

А. І. Гоженко, В. М. Сірман¹, Н. Д. Філіпець², О. О. Філіпець²
УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ МЕДИЦИНИ ТРАНСПОРТУ, ОДЕСА
КООРДИНАЦІЙНИЙ ЦЕНТР ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОРГАНІВ, ТКАНИН І КЛІТИН¹, КИЇВ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ², ЧЕРНІВЦІ

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЩУРАМ З ВОДНИМ І СОЛЬОВИМ РЕЖИМОМ ПИТТЯ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ГОСТРОЇ СУЛЕМОВОЇ НЕФРОПАТІЇ

В експериментах на нелінійних білих щурах із гострою сулемовою нефропатією встановлено, що через 7 днів після внутрішньочеревного введення клітин фетальної печінки (КФП) щурам зменшувалась концентрація креатиніну в плазмі крові та збільшувалась проксимальна реабсорбція іонів натрію незалежно від водного чи сольового режиму пиття. Підвищення рівня натріємії у тварин, які вживали водопровідну воду, виключало регуляторний вплив КФП на процеси забезпечення натрієвого балансу в організмі за цих умов експерименту. При вживанні 0,9 % розчину NaCl збільшувалась швидкість клубочкової фільтрації, активувався каналцевий транспорт іонів натрію з переважним підвищенням реабсорбції в проксимальному відділі нефрону, зменшувалась втрата іонів натрію із сечею, що вказує на значну роль сольового режиму пиття для додаткового сприятливого впливу КФП на ниркові процеси у щурів із гострою сулемовою нефропатією.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фетальні клітини печінки щурів, сулемова нефропатія.

ВСТУП. До принципово нових підходів, які створюють умови для прискорення репаративних процесів у пошкоджених тканинах і органах, належить регенеративна медицина. Одним з патогенетично обґрунтованих і потенційно ефективних напрямків є лікування прогеніторними клітинами багатьох захворювань [8, 12, 15]. Сучасні наукові досягнення створили вагомі передумови для розвитку клітинної терапії в нефрології, що значною мірою стимулює вдосконалення цієї перспективної стратегії, спрямованої на зниження прогресування ниркової недостатності до термінальної стадії і покращення якості життя хворих на хронічну хворобу нирок [10, 11, 13, 14].

Серед методів стимуляції репаративно-регенераторних процесів відомим є застосування клітин фетальної печінки (КФП) [1, 5, 6]. Клітинна культура фетальної печінки має високу проліферативну активність і пластичність, низьку імуногенність. Порівняно з донорським матеріалом постнатального періоду перевагами фетотерапії є більша мобільність і здатність проникати в

© А. І. Гоженко, В. М. Сірман, Н. Д. Філіпець, О. О. Філіпець, 2016.

патологічні ділянки, а також мінімізація небажаних наслідків лікування. Беручи до уваги високу патогенетичну адаптованість, інтерес становить дослідження ефектів КФП за умов прямої дії на нирки токсичних факторів, які призводять спочатку до функціонування пошкоджених нефронів, а в подальшому – зменшення їх кількості. Ступінь впливу фетальних клітин на порушені ниркові процеси, як і інших методів терапії, залежить від створених комплексним лікуванням сприятливих умов для корекції. Особливості гомеостатичних функцій нирок залежать від характеристики питних розчинів, а саме від кількісного складу осмотично активних іонів натрію [2]. Отже, метою роботи було вивчити зміни функціонального стану нирок після введення клітин фетальної печінки щурам із гострою сулемовою нефропатією, які перебували на водному і сольовому режимі пиття.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проводили на 24 нелінійних лабораторних білих щурах-самцях, які перебували у звичайних умовах віварію на харчуванні зерном пшениці з вільним доступом до відстояної водопровідної

