

УДК 57.085.1

## ВПЛИВ СТОВБУРНИХ КЛІТИН НА НИРКОВІ ФУНКЦІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ НЕФРОПАТІЇ

**Сірман В.М.**

*Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України,  
Український НДІ медицини транспорту*

В досліджах на щурах з експериментальним з ад'ювантним артритом Пірсона встановлено, що на протязі 12 місяців дослідження у тварин спостерігаються зміни показників функції нирок, що свідчать про розвиток у них вторинної нефропатії. Перебіг нефропатії супроводжується порушенням основних функцій нирок: осморегулюючої, іонорегулюючої, волюморегулюючої та екскреторної.

Введення ембріональних прогеніторних клітин щурам з артритом значно зменшувало порушення всіх функцій нирок, що було обумовлено як підвищенням клубочкової фільтрації, так і інтенсивності реабсорбції натрію.

*Ключові слова: стовбурові клітини, нефропатія, клубочкова фільтрація, реабсорбція натрію*

Відомо, що при запаленні одним з системних порушень є вторинні нефропатії. Раніше нами показано, що при експериментальному артриті Пірсона у щурів виникають порушення нирок, що свідчать про розвиток нефропатії [9].

Встановлено, що введення стовбурних клітин позитивно впливає на перебіг нефропатії і може розглядатися як перспективний терапевтичний засіб [7, 8].

Разом з тим не встановлено характер та механізм порушень основних ниркових функцій та процесів. Між тим системні наслідки пошкодження нирок повністю залежать від функціонального стану нирок.

У зв'язку з вищенаведеним у роботі вивчались стан та механізми порушень основних функцій нирок: осморегулюючої, іонорегулюючої, волюморегулюючої та екскреторної.

### **Матеріали та методи**

Дослідження виконані в Координаційному центрі трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України на лабораторній базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Для вирішення поставлених задач проведені серії експериментів *in vivo*. Дослідження проводили на самцях білих щурів.

Для виділення ембріональних прогеніторних клітин використано 18 вагітних самоць. Дослідження проводили через 2, 4, 6 і 12 міс. після індукції ад'ювантного артриту Пірсона. Для моделювання артриту Пірсона використовували введення повного ад'юванта Фрейнда в апоневроз правої задньої кінцівки щурів під ефірним наркозом. Через 3 тижні, тобто в період проліферативної фази запального процесу в суглобах, коли сформований панус охоплює суглобову поверхню, інвазує і руйнує хрящ, субхондральну кістку і кістковий, щурам дослідної групи під нембуталовим наркозом (40 мг на кг маси тіла) в яремну вену вводили суспензію ембріональних прогеніторних клітин у середовищі RPMI або розчині Хенкса. Тваринам групи порівняння вводили відповідний об'єм середовища RPMI або розчину Хенкса. Контрольну групу склали 11 щурів, яким замість повного ад'юванта Фрейнда в апоневроз правої задньої кінцівки вводили 0,1 мл вазелінового масла. Усі тварини сертифіковані та отримані з розплідника Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України.

Для виділення ембріональних прогеніторних клітин вагітних самок вводили в наркоз (натрію етамінал – 40 мг на кг маси тіла) на 11-13 стадіях розвитку ембріонів за Астауровим. Після асептичної обробки

операційного поля (96 ° етиловий спирт, йод) виконували середню лапаротомію по *linea alba*. Обидва роги матки виводили в операційну рану і розрізали стерильними ножицями поперек (біля ембріонів). Останні вилущували в стерильну чашку Петрі з охолодженням до 4 °С середовищем Хенкса з гентаміцином (кінцева концентрація – 0,001 %). Після потрійної промивки з ембріонів виділяли ембріональні прогеніторні клітини за розробленою нами методикою [7, 8, 9]. Суспензію ембріональних прогеніторних клітин профільтрували через капроновий фільтр (200 мкм). Контроль життєздатності клітин здійснювали шляхом світлової мікроскопії при забарвленні клітин трипановим синім. Щурам з артритом дослідної групи ембріональні прогеніторні клітини вводили у яремну вену (венесекція під нембуталовим наркозом: натрію етамінал, 40 мг на 1 кг маси тіла) у дозі  $3,5 \cdot 10^7$ /мл на 0,1 кг маси тіла. Декапітацію щурів здійснювали під нембуталовим наркозом (натрію етамінал, 40 мг на 1 кг маси тіла).

