

© Топчій І.І., Кондаков І.І., Кірієнко О.М.? 2014

УДК 616.61-008.64-08:611-013.85:577.128

І.І. ТОПЧІЙ¹, І.І. КОНДАКОВ², О.М. КІРІЄНКО¹

**ВПЛИВ КРІОЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ
СТАН НИРОК ЩУРІВ З ГОСТРОЮ АБО ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ**

I.I. TOPCHII¹, I.K. KONDAKOV², O.M. KIRIENKO¹

***EFFECT OF CRYO PLACENTA EXTRACT ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF KIDNEYS RATS
WITH ACUTE OR CHRONIC RENAL FAILURE***

ДУ «Національний інститут терапії ім. Л.Т.Малої НАМН України»¹

ДУ «Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України»²

*SI "National Institute of Therapy named after L. Malaya of NAMS of Ukraine"*¹

*SI "Institute for Problems of Criobiology and Criomedicine NAS of Ukraine"*²

Топчій Іван Іванович
itopchii@yandex.ua

Ключові слова: експериментальний нефрит, кріоекстракт плаценти, морфологія і функція нирок

Keywords: an experimental nephritis, a cryoextract of placenta, morphology and function of kidneys

Резюме. Матеріал и методы. На экспериментальном материале при моделировании острой

и хронической почечной недостаточности у 75 белых беспородных крыс проведено исследование действия криоэкстракта аллогенной плацентарной ткани на морфологию и функциональные показатели почек.

Результаты и обсуждение. Введение КЭП в ранние сроки повреждения почек приводит к быстрому устранению изменений эпителия канальцевого аппарата и предотвращает развитие ХПН. Эффект от введения КЭП сохраняется около 16 недель

Выводы. Под влиянием КЭП в начале развития острой почечной недостаточности функция почек сохраняется. При сформировавшейся хронической почечной недостаточности функция почек улучшается на краткий срок и введение криоэкстракта не влияет на развитие ХНН.

Summary. *Material and methods. On an experimental material at modelling of acute and chronic nephritic insufficiency at 75 white not purebred rats action research a cryoextract of placenta (CEP) on morphology and functional indicators of kidneys is carried out.*

Results and discussion. Introduction CEP in early terms of damage of kidneys leads to fast elimination of changes of an epithelium of the tubular device and prevents development a CKI. The effect from introduction CEP remains about 16 weeks.

Conclusions. Under the influence of CEP in the beginning of development of acute kidney insufficiency function of kidneys remains. At the generated chronic insufficiency function of kidneys improves for short term and introduction of CEP does not influence on development CKI.

ВСТУП. Гостре пошкодження нирок часто приводить до високої летальності або розвитку хронічної хвороби нирок (ХНН). [6, 9]. Серед засобів, які використовують в комплексній терапії захворювань нирок, основну масу складають хіміотерапевтичні препарати, які самі можуть мати негативний вплив на функцію нирок. У зв'язку з цим ведуться пошуки альтернативних методів допоміжної або замісної ниркової терапії. Принципово новим і перспективним сучасним напрямом досліджень по відновленню функцій пошкоджених органів і тканин є клітинна терапія, зокрема використання різних типів стволових клітин [8, 10]. Відомий спосіб терапевтичної трансплантації фетальної тканини нирок під її капсулу, в її тканину, в черевну порожнину [3]. Проте ці методи не позбавлені серйозних недоліків, що пов'язано з необхідністю досить тривалого культивування клітин, а також високою вартістю отриманого препарату. Сучасні погляди на механізм дії стволових клітин ґрунтуються на вірогідності непрямої дії введених клітин та їх вмісту після руйнування клітинної мембрани [8]. В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України розроблено метод кріоконсервування фрагментів плаценти людини і лабораторні дослідження показали, що після кріоконсервування в тканині плаценти не відбувається зниження кількості біологічно активних речовин. [2]. У літературі є повідомлення про ефективність використання препаратів плаценти при деяких видах патології, основним патогенетичним механізмом розвитку яких є порушення мікроциркуляції, а також гормонального і імунологічного гомеостазу [7]. Разом з тим, ефективність препаратів плаценти при хворобах нирок не вивчалась, у зв'язку з чим метою дослідження було вивчення впливу кріоекстракту плаценти людини на структурно-функціональний стан нирок щурів з гострим пошкодженням та хронічною нирковою недостатністю.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ. Матеріалом дослідження служили 75 білих безпородних щурів – самців вагою 200–300 г, віком 4 місяця. Для моделювання гострої ниркової недостатності (ГНН) щурів витримували 24 години без їжі, після чого підшкірно вводили 50% водний розчин гліцеролу в дозі 10 мл на кг маси тіла [4]. Тварин всіх груп переміщували на добу в обмінні камери і збирали сечу в умовах спонтанного діурезу протягом доби до забою. В пробах сечі і крові визначали рівень креатиніну, розраховували швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) [1]. Під час забою тварин проводився забір крові для встановлення рівня креатиніну у сироватці та для приготування цитологічних препаратів, які забарвлювали по Паппенгейму для підрахування формули крові і розрахунку індексу зрушення ядра. Алогенний кріоекстракт плаценти (КЕП) був отриманий згідно методичним рекомендаціям [2] та попереднім експериментам. КЕП вводився підшкірно в дозі 0,5 мл 3 рази на тиждень. Початок експерименту для всіх груп відраховувався з моменту введення гліцеролу.

