

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТА СЕЧІ ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГОСТРІЙ НИРКОВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ У ЩУРІВ

А. Й. Мазуркевич, О. Л. Бобось, М. О. Малюк, В. В. Ковпак, Ю. О. Харкевич

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Проведені дослідження з вивчення змін біохімічних показників крові та сечі після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин лабораторним тваринам з експериментально змодельованою гострою нирковою недостатністю. Результати дослідження вказують на позитивний терапевтичний ефект після застосування стовбурових клітин у дозі 2,5 млн/гол. тварині, що підтверджується позитивною динамікою біохімічних показників крові та сечі, в тому числі динамікою показників кліренсу ендogenous креатиніну та залишкового азоту сечовини.

Ключові слова: МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОVBУРОВІ КЛІТИНИ, ГОСТРА НИРКОВА НЕДОСТАТНІСТЬ, БІОХІМІЯ, СИРОВАТКА КРОВІ, СЕЧА

Клітинна терапія — новий метод лікування захворювань пов'язаних з необоротною загибеллю клітинних елементів. В основі клітинної терапії лежить трансплантація різного клітинного матеріалу (ембріональних стовбурових клітин, аутогенних і алогенних стовбурових клітин дорослого організму, фетальних прогеніторних клітин). На сьогодні опублікована велика кількість робіт, присвячених дослідженню біології стовбурових клітин, та їх експериментального використання в клітинній терапії [1].

Найбільш перспективними в даному відношенні виявилися мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). У першу чергу, це обумовлено доступністю джерел їх отримання, можливістю швидкого нарощування клітинної маси *in vitro* та здатністю останніх до імуномодуляції, що дозволяє їх успішне застосування аллогенному реципієнту.

Особливої актуальності набувають дослідження присвячені корекції гострої ниркової недостатності з використанням мезенхімальних стовбурових клітин. Гостра ниркова недостатність — це розповсюджений клінічний синдром. Клінічні прояви цього порушення — результат зниження швидкості клубочкової фільтрації і неспроможність нирки виводити токсичні та кінцеві продукти обміну із організму [2].

Метою нашої роботи було вивчення ефективності застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у дозі 2,5 млн/гол. тварині для лікування експериментальної гострої ниркової недостатності.

Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 р.), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених Національним конгресом з біоетики (20.09.2004 р., Київ, Україна) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (1986 р., Страсбург).

Матеріали і методи

Для вивчення ефективності застосування мезенхімальних стовбурових клітин при гострій експериментальній нирковій недостатності використали 20 білих щурів, самиць із середньою живою масою 230 г. Тварин поділили на 5 груп по чотири тварини в кожній.

Щурів усіх груп витримували 24 години без їжі, після чого у тварин 4 дослідних груп моделювали гостру ниркову недостатність внутрішньом'язовим введенням їм 50 % водного розчину гліцеролу *ana partes* в м'язи задніх лап у дозі 8 мл/кг маси тіла. В результаті у тварин вже через 24 год. розвинулась міоглобінурична ГНН [3].

Через 48 год. після моделювання ГНН, на піку прояву її характерних ознак, тваринам чотирьох дослідних груп в кров'яне русло (безпосередньо в порожнину серця) вводили 2.5 млн/гол. мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку тварин іммобілізованих в фізіологічному розчині. Контрольній групі вводили фізіологічний розчин.

Піддослідні тварини знаходились в клітках протягом всього періоду досліджень. На 3, 7, 14 та 21 добу після експерименту в кожній групі тварин піддавали евтаназії внутрішньом'язевим введенням летальної дози суміші кетаміну (150 мг/кг) та ксилазину (60 мг/кг). Перед евтаназією у тварин відбирали кров для біохімічних досліджень безпосередньо із серця під наркозом, а також сечу, яку збирали протягом 24 год.

Біохімічні показники сироватки крові та сечі досліджували за допомогою автоматичного біохімічного аналізатору VITROS-250 (США).

У сироватці крові визначали вміст загального білка, сечовини, креатиніну, сечової кислоти, іонів К, Са, Р, Na, холестеролу, глюкози, активність ГГТ. У пробах сечі визначали вміст загального білку, сечовини, креатиніну, сечової кислоти, іонів К, Са, Р, Na, питому вагу, рН. За загальними біохімічними показниками сечі та показниками добового діурезу визначали кліренс ендogenous креатиніну та залишковий азот сечовини. За зміною вищезазначених показників визначали функціональний стан нирок [4].