Функцію нирок вивчали в умовах індукованого водного діурезу. Швидкість клубочкової фільтрації (GFR) розраховували за кліренсом ендogenous креатиніну:  $GFR = (V \cdot U_{Cr}) : P_{Cr}$ , де  $V$  – об'єм сечі,  $U_{Cr}$  – концентрація креатиніну в сечі,  $P_{Cr}$  – в плазмі крові. Здатність нирок концентрувати та розводити сечу оцінювали за концентраційним індексом ендogenous креатиніну ( $U_{Cr}/P_{Cr}$ ) і концентраційним індексом іонів натрію ( $UNa^+/PNa^+$ ), де  $UNa^+$  – концентрація іонів натрію в сечі,  $PNa^+$  – концентрація іонів натрію в плазмі крові. Для інтегральної оцінки транспорту іонів натрію в нирках використовували показники екскреції ( $ENa^+ = UNa^+ \cdot V$ ) і кліренсу іонів натрію ( $CNa^+ = ENa^+ / PNa^+$ ). Реабсорбцію води

визначали за формулою:  $RH_2O = [(GFR - V) : GFR] \cdot 100$  %. Показники функції нирок стандартизували шляхом перерахунку їх абсолютних величин на одиницю маси тіла тварини або об'єму клубочкового фільтрату. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за програмою "БіоСтат" з визначенням  $t$ -критерію Ст'юдента.

### Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень функціонального стану нирок у щурів на протязі 12 місяців після моделювання артриту Пірсона підтвердили розвиток нефропатії, ознаки якої з'являлись вже через 2 місяці та зростали упродовж усіх 12 місяців (табл. 1).

Такий висновок зроблено на основі зростаючої протеїнурії та одночасно з зменшенням клубочкової фільтрації.

Таким чином показано, що при експериментальному артриті у щурів порушується клубочкова фільтрація та каналцевої реабсорбція. Про останнє свідчили данні щодо збільшення кліренсу Na (табл. 2), що було обумовлено зменшенням каналцевої реабсорбції цього іона. Одночасно зменшувалась екскреція K, особливо

Таблиця 1

Динаміка змін функції нирок у досліджуваних групах щурів з ад'ювантним артритом Пірсона ( $\bar{x} \pm Sx$ )

Показник	Досліджувані групи	Термін від початку моделювання артриту Пірсона			
		2 місяці	4 місяці	6 місяців	12 місяців
Діурез, мл/100 г маси тіла за 2 год.	Артрит	1,62 ± 0,11 <i>n</i> = 11	2,59 ± 0,12 <i>n</i> = 11	1,73 ± 0,13 <i>n</i> = 25	1,36 ± 0,10 <i>n</i> = 25
	Артрит + ЕПК	2,61 ± 0,11 <i>n</i> = 15 <i>p</i> < 0,001	3,15 ± 0,19 <i>n</i> = 11 <i>p</i> < 0,05	2,98 ± 0,13 <i>n</i> = 30 <i>p</i> < 0,001	3,39 ± 0,10 <i>n</i> = 30 <i>p</i> < 0,001
Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв.	Артрит	304,80 ± 18,06 <i>n</i> = 11	355,40 ± 16,88 <i>n</i> = 11	310,00 ± 14,38 <i>n</i> = 25	246,08 ± 13,95 <i>n</i> = 25
	Артрит + ЕПК	459,10 ± 21,67 <i>n</i> = 15 <i>p</i> < 0,001	738,10 ± 54,42 <i>n</i> = 11 <i>p</i> < 0,001	685,40 ± 20,93 <i>n</i> = 30 <i>p</i> < 0,001	792,66 ± 28,11 <i>n</i> = 30 <i>p</i> < 0,001
Екскреція білка, мг/2 год.	Артрит	0,0626 ± 0,0033 <i>n</i> = 11	0,1000 ± 0,0070 <i>n</i> = 11	0,0732 ± 0,0036 <i>n</i> = 25	0,0780 ± 0,0041 <i>n</i> = 25
	Артрит + ЕПК	0,0642 ± 0,0025 <i>n</i> = 15 <i>p</i> > 0,6	0,0573 ± 0,0057 <i>n</i> = 11 <i>p</i> < 0,001	0,0647 ± 0,0027 <i>n</i> = 30 <i>p</i> > 0,05	0,0325 ± 0,0019 <i>n</i> = 30 <i>p</i> < 0,001

Примітки: ЕПК – ембріональні прогеніторні клітини;  $p$  – ступінь достовірності різниць показників у досліджуваних групах тварин;  $n$  – кількість тварин у групі.