Тварини були розподілені на 3 групи:

I – група контролю – інтактні тварини (n=5)

II – група тварин – з моделлю гострої ниркової недостатності – ГНН.

Експериментальні тварини були розділені на 2 підгрупи: 1) без введення КЕП (n = 15) та 2) з введенням КЕП (n=15). Через 3, 8 і 16 тижнів тварин виводили з експерименту.

III – група тварин з моделлю хронічної ниркової недостатності 8 тижнів після введення гліцеролу, у яких розвився інтерстиціальний нефрит (n=20) Експериментальні тварини були розділені на 2 підгрупи: 1) без введення КЕП (n=10), та 2) з введенням КЕП (n=10). Через 10 і 16 тижнів тварин виводили з експерименту.

Тварин всіх груп піддавали евтаназії відповідно до Директиви 86/609 ЄС і угодою Ради

Європи ETz 123, всі експерименти проводилися відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів над тваринами» схваленими Першим національним конгресом з біоетики (20 вересня 2001 р. Київ, Україна) і згідно з «Правилами використання лабораторних експериментальних тварин» (1984, додаток 4).

Статистична обробка отриманих результатів проводилася за допомогою стандартної програми Statgraph 2.1. Рівень достовірності склав 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Показники функції нирок у інтактних тварин контрольної групи були такі: добовий діурез – $30,12 \pm 0,3$ мл; ШКФ – $0,63 \pm 0,05$ мл/хв; креатинін крові – $38,75 \pm 4,3$ мкмоль/л та креатинін сечі – $1,27 \pm 0,01$ ммоль/л.

Дослідження функцій нирок, виконані через 3 тижні після моделювання гліцеролової ГНН показали, що у щурів сформувалося гостре порушення видільної функції нирок – зменшення добового діурезу майже в 4 рази до $5,2 \pm 1,1$ мл ($p < 0,01$) та ШКФ до $0,27 \pm 0,01$ мл/хв ($p < 0,05$), що майже в 2,5 рази нижче показників у інтактних тварин. Порушення функції нирок також характеризувалося збільшенням креатиніну крові і сечі $286,0 \pm 29$ проти $38,75 \pm 4,3$ мкмоль/л ($p < 0,05$) та $5,22 \pm 0,5$ проти $1,27 \pm 0,01$ ммоль/л ($p < 0,05$) у порівнянні з групою контролю.

Введення КЕП сприяло деякому покращенню показників, особливо зниження рівнів креатиніну крові до $86,0 \pm 7,0$ мкмоль/л. Показники рівню креатиніну сечі значно виросли до $8,42 \pm 0,7$ ммоль/л, хоча добовий діурез знизився до $4,82 \pm 0,1$ мл, що свідчить про зростання концентраційної можливості нирок.