Результати й обговорення

Результати досліджень показали, що рівень сечовини в сироватці крові після застосування МСК, починаючи із 14 дня дослідження, знижується до фізіологічного рівня порівняно з контролем, що вказує на відновлення функціональної активності нирок та активності виведення продуктів азотистого обміну (табл. 1).

Рівень креатиніну в сироватці крові на 14 день досліджень також знижується до рівня контролю, що свідчить про підвищення рівня фільтраційної здатності нирок щодо виведення ними продуктів азотистого обміну.

Таблиця 1

Динаміка біохімічних показників сироватки крові при ГНН після введення МСК (n=4; M±m)

№	Показники	Контроль	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1	Сечовина, ммоль/л	7,4±0,94	205,9±8,4	11,4±0,2**	8,2±0,7	8,1±0,03
2	Креатинін, мкмоль/л	36,3±4,2	745,2±3,4	51,5±1,8**	31,3±1,3	33±0,7
3	Натрій, ммоль/л	139±1,08	163,5±3,1***	152,3±0,95***	142,5±1,3	150,2±0,3
4	Калій, ммоль/л	6,75±0,83	10,1±0,3**	4,4±0,1*	5,25±0,3*	4,8±0,05*
5	Кальцій, ммоль/л	2,32±0,03	2,4±0,02*	2,7±0,06**	2,4±0,02**	2,5±0,01***
6	Фосфор, ммоль/л	4,1±0,77	14,6±0,2	2,3±0,01*	2,4±0,02	2,7±0,04
7	Сечова кислота, мкмоль/л	61,8±4,5	78,8±5,2*	94,7±3,1***	48,5±2,2*	37,3±0,9**
8	Заг. білок, г/л	65,9±3,8	79,02±2,8*	75,9±0,3*	67,1±0,15	59,9±0,3
9	Холестерол, ммоль/л	1,5±0,13	3,7±0,09	2,5±0,05***	1,7±0,1	1,8±0,03*
10	ГГТ, мкмоль/л	5,0±0	7±1,4	4,92±0,03	4,9±0,05	5,2±0,3
11	Глюкоза, ммоль/л	5,1±0,45	5,3±0,1	6,3±0,1*	10,2±1,3**	9,1±0,04***

Примітка: * — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001 порівняно з контролем (у цій та наступній таблиці)

Починаючи з 14 дня досліджень, спостерігається достовірне зниження вмісту сечової кислоти нижче рівня контролю, що, очевидно, також обумовлено активним очищенням крові від надлишку азоту.

Вірогідне зниження рівня калію та фосфору у сироватці крові вказує на зменшення клубочкової фільтрації в нирках та каналцевої секреції нирок. Підвищення в сироватці крові рівня натрію та кальцію характеризує порушення функціонального стану нирок та розвиток гострої ниркової недостатності.

Підвищення активності ферменту гамаглутамінтранспептидази, що виявляється на ранніх стадіях патології нирок, на 7 день досліджень знижує свою активність до фізіологічної норми та характеризує позитивний функціональний стан нирок.

Одним із надійних функціональних тестів щодо визначенню патології нирок є визначення залишкового азоту сечовини (ЗАС). При визначенні даного параметру необхідно дослідити рівень сечовини в сироватці крові для встановлення діагнозу патології нирок, то ще й збільшення цих параметрів свідчить про азотемію та порушення функціонального стану нирок та розвитком гломерулонефриту [5]. Дані, наведені на рисунку 1, вказують на позитивну динаміку змін вмісту залишкового азоту сечовини (ЗАС) після застосування МСК порівняно із патологією, а саме: на 21 добу рівень ЗАС повертається до фізіологічних параметрів, що свідчить про ефективність застосованої нами клітино-заміщуючої терапії.

