFLCs on duration and quality of life of aged animals was studied. Multiple injections of cFLCs not only increased the survival median of experimental animals by day 100, but also contributed to body weight gain and prevented the hair coat worsening.

It should be noted that an increase of experimental animals lifespan after the introduction of fetal MSCs (from amniotic membrane) and bone marrow of young animals was confirmed in other studies [25, 33]. In a model of animals with accelerated ageing, this effect was combined with a decreased level of oxidative stress and an increased activity of AO enzymes [33] that was consistent with the results of our research.

It can be assumed that expressed geroprotective effect of cFLCs for maintaining the prooxidant-antioxidant balance is associated with their high proliferative and differentiating potential, as well as the paracrine effects of growth factors and cytokines, secreting these cells. In particular, the possibility of paracrine effect of interleukin-1 β and interleukin-6 on the increase of hepatocyte MnSOD gene expression [8] was shown. It is important for our research, whereas the gene expression of some antioxidative enzymes is significantly decreased with ageing [26]. However, the exact mechanism of cFLC effect on the state of antioxidant-prooxidant balance remains unclear and requires the further study.

The application of fetal cells in regenerative medicine has a limitation associated with the threat of uncontrolled proliferation of injected cells and the formation of tumors. In our study, the long-term observation of animals after multiple injections of cFLCs did not reveal negative consequences or the development of side effects, that may indicate not only effectiveness, but also their safety.

Our findings demonstrate that multiple injections of cFLCs to adult rats starting from 13 months of animals' age prevent the changes in pro- and antioxidant balance of liver and blood. These changes appeared in aged animals by 25 months of age. Multiple injections of cFLCs to aged rats (starting from 23 months of animals' age) increase the lifespan (by 12%) and improve the life quality of experimental animals. This allows us to consider the introduction of cFLCs as a promising approach to correct age-related changes associated with oxidative stress.

Conclusions

1. During ageing from 13 months to 25 months of the activity of antioxidant blood enzymes (SOD

жет свидетельствовать не только об эффективности, но и о безопасности такого подхода.

Результаты настоящей работы демонстрируют, что серийное введение кКФП взрослым крысам с 13-месячного возраста предупреждает изменения проантиоксидантного баланса печени и крови, которые формируются у старых животных к 25-месячному возрасту. Повторные инъекции кКФП старым крысам (с 23 месяцев) увеличивают продолжительность (на 12%) и улучшают качество жизни экспериментальных животных. Это позволяет рассматривать введение кКФП как перспективный подход для коррекции возрастных изменений, связанных с развитием оксидативного стресса.

Выводы

1. В процессе старения крыс в возрасте от 13 до 25 месяцев снижается активность антиоксидантных ферментов крови (СОД и ГП), что сопровождается увеличением продуктов свободнорадикального окисления липидов и белков. Существенные изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса крови наблюдаются после 19–22-месячного возраста. Многократное введение кКФП снижает накопление продуктов свободнорадикального повреждения макромолекул и замедляет развитие возрастных изменений активности антиоксидантных ферментов крови.

2. В печени старых крыс (25-месячных), которым многократно вводили кКФП, активность антиоксидантных ферментов (ГПО, ГТ, каталазы) и ферментов, участвующих в их обеспечении восстановительными эквивалентами (ГР, ИЦДГ, Г6ФДГ) была значимо выше, чем у контрольных крыс того же возраста. Высокая активность этих ферментов сопровождается снижением уровня ТБК-активных продуктов ПОЛ в постмитохондриальной, но не в митохондриальной фракциях.

3. Введение кКФП старым животным с 23-месячного возраста увеличивает среднюю продолжительность жизни на 100 дней. Показатели физиологического состояния (масса тела, состояние шерстного покрова) свидетельствуют об улучшении качества жизни старых крыс.

Литература

1. Оченашко ОВ, Нікітченко ЮВ, Лебединський ОС, та ін. Активність антиоксидантної системи щурів з експериментальним цирозом після введення кріоконсервованих клітин фетальної печінки. Укр біохім журн. 2011; 83(2): 85–92.
2. Платонов АЕ. Статистический анализ в медицине и биоло-

and GP) in animals decreased, that was accompanied with increase of products of free radical oxidation of lipids and proteins. Significant changes in prooxidant-antioxidant imbalance blood were observed after months 19 and 22 of animals' age. Multiple injections of cFLCs reduce the accumulation of products of free radical damage of macromolecules and prevent the development of age-associated changes in of activity antioxidant enzymes in blood.