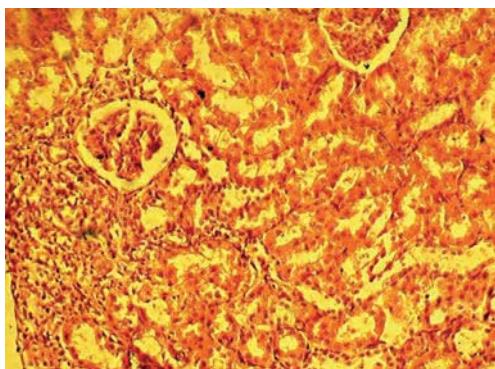
При подальшому спостереженні за розвитком ниркової недостатності через 8 тижнів було зафіксовано збільшення добового діурезу до $11,04 \pm 0,1$ мл, а на тлі введення КЕП – до $21,4 \pm 0,2$ мл – практично у 2 рази ($p < 0,05$). Збільшилась також ШКФ від $0,33 \pm 0,03$ мл/хв (без введення КЕП) до $0,44 \pm 0,03$ мл/хв у групі з введенням КЕП, але показники рівнів креатиніну крові та сечі знизились незначно. В подальшому через 16 тижнів виникав стан стійкої олігоурії $5,7 \pm 1,1$ мл, що майже в 6 разів нижче від показників інтактних тварин і введення КЕП не впливало на добовий діурез $7,5 \pm 0,5$ мл. ШКФ при цьому практично не змінювалось у як у групі без лікування так і після введення КЕП. Рівні креатиніну крові і сечі залишалися високими в обох варіантах експерименту – $62,5 \pm 0,5$ проти $54,5 \pm 0,5$ мкмоль/л ($p < 0,05$) та $9,8 \pm 0,9$ проти $19,8 \pm 0,9$ ммоль/л ($p < 0,01$), що в значній мірі перевищувало показники контрольної групи.

При дослідженні функціональних показників нирок тварин групи III через 10 і 16 тижнів добовий діурез на обох термінах спостереження був низьким – $5,2 \pm 0,6$ проти $6,33 \pm 0,6$ мл та $7,2 \pm 0,6$ проти $5,7 \pm 1,1$ мл відповідно. ШКФ

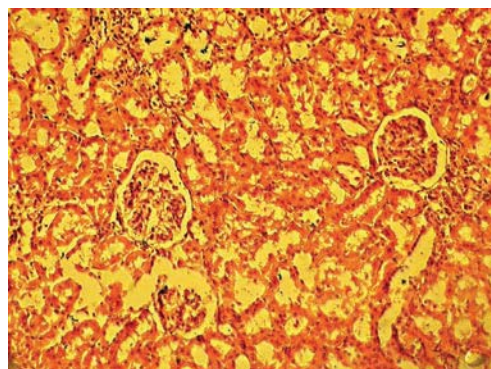
також була незначною – $0,42 \pm 0,04$ мл/хв проти $0,32 \pm 0,04$ мл/хв через 10 тижнів та $0,46 \pm 0,04$ мл/хв проти $0,38 \pm 0,02$ мл/хв – через 10 тижнів. Показники рівню креатиніну крові і сечі також були високими. Таким чином, введення КЕП на ранніх термінах ГНН (1 тиждень) викликає відчутні поліпшення через 3 тижні (різке і вірогідне зниження рівня креатиніну крові з $286,0 \pm 20,0$ мкмоль/л до $86,0 \pm 7,0$ мкмоль/л ($p < 0,01$)). Через 8 тижнів всі показники функцій нирок практично досягають норми. Ефект від введення КЕП до 16 тижня починає зникати і функціональні показники нирок вірогідно не відрізняються від показників у тварин, які не отримували КЕП. Вивчення гістологічних препаратів через 3 тижні після початку моделювання патології нирок за допомогою введення гліцеролу показало розвиток гідропічної дистрофії і некрозу епітелію звитих каналців як проксимальних, так і дистальних. Просвіт каналців був збільшений (до 16–20 мкм) і заповнений відторгнутим епітелієм, аналогічна ситуація спостерігалася і в мозковій речовині нирки. Збиральні трубочки різко розширені і закупорені колоїдом. Розміри ниркових клубочків склали 8883 ± 93 мкм², що вірогідно по відношенню до показників в групі з інтактними тваринами. Площа судинних петель і площа капсули Шумлянського склали $5418,7 \pm 61,2$ і $4095,7 \pm 66,1$ мкм², що вірогідно нижче, ніж в нормі. Виявляється лімфостаз, і наявність лімфогістіоцитарних інфільтратів докола окремих клубочків.