води. За 6 год до моделювання сулемової нефропатії (одноразове підшкірне введення дихлориду ртуті в дозі 1 мг/кг) групу з 12 тварин переводили на сольовий режим пиття (0,9 % розчин NaCl). Через 48 год після створення моделі 6 щурам кожної групи (з водним і сольовим режимом пиття) вводили внутрішньочеревно по 0,3 мл суспензії КФП із загальною концентрацією $2,8 \times 10^7$ клітин в 1,8 мл суспензії. Попередньо КФП білих безпородних щурів 14–15 діб гестації кріоконсервували під захистом 10 % диметилсульфоксиду в кріопробірці Nunc (Німеччина) об'ємом 1,8 мл із концентрацією $1,6 \times 10^7$ клітин в 1 мл на програмному заморожувачі УОП-6 виробництва спеціального конструкторсько-технологічного бюро з дослідним виробництвом Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Режим заморожування: охолодження зі швидкістю 1 град/хв до -25 °С з подальшим зануренням кріопробірок у рідкий азот [7]. На 7 день після одноразового введення КФП усім групам щурів за допомогою внутрішньошлункового металевого зонда проводили водне навантаження водопровідною водою кімнатної температури в об'ємі 5 % від маси тіла і поміщали на 2 год в обмінні клітки для збору сечі. Евтаназію здійснювали під нембуталовим наркозом (20 мг/кг). Концентрацію іонів натрію в плазмі крові та сечі щурів визначали методом полум'яної фотометрії, концентрацію креатиніну в плазмі крові – методом Поппера у пропису А. К. Мерзона, концентрацію креатиніну в сечі – методом Фоліна, концентрацію білка в сечі – сульфосаліциловим методом за Міхеєвою та Богодаровою. Стандартизовані за масою тіла й об'ємом клубочкового фільтрату показники визначали за загальноновизнаними формулами для оцінки функцій нирок. Статистичну обробку даних проводили за програмою Statgraphics з урахуванням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Зміни показників функціонального стану нирок на 7 день після введення КФП залежали від якості питного режиму щурів із сулемовою нефропатією (табл.).

У щурів із сулемовою нефропатією, які протягом експерименту перебували на водному режимі пиття, на 7 день після введення КФП концентрація креатиніну в плазмі крові зменшувалась на 24,7%. Гіперкреатинінемія супроводжує сулемову нефропатію, а редукція цього показника є вагомим критерієм оцінки нефропротекції [3, 4]. Незважаючи на тенденцію до підвищення швидкості клубочкової фільтрації, екскреція креатиніну не збільшувалась, і цей факт виключав судження про зниження ретенційної азотемії

за рахунок активації екскреторної функції нирок. Підвищення на 4,1 % стандартизованої за клубочковим фільтратом проксимальної реабсорбції іонів натрію вказувало на посилення транспортних процесів у канальцевому відділі нефрону. Збільшення реабсорбції іонів натрію можна розглядати як активацію компенсаторних процесів, спрямованих на зменшення втрати іонів натрію із сечею. Водночас покращення проксимальної реабсорбції цього катіона було важливою ознакою спектра протекторної здатності. Однак зростання на 4 % концентрації іонів натрію в плазмі крові, основного показника сталості цього електроліту в організмі, свідчило про порушення механізмів натрієвого балансу, іоно-, осморегулювальної функцій нирок і процесів, що їх забезпечують.

На 7 день після введення КФП у щурів, які перебували на сольовому режимі пиття, водорегулювальна функція нирок характеризувалась збільшенням на 28,2 % діурезу, зменшенням на 20 % кліренсу іонів натрію (табл.). Концентрація креатиніну в плазмі крові зменшувалась на 33,2%. Суттєве значення для оцінки функціональних відмінностей нирок у проведених експериментах мало збільшення швидкості клубочкової фільтрації на 90,8 % після введення КФП щурам, які перебували на сольовому режимі пиття. Канальцева реабсорбція води не змінювалась, сечовиділення підвищувалось у результаті посилення гломерулярних процесів. При збільшенні надходження іонів натрію в організм і, відповідно, при пригніченні ренін-ангіотензинової системи та активації факторів вазодилатації результати впливу КФП на клубочковому рівні нефрону були більш вираженими, ніж у щурів з водним режимом пиття. Імовірно, зростали компенсаторні можливості нирок, які базуються на включенні функціонального ниркового резерву [9].

Швидкість клубочкової фільтрації є першим фактором регуляції нирками сталості в організмі осмотично активного іона натрію. Оцінка показників стану натрієвого обміну показала, що концентрація цього електроліту в плазмі крові не змінювалась, фільтраційна фракція іонів натрію зростала на 86 %, концентрація в сечі й екскреція іонів натрію зменшувались, відповідно, на 84,3 і 50 %. Екзотоксичне ураження нирок, як правило, проявляється розвитком гострої нефропатії внаслідок прямої ренальної дії токсикантів із формуванням гострого кортикального некрозу, загибелі великої кількості канальців, пошкодження клубочків за рахунок ішемії тканин нирок [3]. Встановлено, що порушення ниркових процесів і функцій у патологічному аспекті об'єднує пошкодження проксимальних канальців, де процеси реабсорбції є визначальним фактором

Таблиця – Показники функціонального стану нирок тварин із гострою сулемовою нефропатією на 7 день після введення клітин фетальної печінки щурів ($\bar{x} \pm Sx$, $n=6$)