2. In liver of aged rats (25-month-old), multiple many times injected with cFLCs, the activity of antioxidant enzymes (GP, GT, catalase) and the enzymes involved into their providing with reducing equivalents (GR, IDH, G6PDH) was significantly higher than in the control rats of the same age. A high activity of these enzymes is accompanied with a decreased level of TBA-reactive lipid peroxidation products in the post-mitochondrial, but not in the mitochondrial fractions.

3. Introduction of cFLCs to aged animals starting from 23 months of animals' age led to an increase in average lifespan by 100 days. Indices of physiological state (body weight, state of hair coat) testified to the improved quality of aged rat life.

References

1. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980; 15(3): 137–140.
2. Bauman DE, Brown RE, Davis CL. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow, and cow. *Arch Biochem Biophys*. 1970; 140(1):237–44.
3. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971; 44(1):276–87.
4. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985; 113:484–90.
5. Choksi KB, Papaconstantinou J. Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(10):1795–805.
6. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1–2):23–38.
7. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015; 6:472–85.
8. Kayanoki Y, Fujii J, Suzuki K, Kawata S, et al. Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor-beta 1 in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1994;269(22):15488–92.
9. Kovalov GA, Cherkashina DV. Modulating the state of the pro-oxidant-antioxidant brain system with xenopreparations under experimental chronic alcohol poisoning. *Cell Preserv Technol*. 2008; 6(1): 108.
10. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological



- гии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы.– Москва: Издательство РАМН; 2000. 52 с.
3. Усатенко МС, Цончева АВ. Влияние инсулиннедостаточности и гидрокортизона на активность NADP- и NAD-зависимых малатдегидрогеназ в печени и коре почек крыс. *Вопр мед химии*. 1974; 20 (4): 401–6.
 4. Asakawa T, Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980; 15(3): 137–40.
 5. Bauman DE, Brown RE, Davis CL. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow, and cow. *Arch Biochem Biophys*. 1970; 140(1): 237–44.
 6. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971;44(1):276–87.
 7. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113:484–90.
 8. Choksi KB, Papaconstantinou J. Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(10):1795–805.
 9. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1–2):23–38.
 10. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015;6:472–85.
 11. Kayanoki Y, Fujii J, Suzuki K, et al. Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor-beta 1 in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1994;269(22):15488–92.
 12. Kovalov GA, Cherkashina DV. Modulating the state of the pro-oxidant-antioxidant brain system with xenopreparations under experimental chronic alcohol poisoning. *Cell Preserv Technol*. 2008;6(1): 108.
 13. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292(1): 18–36.
 14. Lebedinsky AS, Cherkashina DV, Sukach AN, et al. Positive effects of cryopreserved adult or fetal liver cell transplants on hypercholesterolemia and hepatic antioxidant defenses in cholesterol-fed rabbits. *Cryobiology*. 2007;55(1):72–9.
 15. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 346–57.
 16. Liu L, Rando TA. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol*. 2011;193(2):257–66.
 17. Marklund S, Nordensson I, Bäck O. Normal CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in Werner's syndrome. *J Gerontol*. 1981;36(4):405–9.
 18. Miller G.L. Protein Determination of Large Numbers of Samples. *Anal Chem*. 1959, 31 (5): 964.
 19. Ochenashko OV, Volkova NA, Mazur SP, et al. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl4-induced cirrhosis. *Cell Transplant*. 2006;15(1):23–33.
 20. Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med*. 2014; 20(8):870–80.
 21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351–8.
 22. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158–69.
 23. Petrenko AY, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Anal Biochem*. 1991;194(2): 326–9.
 24. Petrenko YA, Jones DR, Petrenko AY. Cryopreservation considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292(1): 18–36.
 25. Lebedinsky AS, Cherkashina DV, et al. Positive effects of cryopreserved adult or fetal liver cell transplants on hypercholesterolemia and hepatic antioxidant defenses in cholesterol-fed rabbits. *Cryobiology*. 2007;55(1):72–9.
 26. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 346–57.
 27. Liu L, Rando TA. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol*. 2011;193(2):257–66.
 28. Marklund S, Nordensson I, Bäck O. Normal CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in Werner's syndrome. *J Gerontol*. 1981;36(4):405–9.
 29. Miller G.L. Protein Determination of Large Numbers of Samples. *Anal Chem*. 1959, 31 (5): 964.
 30. Ochenashko OV, Volkova NA, Mazur SP, et al. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl4-induced cirrhosis. *Cell Transplant*. 2006;15(1):23–33.
 31. Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med*. 2014; 20(8):870–80.
 32. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351–8.
 33. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158–69.
 34. Petrenko AY, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Anal Biochem*. 1991;194(2): 326–9.
 35. Petrenko YA, Jones DR, Petrenko AY. Cryopreservation considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292(1): 18–36.
 36. Semeraro R, Cardinale V, Carpino G, et al. The fetal liver as cell source for the regenerative medicine of liver and pancreas. *Ann Transl Med*. [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 31]; 1(2):13. Available from: <http://atm.amegroups.com/article/view/1187/1557>.
 37. Shen J, Tsai YT, Dimarco NM, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice. *Sci Rep*. [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 31]; 1:67. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep00067>.
 38. Shih PH1, Yen GC. Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. *Biogerontology*. 2007;8(2):71–80.
 39. Shytle RD, Ehrhart J, Tan J, et al. Oxidative stress of neural, hematopoietic, and stem cells: protection by natural compounds. *Rejuvenation Res*. 2007;10(2):173–8.
 40. Skorobogatova N, Novikov AN, Fuller BJ, Petrenko AY. Importance of a three-stage cooling regime and induced ice nucleation during cryopreservation on colony-forming potential and differentiation in mesenchymal stem/progenitor cells from human fetal liver. *Cryo Letters*. 2010;31(5):371–9.
 41. Tarasov AI, Petrenko AY, Jones DR. The osmotic characteristics of human fetal liver-derived hematopoietic stem cell candidates. *Cryobiology*. 2004;48(3):333–40.
 42. Tung BT, Rodriguez-Bies E, Thanh HN, et al. Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. *Aging Clin Exp Res*. 2015;27(6):775–83.
 43. Usatenko MS, Tsoncheva AV. [The effect of insulin deficiency and hydrocortisone on the activity of NADP- and NAD-