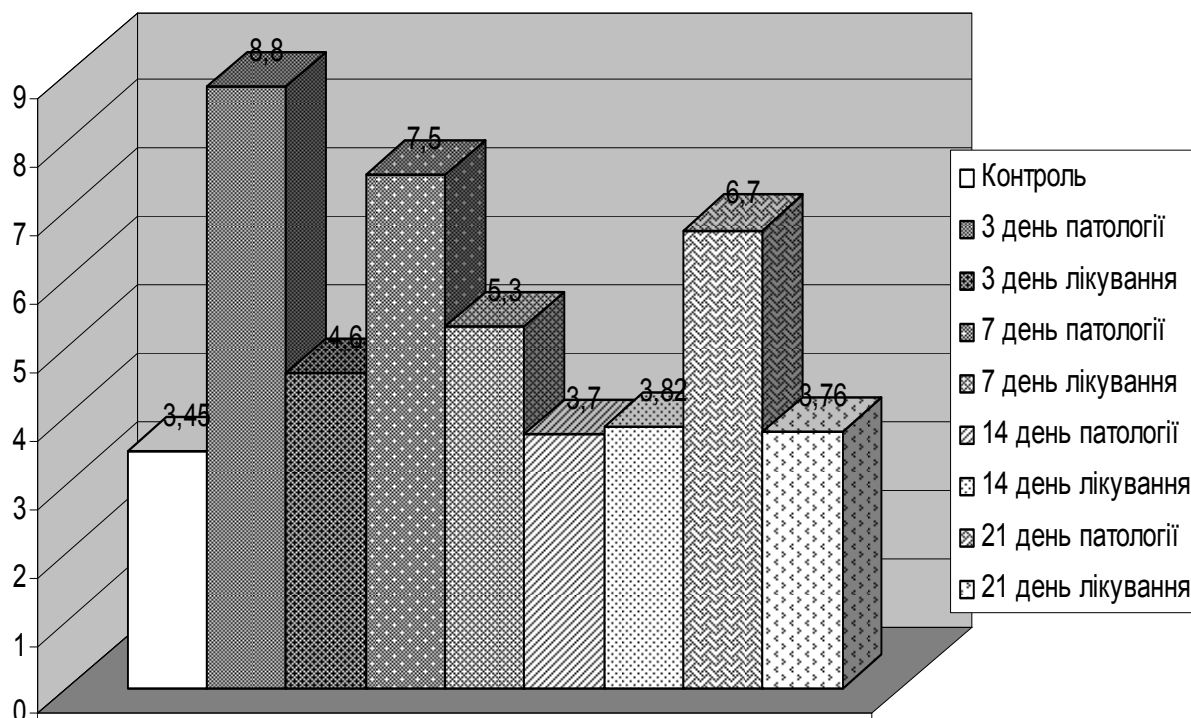


Рис. 1. Динаміка вмісту залишкового азоту сечовини (ЗАС) під впливом МСК

Дані, наведені у таблиці 2, вказують на динамічне достовірне зростання рівня сечовини у сечі в 12 разів, що свідчить про підвищену видільну функцію нирок, пов'язану з виведенням нирками надлишку продуктів азотистого обміну.

У свою чергу рівень креатиніну в сечі на 21 день досліджень збільшився майже у 20 разів порівняно з контролем, що свідчить про підвищене виділення надлишку продуктів азотистого обміну нирками з організму (табл. 2).

Встановлено достовірне підвищення рівня сечової кислоти в 13 разів, яке зберігається протягом усього періоду експерименту, що може свідчити про підвищене очищення організму так, як виділенням сечової кислоти здійснюється нирками.

Таблиця 2

Динаміка показників сечі при ГНН після введення МСК (n=3; M±m)

№	Показники	Контроль	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1	Сечовина, ммоль/л	82,4±1,99	457,9±40,8***	184±34,56*	467,2±51,4***	987,3±7,6*
2	Креатинін, мкмоль/л	369,3±49,6	6478,7±405,2***	623±93,5	1766,7±297,7*	7368,7±76,8
3	Натрій, ммоль/л	118,7±16,65	55±1,7*	57,3±3,7*	42±2,9**	14±1,2**
4	Калій, ммоль/л	39,7±6	62,9±2,7*	113,5±9,3**	230,6±11,8***	160,5±2,2**
5	Кальцій, ммоль/л	1,2±0,4	1,65±0,04	2,15±0,24	4,79±0,24**	5,1±0,12***
6	Фосфор, ммоль/л	5,31±2,07	41,24±2,4***	75,66±2,45	51,01±5,4***	30,93±0,27***
7	Сечова к-та, мкмоль/л	130,3±0,77	192,3±56,1*	252,3±39,1**	1202,3±223,4**	1704,7±27,1**
8	Питома вага	1,005±0,001	1,029±0,001**	1,027±0,002**	1,029±0,001***	1,029±0,0008***

9	pH	8,5±0,2	6±0,04***	7,3±0,1**	6,2±0,04***	6,5±0,1***
10	Білок (г/л)	8,3±0,97	0,5±0,1***	0,4±0,08***	0,3±0,08***	0,9±0,1***
11	Добовий діурез (мл)	16±0,58	3,7±0,8***	4,3±0,8***	6,7±0,4***	8±0,6***

Вірогідне збільшення рівня калію в сечі показує зменшення видільної функції нирок, що веде до зменшення реабсорбції. Так, як калій виділяється переважно нирками; майже 70 % його реабсорбується в проксимальних канальцях, а решта — в петлі Генле, його вміст в сироватці крові та сечі є одними із діагностичними показниками функціонального стану нирок. У свою чергу зниження рівня натрію в сечі свідчить про збільшення процесів його реабсорбції в клітинах нефронів.