Показник	Водний режим пиття		Сольовий режим пиття	
	сулемова нефропатія	сулемова нефропатія та КФП	сулемова нефропатія	сулемова нефропатія та КФП
Діурез, мл/2 год	4,7±0,23	4,5±0,14	3,9±0,14	5,0±0,21 $p_1 < 0,01$
Концентрація креатиніну в плазмі крові, мкмоль/л	45,4±0,96	34,2±3,11 $p < 0,01$	50,0±2,4	33,4±3,24 $p_1 < 0,01$
Концентрація креатиніну в сечі, моль/л	1,5±0,06	1,3±0,12	1,2±0,07	1,1±0,07
Клубочкова фільтрація, мкл/хв	1291,8±81,57	1507,5±154,31	763,3±52,96	1456,5±177,97 $p_1 < 0,01$
Екскреція креатиніну, мкмоль/2 год	7,03±0,40	6,0±0,54	4,5±0,32	5,6±0,45
Реабсорбція води, %	97,0±0,08	97,3±0,26	95,6±0,47	96,9±0,42
Концентрація Na ⁺ в плазмі крові, ммоль/л	202,0±3,20	210,4±1,45 $p < 0,05$	215,5±4,40	209,5±3,20
Концентрація Na ⁺ в сечі, ммоль/л	0,38±0,022	0,40±0,058	2,22±0,212	0,35±0,030 $p_1 < 0,001$
Фільтраційна фракція Na ⁺ , мкмоль/хв	261,3±17,97	316,7±31,58	164,0±9,65	305,1±38,97 $p_1 < 0,01$
Екскреторна фракція Na ⁺ , мкмоль/хв	0,014±0,0004	0,015±0,0021	0,072±0,0076	0,002±7,4180 $p_1 < 0,001$
Реабсорбція Na ⁺ , %	99,99±0,001	99,99±0,009	99,95±0,004	99,99±0,003 $p_1 < 0,001$
Екскреція Na ⁺ , мкмоль/2 год	1,7±0,05	1,8±0,25	1,2±0,13	1,8±0,21 $p_1 < 0,001$
Проксимальна реабсорбція Na ⁺ , ммоль/2 год	30,4±2,10	37,0±3,77	18,8±1,17	35,5±4,64 $p_1 < 0,01$
Дистальна реабсорбція Na ⁺ , мкмоль/2 год	939,3±52,91	944,7±25,40	838,8±44,2	1059,9±62,07 $p_1 < 0,05$
Кліренс Na ⁺ , мл/2 год	0,009±0,0003	0,008±0,0011	0,040±0,0047	0,008±0,0009 $p_1 < 0,001$
Екскреція Na ⁺ /100 мкл КФ	0,14±0,010	0,13±0,023	1,16±0,134	0,12±0,008 $p_1 < 0,001$
Проксимальна реабсорбція Na ⁺ , 100 мкл КФ	19,6±0,32	20,4±0,11 $p < 0,05$	20,5±0,36	20,3±0,24
Дистальна реабсорбція Na ⁺ /100 мкл КФ	0,61±0,011	0,55±0,058	0,94±0,109	0,65±0,092 $p_1 < 0,05$
Концентрація білка в сечі, г/л	0,05±0,003	0,06±0,009	0,04±0,002	0,07±0,021
Екскреція білка/100 мкл КФ	0,018±0,0013	0,019±0,0032	0,022±0,0026	0,026±0,0074

Примітки: 1. p – достовірність відмінностей між групами щурів з водним режимом пиття.
2. p_1 – достовірність відмінностей між групами щурів із сольовим режимом пиття.
3. КФ – клубочковий фільтрат.

регуляції натрієвого балансу. Після введення КФП у щурів із сольовим режимом пиття за рахунок збільшеної вдвічі швидкості клубочкової фільтрації підвищувались завантаження іонами натрію каналцевого відділу нефрону і функціональне навантаження на транспортні системи нирок. Абсолютна реабсорбція іонів натрію зростала з (163,9±9,65) до (305,1±38,97) мкмоль/хв, збільшувалась і відносна реабсорбція. Аналіз локалізації змін каналцевих процесів показав, що в щурів із сольовим режимом пиття після введення КФП підвищення проксимальної реабсорбції іонів натрію становило 88,8 %, дистальної реабсорбції – 26,3 %, а при перерахунку за клубочковою фільтрацією цей показник знижувався на 30,9 %.