через 2 та 4 місяці. Поряд з цим зменшувався діурез та кліренс безнатрієвої води (табл. 1, 2).

Вищенаведені данні дозволили прийти до висновку, що у щурів порушується екскреторна, осморегулююча, іонорегулююча, та волюморегулююча функція нирок.

Введення ембріональних прогеніторних клітин сприяло зменшенню ознак запалення суглобу та одночасно ознак нефропатії, так зростала швидкість клубочкової фільтрації, діурез та зменшилась протеїнурія (табл. 1).

Позитивний ефект був пов'язаний з нормалізацією основних ниркових процесів (фільтрації та реабсорбції), що обумовили нормалізацію екскреторної функції (табл. 1) та осмо-, іоно-, волюморегулюючої функції нирок, про що свідчать показники, наведенні у табл. 2.

Таким чином ембріональні стовбурні клітини мають позитивний терапевтичний ефект, як по відношенню до запального процесу у суглобах, так і вторинної нефропатії [3]. Як наслідок нормалізуються основні гомеостатичні функції нирок і у цілому зменшується ризик розвитку хронічної хвороби нирок [1, 2, 4, 5].

### Висновки

Введення щурам повного ад'юванта Фрейнда в апоневроз правої задньої кінцівки викликає розвиток функціонально-біохімічних ознак ушкодження нирок, що виявляються через 2 місяці, дещо зменшуються через 4 та досягають максимального розвитку на 12 місяць розвитку експериментального артриту Пірсона.

Пошкодження нирок призводить до порушення екскреторної функції з розвитком ретенційної азотемії та здатності ре-

Таблиця 2

Динаміка змін натрій регулюючої функції нирок у досліджуваних групах щурів з ад'ювантним артритом Пірсона ( $x \pm Sx$ )

Показник	Досліджувані групи	Термін від початку моделювання артриту Пірсона			
		2 місяці	4 місяці	6 місяців	12 місяців
Концентраційний індекс іонів натрію, од.	Артрит	0,178 ± 0,028 n = 11	0,063 ± 0,007 n = 11	0,153 ± 0,009 n = 25	0,243 ± 0,015 n = 25
	Артрит + ЕПК	0,087 ± 0,005 n = 15 p < 0,01	0,045 ± 0,006 n = 11 p > 0,06	0,066 ± 0,004 n = 30 p < 0,001	0,054 ± 0,003 n = 30 p < 0,001
Кліренс іонів натрію, мл за 2 год.	Артрит	0,277 ± 0,041 n = 11	0,158 ± 0,013 n = 11	0,265 ± 0,036 n = 25	0,330 ± 0,018 n = 25
	Артрит + ЕПК	0,228 ± 0,010 n = 15 p > 0,1	0,139 ± 0,017 n = 11 p > 0,3	0,197 ± 0,011 n = 30 p > 0,05	0,182 ± 0,008 n = 30 p < 0,001
Кліренс безнатрієвої води, мл за 2 год.	Артрит	1,35 ± 0,11 n = 11	2,44 ± 0,12 n = 11	1,48 ± 0,07 n = 25	1,03 ± 0,08 n = 25
	Артрит + ЕПК	2,38 ± 0,10 n = 15 p < 0,001	3,01 ± 0,19 n = 11 p < 0,05	2,78 ± 0,13 n = 30 p < 0,001	3,21 ± 0,09 n = 30 p < 0,001

Примітки: ЕПК – ембріональні прогеніторні клітини; p – ступінь достовірності різниць показників у досліджуваних групах тварин; n – кількість тварин у групі

гулювати іонний гомеостаз, осморегуляцію та волюморегуляцію [6].