В групі тварин, яким через тиждень після введення гліцеролу вводили КЕП, виявляється помірне інтерстиціальне гостре запалення, порушення кровообігу, що супроводжується венозним повнокров'ям, а так само лімфостазом. Все це поєднується з дистрофічними явищами, які характерні для течії ГНН без введення КЕП. Проте метричні параметри, отримані при вивченні мікропрепаратів, показують, що при невірогідних відмінностях площі поперечного перетину клубочків і судинних петель, розміри капсули Шумлянського були достовірно нижче, ніж в контролі і у інтактних тварин (рис. 1).

Морфологічна картина на 8 тиждень з моменту введення гліцеролу характеризувалася наявністю гідропічної дистрофії, некрозами епітелію звитих каналців і венозною гіперемією. Просвіт каналців збільшений, в інтерстиції вогнища лейкоцитарної інфільтрації. Виявлено вірогідне збільшення розмірів клубочків, зменшення площі судинних петель і розтягання капсули Шумлянського до нормальних значень. Вірогідно знижувалася кількість ядер в клубочку від 85 (норма) до 74. При вивченні гістологічних препаратів в групі тварин, яким вводили КЕП, виявлено зменшення просвіту звитих проксимальних і дистальних каналців (рис. 2).

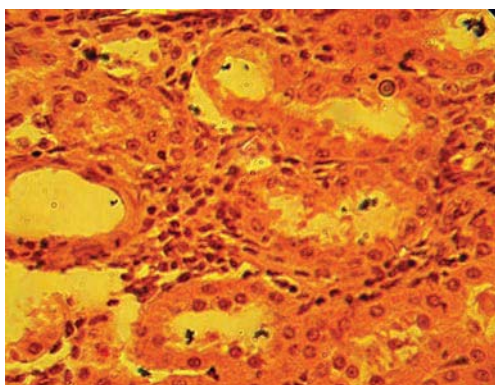


а

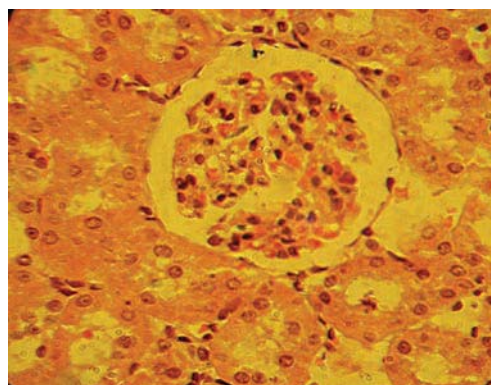


б

Рис. 1. Лімфогістіоцитарна інфільтрація коркової речовини нирки в контролі (а). В групі з введенням КЕП (б) запалення виражене менше. Забарвлення гематоксилином-еозином. X 140



а

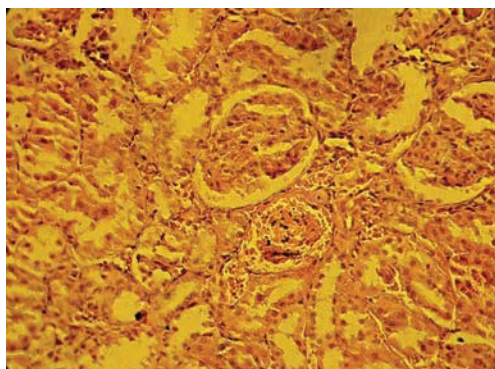


б

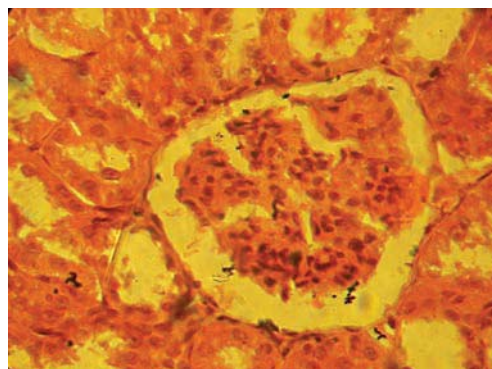
Рис. 2. Гістологічна картина нирок на 8-му тижні після введення гліцеролу. Дистрофія епітелію звитих каналців і інтерстиціальне запалення (а); відсутність запального інфільтрату і некрозів епітелію каналців (б) після введення КЕП. Забарвлення гематоксилином-еозином. X 400