Постійним індикатором токсичних нефропатій є протеїнурія, переважно тубулярного генезу [3, 4]. Незалежно від якості пиття після введення КФП концентрація в сечі та екскреція білка не змінювались і в механізмах пошкодження нирок зберігався фактор перевантаження каналців білком, що реабсорбується в проксимальному відділі. Можливо, після введення КФП зменшувалась ступінь як вторинного пошкодження каналців, так і зниження кількості нефронів, що функціонують, у гострий період сулемової нефропатії. На користь цього судження свідчать зменшення на 89,7 % стандартизованої за клубочковою фільтрацією екскреції іонів натрію і зниження на 79,2 % екскреторної фракції цього електроліту.

Отже, важливими критеріями оцінки ренальної дії КФП слід вважати зниження креатинінемії і підвищення проксимальної реабсорбції іонів натрію. З огляду на отримані результати, зміни функціонування нирок залежали від якості пиття щурів із сулемовою нефропатією і свідчили про зменшення реактивності механізмів пошкодження нефроцитів більшою мірою при вживанні сольового розчину. Відомо, що гіпернатрієвий раціон покращує перебіг експериментальної сулемової нефропатії у тварин, хоч і супроводжується протеїнурією [2]. Виявлений сприятливий вплив КФП на основні показники функціонального стану нирок – клубочкову фільтрацію та канальцеву реабсорбцію при сольовому режимі пиття щурів із сулемовою нефропатією розширює можливості для подальшого вивчення ефективності терапії фетальними клітинами в нефрології.

ВИСНОВКИ. Зіставлення результатів через 7 днів після введення КФП на початковій стадії розвитку гострої сулемової нефропатії в щурів демонструє переважні позитивні зміни функціонального стану нирок при сольовому режимі пиття порівняно з водним. Незалежно від якості питної рідини зменшувалась концентрація креатиніну в плазмі крові та збільшувалась проксимальна реабсорбція іонів натрію. Підвищення рівня натріємії у тварин, які вживали водопровідну воду, виключало регуляторний вплив КФП за цих умов пиття на процеси забезпечення натрієвої рівноваги в організмі. Збільшення швидкості клубочкової фільтрації, покращення канальцевого транспорту іонів натрію з переважним підвищенням реабсорбції в проксимальному відділі нефрону, зменшення втрати іонів натрію із сечею свідчать про суттєве значення сольового режиму пиття для додаткового сприятливого впливу КФП на гомеостатичні процеси нирок.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Визначення стану Т-клітинної ланки імунітету і вмісту стовбурових ракових клітин як критерій оцінки ефективності превентивної терапії раку молочної залози кріоконсервованими клітинами фетальної печінки / А. М. Гольцев, М. О. Бондарович, А. В. Кузняков [та ін.] // Пробл. криобиології і криомедицини. – 2014. – **24**, № 3. – С. 239–248.
2. Гоженко А. И. Влияние водной и гиперосмотической нагрузок на клиренс креатинина при экспериментальной нефропатии, вызванной хлоридом ртути / А. И. Гоженко, В. Ю. Карчаускас, С. И. Долوماتов // Нефрология. – 2002. – **6**, № 3. – С. 72–74.
3. Гоженко А. И. Патогенез токсических нефропатий / А. И. Гоженко // Актуал. пробл. трансп. медицины. – 2006. – № 2. – С. 9–15.
4. Гоженко А. И. Нефротропные эффекты при активации аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов в зависимости от функционального состояния почек крыс / А. И. Гоженко, Н. Д. Филипец // Нефрология. – 2013. – **17**, № 2. – С. 87–90.
5. Исследование апоптотических процессов в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы при развитии адьювантного артрита до и после введения кріоконсервированных клеток фетальной печени / А. Н. Гольцев, Е. Е. Ямпольская, М. В. Останков, Н. А. Бондарович // Пробл. криобиології і криомедицини. – 2014. – **24**, № 3. – С. 249–262.
6. Кріоконсервированные клетки фетальной печени, заключенные в макропористые носители, способствуют восстановлению функций печени после поражения 2-ацетиламинофлуореном / Д. В. Грицай, А. С. Лебединский, О. В. Оченашко, Ю. А. Петренко // Пробл. криобиології. – 2012. – **22**, № 1. – С. 88–96.
7. Особенности влияния кріоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации / А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Л. В. Останкова [и др.] // Пробл. криобиології. – 2009. – **19**, № 2. – С. 186–199.
8. Сирман В. М. Функция почек у крыс с адьювантным артритом Пирсона и ее коррекция эмбриональными прогениторными клетками / В. М. Сирман // Journal of Health Sciences. – 2014. – **4**, № 14. – P. 63–68.
9. Функціональний нирковий резерв: монографія / [А. І. Гоженко, А. В. Кравчук, О. П. Никитенко та ін.] ; за ред. А. І. Гоженко. – Одеса : Фенікс, 2015. – 182 с.
10. Adult stem cells as a tool for kidney regeneration / E. Suzuki, D. Fujita, M. Takahashi [et al.] // World J. Nephrol. – 2016. – **5**, № 1. – P. 43–52.
11. Cell-based therapy for kidney disease / H. C. Chung, I. K. Ko, A. Atala, J. J. Yoo // Korean J. Urol. – 2015. – **56**, № 6. – P. 412–421.
12. Coupling primary and stem cell-derived cardiomyocytes in an in vitro model of cardiac cell therapy / Y. Aratyn-Schaus, F. S. Pasqualini, H. Yuan [et al.] // J. Cell Biol. – 2016. – **212**, № 4. – P. 389–397.
13. Mae S. Kidney regeneration from human induced pluripotent stem cells / S. Mae, K. Osafune // Current Opinion in Organ Transplantation. – 2015. – **20**, № 2. – P. 171–177.
14. Lam A. Q. Regenerating the nephron with human pluripotent stem cells / A. Q. Lam, J. V. Bonventre // Curr. Opin. Organ Transplant. – 2015. – **20**, № 2. – P. 187–192.
15. Panda A. Tissue engineering and stem cell research in Urology: Is the moment yet to come? / A. Panda // Indian J. Urol. – 2015. – **31**, № 2. – P. 87–88.