Введення щурам з експериментальним артритом Пірсона ембріональних прогеніторних клітин нормалізує функціональний стан нирок із відновленням швидкості клубочкової фільтрації та каналцевого транспорту води і натрію, нормалізацією екскреторної та іонорегулюючої функції, осморегулюючої і волюморегулюючої функції нирок.

### Література

1. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan / C. P. Wen, T. V. Cheng, M. K. Tsai [et al.] // Lancet. – 2008. – Vol.371, № 9631. – P. 2173–2182.
2. Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease / R. S. Dwivedi, J. G. Herman, T. A. Caffrey, D. S. Raj // Kidney Int. – January 1, 2011. – Vol.79, №1. – P. 23–32.
3. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of

- Chronic Kidney Disease. *Kidney international*, Suppl.2013; 3: 1–150
4. Rodger R. C. Consensus conference on early chronic kidney disease. Foreword / R. C. Rodger, B. Williams // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2007. – №22. – P. 11–29.
  5. Stevens L. A. Evaluation of the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation for estimating the glomerular filtration rate in multiple ethnicities / L. A. Stevens, M. A. Claybon, C. H. Schmid // *Kidney Int.* – March 1, 2011. – Vol.79, №5. – P. 555–562.
  6. Наточин Ю. В. Клиническая и молекулярная физиология осморегулирующей функции почки (к 200-летию со дня рождения Ф.Г.Я. Генле) / Ю. В. Наточин // *Клиническая нефрология.* – 2009. – №4. – С. 25–31.
  7. Оптимизация методики получения суспензии плюрипотентных прогениторных эмбриональных клеток / Н. В. Винарская, А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // *Динаміка наукових досліджень '2004 : III Міжнар. наук-практ. конф., 21-30 червня 2004 р. : матеріали конф. – Дніпропетровськ : Наука і освіта, 2004. – Т. 58 (Клінічна медицина). – С. 5–7.*
  8. Пат. 72796 Україна, МПК<sup>7</sup> С 12 N 5/06. Спосіб отримання життєздатних ембріональних плюрипотентних клітин за допомогою колагенази / Сирман В. М., Кухарчук О. Л., Радченко В. В. ; заявник і патентовласник ТОВ "КРС-медичні технології". – № 20022097445 ; заявл. 13.09.02 ; опубл. 15.04.05, Бюл. № 4.
  9. Сирман В. М. Характеристика змін функціонального стану нирок у динаміці експериментального ад'ювантного артриту Пірсона / В. М. Сирман, О. Л. Кухарчук // *Бук. мед. вісник.* – 2004. – Т. 8, № 4. – С. 109–115.

## Резюме

### ВЛИЯНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПОЧЕЧНЫЕ ФУНКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕФРОПАТИИ

*Сирман В.М.*

В опытах на крысах с экспериментальным с адьювантным артритом Пирсона установлено, что в течение 12 месяцев исследования у животных наблюдаются изменения функции почек, свидетельствующие о развитии у них вторичной нефропатии. Течение нефропатии сопровождается нарушением основных функций почек: осморегулирующей, ионорегулирующей, волюморегулирующей и экскреторной.

Введение эмбриональных прогениторных клеток крысам с артритом значительно уменьшало нарушение всех функций почек, что было обусловлено как повышением клубочковой фильтрации, так и интенсивности реабсорбции натрия.

*Ключевые слова: стволовые клетки, нефропатия, клубочковая фильтрация, реабсорбция натрия*

## Summary

### INFLUENCE OF TRUNK CELLS ON KIDNEYS' FUNCTION AT EXPERIMENTAL NEPHROPATHY

*Sirman V.M.*

At the experiments with rats with adjuvant arthritis of Pirson it has been established that during 12 months of the research the changes of renal functions took place. It proves about the development of the secondary nephropathy. Its course is followed by the disturbance of the main renal functions: osmoregulating, ionregulating, volumeregulating and excretionregulating.

Administration of embryonic progenitonic cells to the animals with arthritis significantly decreased renal functions due to increase of renal filtration and intensity of sodium reabsorbtion increase.

*Keywords: stem cells, nephropathy, glomerular filtration, reabsorption of sodium*

*Впервые поступила в редакцию 23.09.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*