Гіалінокапельна дистрофія виявлялася в одиничних епітеліоцитах, в інтерстиції відсутнє запалення. Розміри клубочків не відрізняються від групи контролю, проте не досягають нормальних розмірів. На 16 тижень експерименту, що відповідає віддаленим термінам перебігу ХНН, метричні параметри клубочків були достовірно нижче, ніж в групі через 8 тижнів. Клітини епітелію проксимальних і дистальних каналців знаходились в стані гіаліново-крапельної і гідропічної дистрофії (рис.3а). Місцями каналці заповнені

відторгнутим епітелієм. Ядра епітелію каналців гіперхромні, мають по 2-3 ядерця. Площа капілярів клубочку була вища, ніж в групі контролю – $9376,3 \pm 120,2$ мкм² і вірогідно не відрізнялась від норми. Площа капсули Шумлянського зменшувалася в порівнянні з групою через 8 тижнів і нормою. Клубочки зменшені у тварин обох груп, в основному неправильної, полігональної форми, що, очевидно, пов'язане з їх деформацією із-за здавлення розширеними лімфатичними потоками і розширеними венами (рис. 3б).



а



б

Рис. 3. Гістологічна картина нирок на 16-му тижні після введення гліцеролу. Дистрофія епітелію звитих каналців, інтерстиціальне запалення і венозна гіперемія і лімфостаз (а); через 16 тижнів після введення КЕП - некроз епітелію каналців (б). Забарвлення гематоксилином-еозином. X 400

Порівнюючи показники площі клубочка, капілярів і капсули Шумлянського в групах тварин через 16 тижнів з введенням і без введення КЕП можна відзначити не лише погіршення з попередніми термінами цих параметрів, але і недостовірну відмінність їх. Клітини епітелію проксимальних і дистальних каналців знаходились в стані гіаліново-крапельної і гідропічної дистрофії (рис. 3а). Місцями каналці заповнені відторгнутим епітелієм. Ядра епітелію каналців гіперхромні, мають по 2-3 ядерця.

При вивченні гістологічних препаратів тварин, яким КЕП вводили при ХНН (8 тижнів перебіг без лікування) виявлено відсутність поліпшення метричних показників гломерулярного апарату. На віддаленому терміні після введення КЕП метричні показники клубочка знижені в 2 рази в порівнянні з нормою, знайдена венозна гіперемія, просвіт судин розтягнутий. В інтерстиції спостерігаються крововиливи, лейкоцитарна інфільтрація і розростання сполучної тканини. Клітини епітелію знаходяться в стані дистрофії, місцями ядра гіперхромні і мають 2-3 ядерця. Разом з тим, аналізуючи показники розмірів клубочка і площі капілярів клубочка необхідно відзначити вірогідне поліпшення цих показників відносно групи через 16 тижнів. Введення КЕП в групі через 16 тижнів не призводило до поліпшення морфологічної картини в нирках. Порушення кровообігу, ліфостаз на тлі інтерстиціального нефриту, а також нефросклероз, негативно впливали на метричні показники гломерулярного апарату, які були в 2,5 разів нижче за норму ($p < 0,05$).