- of human fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium. *Cryobiology*. 2008;57(3):195–200.
25. Semeraro R, Cardinale V, Carpino G, et al. The fetal liver as cell source for the regenerative medicine of liver and pancreas. *Ann Transl Med*. [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 31]; 1(2):13. Available from: <http://atm.amegroups.com/article/view/1187/1557>.
 26. Shen J, Tsai YT, Dimarco NM, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice. *Sci Rep*. [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 31]; 1:67. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep00067>.
 27. Shih PH1, Yen GC. Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. *Biogerontology*. 2007;8(2):71–80.
 28. Shytle RD, Ehrhart J, Tan J, et al. Oxidative stress of neural, hematopoietic, and stem cells: protection by natural compounds. *Rejuvenation Res*. 2007;10(2):173–8.
 29. Skorobogatova N, Novikov AN, Fuller BJ, Petrenko AY. Importance of a three-stage cooling regime and induced ice nucleation during cryopreservation on colony-forming potential and differentiation in mesenchymal stem/progenitor cells from human fetal liver. *Cryo Letters*. 2010;31(5):371–9.
 30. Tarasov AI, Petrenko AY, Jones DR. The osmotic characteristics of human fetal liver-derived hematopoietic stem cell candidates. *Cryobiology*. 2004;48(3):333–40.
 31. Tung BT, Rodriguez-Bies E, Thanh HN, et al. Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. *Aging Clin Exp Res*. 2015;27(6):775–83.
 32. Younes M, Schlichting R, Siegers CP. Glutathione S-transferase activities in rat liver: effect of some factors influencing the metabolism of xenobiotics. *Pharmacol Res Commun*. 1980;12(2):115–29.
 33. Xie C, Jin J, Lv X, et al. Anti-aging Effect of Transplanted Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells in a Premature Aging Model of Bmi-1 Deficiency. *Sci Rep*. [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 31];5:13975. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep13975>.
 34. Zaheer N, Tewari KK, Krishnan PS. Mitochondrial forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1967;120(1):22–34.
 35. Zelewski M, Swierczyński J. Malic enzyme in human liver. Intracellular distribution, purification and properties of cytosolic isozyme. *Eur J Biochem*. 1991;201(2):339–45.
- dependent malate dehydrogenase in rat liver and renal cortex]. *Vopr Med Khim*. 1974;20(4):401–6. Russian.
32. Younes M, Schlichting R, Siegers CP. Glutathione S-transferase activities in rat liver: effect of some factors influencing the metabolism of xenobiotics. *Pharmacol Res Commun*. 1980; 12(2):115–29.
 33. Xie C, Jin J, Lv X, et al. Anti-aging Effect of Transplanted Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells in a Premature Aging Model of Bmi-1 Deficiency. *Sci Rep*. [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 31];5:13975. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep13975>.
 34. Zaheer N, Tewari KK, Krishnan PS. Mitochondrial forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1967;120(1):22–34.
 35. Zelewski M, Swierczyński J. Malic enzyme in human liver. Intracellular distribution, purification and properties of cytosolic isozyme. *Eur J Biochem*. 1991;201(2):339–45.