А. И. Гоженко, В. М. Сирман¹, Н. Д. Филипец², О. О. Филипец²
УКРАИНСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНЫ ТРАНСПОРТА, ОДЕССА
КООРДИНАЦИОННЫЙ ЦЕНТР ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ, ТКАНЕЙ И КЛЕТОК¹, КИЕВ
БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ², ЧЕРНОВЦЫ

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСАМ С ВОДНЫМ И СОЛЕВЫМ РЕЖИМОМ ПИТЬЯ ПРИ РАЗВИТИИ ОСТРОЙ СУЛЕМОВОЙ НЕФРОПАТИИ

Резюме

В экспериментах на нелинейных белых крысах с острой сулемовой нефропатией установлено, что через 7 дней после внутрибрюшного введения клеток фетальной печени (КФП) крысам уменьшалась концентрация креатинина в плазме крови и увеличивалась проксимальная реабсорбция ионов натрия независимо от водного или солевого режима питья. Повышение уровня натриемии у животных, употреблявших водопроводную воду, исключало регуляторное влияние КФП на процессы обеспечения натриевого баланса в этих условиях эксперимента. При употреблении 0,9 % раствора NaCl увеличивалась скорость клубочковой фильтрации, активировался канальцевый транспорт ионов натрия с преимущественным повышением реабсорбции в проксимальном отделе нефрона, уменьшалась потеря ионов натрия с мочой, что указывает на существенную роль солевого режима питья для дополнительного благоприятного воздействия КФП на почечные процессы у крыс с острой сулемовой нефропатией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фетальные клетки печени крыс, сулемовая нефропатия.

A. I. Hozhenko, V. M. Sirman¹, N. D. Filipets², O. O. Filipets²
UKRAINIAN SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF TRANSPORT MEDICINE, ODESA
COORDINATION CENTER OF TRANSPLANTATION OF ORGANS, TISSUES AND CELLS¹, KYIV
BUKOVYNIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY², CHERNIVTSI

FUNCTIONAL STATE OF KIDNEYS AFTER INJECTION OF FETAL LIVER CELLS TO THE RATS WITH WATER AND SALT DRINKING REGIME UNDER THE CONDITIONS OF ACUTE SUBLIMATE NEPHROPATHY

Summary

The experiments on non linear white rats with acute sublimate nephropathy showed that in 7 days after intraperitoneal injection of fetal liver cells (FLC) of rats plasma creatinine concentration decreased and proximal reabsorption of sodium ions increased independently of water or salt drinking regime. The increase of natremia in rats that used tap water excluded regulatory influence of FLC on the processes of maintenance of sodium balance under the conditions of experiment. Usage of 0.9 % NaCl solution leads to increase of glomerular filtration rate, activation of tubular transport of sodium ions with predominant elevation of reabsorption in the proximal part of nephron, reduction of sodium ions loss with urination. That points to substantial role of salt drinking regimen in additional beneficial effects of FLC on renal processes in rats with acute sublimate nephropathy.

KEY WORDS: fetal liver cells of rats, sublimate nephropathy.

Отримано 28.02.16

Адреса для листування: Н. Д. Філіпец, Буковинський державний медичний університет, Театральна площа, 2, Чернівці, 58002, Україна, e-mail: filipets.natalja@bsmu.edu.ua.