Наші данні свідчать про те, що незважаючи на наявність регенеративних процесів в епітелії дистальних і проксимальних каналців, у тварин без впливу КЕП переважали дистрофічні і некротичні процеси, що спостерігалось на протязі 6 тижнів після початку експерименту. На віддалених термінах до дистрофічних і некротичних процесів приєднувалось запалення, спостерігалась лейкоцитарна інфільтрація інтерстиція і інтерстиціальний набряк. Подальше збільшення інтерстиціального тиску приводило до ще більшого здавлення каналців і порушення кровообігу в нирці, розростання сполучної тканини, що приєдналось в місцях запалення і лише посилювало здавлення судин інтерстиція, що підтверджується крововиливами і венозним повнокров'ям. Застосування КЕП може впливати на поліпшення стану тварин в залежності від термінів його введення. Відомо, що екстракт плаценти сприяє швидкому загоєнню ран і виразок, стимулює регенерацію гепатоцитів, відновлення пошкоджених нервів [3]. Здатність екстракту плаценти прискорювати загоєння ран деякі дослідники пояснюють високим вмістом в ній вільного і зв'язаного нікотінамід-аденіндинуклеотидфосфата відновленого

(NADPH) і полідезоксирібонуклеотіда. Фактори росту і низькомолекулярні пептиди беруть участь у формуванні міжклітинного матриксу і в процесах клітинної адгезії, а протизапальна дія препаратів плацентарних приводить до зменшення агрегації тромбоцитів. Встановлено, що водний екстракт плаценти може стимулювати синтез колагену, необхідного для загоєння дефекту, а також впливати на структуру ниркової тканини у зв'язку з наявністю таких ростових чинників як фактор росту фібробластів, ендотеліального та епітеліального фактору росту [3, 7]

Таким чином, покращення морфологічних показників нирок при призначенні КЕП на ранніх етапах їх пошкодження може бути пов'язане з регенеративними властивостями екстракту плаценти завдяки збалансованому вмісту великої кількості факторів росту і інших цитокінів.

ВИСНОВКИ:

1. Введення КЕП в ранні терміни приводить до зменшення пошкоджень епітелію каналцевого апарату і розвитку ХНН. Ефект від введення КЕП зберігається 16 тижнів, надалі розвивається ХНН.
2. Введення КЕП на тлі сформованої ХНН приводить до деякого поліпшення стану тварин, проте ефект цей не стійкий і морфологічна картина погіршується через 6 тижнів.
3. Введення КЕП на пізніх термінах розвитку ХНН є неефективним.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Берхин Е. Б. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Берхин Е. Б., Иванов Ю. И. // Барнаул: Алтайское книжн. из-во. – 1972. – 199 с.
2. Грищенко В. І. Заготівля, криоконсервування плацентарної тканини і її клінічне застосування / Грищенко В. І., Прокопюк О. С., Кузьміна І. Ю. // Метод. реком. – Харків. – 1996. – 15 с.
3. Грищенко В. І. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения / Грищенко В. И., Гольцев А. Н. // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 54–58.
4. Кондаков І. І. Вплив гліцеролу на функціонально-морфологічні показники нирок при моделюванні гострої та хронічної ниркової недостатності у щурів / Кондаков І. І., Топчій І. І., Кірієнко О. М. // Український журнал нефрології та діалізу. – 2013. – N 3(39). – С.14-21.
5. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники / Меркулов Г. А. // М.: Медгиз – 1961. – 341 с.
6. Bellomo R. Acute kidney injury / Bellomo R., Kellum J. A., Ronco C. // Lancet. – 2012. – N. 380. – P. 756-766.
7. Dane M.J. Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration / Dane M.J., van den Berg B.M., Avramut M.C. [et al.] // Am J Pathol. – 2013. – V. 182. – P.1532-1540.

8. *Hu Jie*. Mesenchymal stem cells attenuate ischemic acute kidney injury by inducing regulatory T cells through splenocyte interactions / Hu Jie, Zhang Li, Wang Nan // *Kidney Int* . – 2013. – N. 84. – P. 521-531.
9. *Leung K.C.* Chronic kidney disease following acute kidney injury - risk and outcomes / Leung K. C., Tonelli M., James M. T. // *Nat Rev Nephrol*. – 2013. – N9. – P.77-85
10. *Luz-Crawford P.* Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway / Luz-Crawford P., Noel D., Fernandez X. // *PLoS ONE*. – 2012. –N 7. – P. 45272

Надійшла до редакції 05.06.2014

Прийнята до друку 27.07.2014