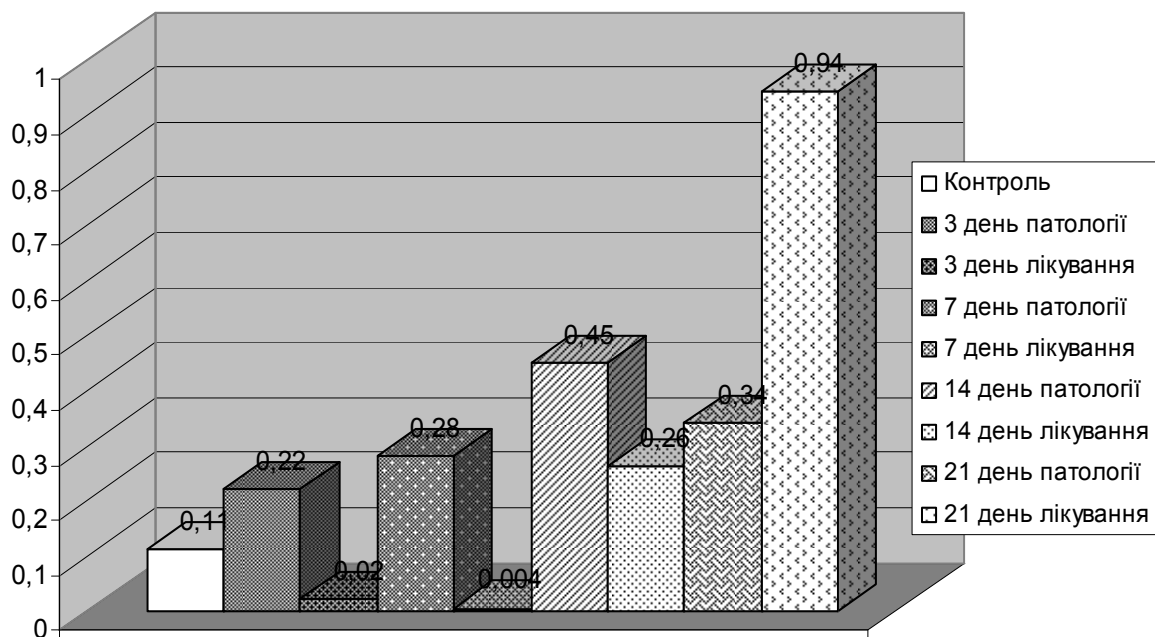


Рис. 2. Динаміка кліренсу ендогенного креатиніну (КЕК) під впливом МСК

Кліренс ендогенного креатиніну (швидкість клубочкової фільтрації) вважається показником ефективності роботи нирок по очищенню крові від креатиніну й виведенню його із сечею. Фактично, дана проба вказує на здатність нирок по очищенню від шкідливих речовин. Кліренс креатиніну — це обсяг плазми крові, що очищається від креатиніну за 1 хвилину при проходженні через нирки. Зниження кліренсу креатиніну свідчить про патологію нирок [5]. На рисунку 2 видно, що на 21 день дослідження після застосування МСК рівень КЕК стрімко зростає порівняно із патологією, що свідчить про відновлення функціональної здатності нирок по очищенню організму від продуктів метаболізму.

Вищезазначені табличні дані та дані рисунків свідчать про позитивну динаміку у тварин, яким застосовували мезенхімальні стовбурові клітини в дозі 2,5 млн/гол тварин. Це, очевидно, відбувається за рахунок відновлення структури тканин нирок, а саме, клубочкового апарату, епітелію канальців нирок, а також відновлення реабсорбційної та фільтраційної здатності нирок.

Особливу увагу при діагностуванні захворювань нирок слід приділити рівню виділення азотних шлаків: креатиніну і сечовини, а також продуктів білкового обміну, фосфатів і сульфатів. У процесі утворення сечі в гломерулах відбувається фільтрація плазми за винятком білків; первинна сеча, яка містить рідину і розчинені в ній речовини, згодом реабсорбується в канальцях. Повністю піддається зворотному всмоктуванню цукор, трохи менше — кухонна сіль і рідина, ще менше — сечовина, зовсім не всмоктуються креатинін, сульфати. Також звертають увагу на фосфати так, як ушкодження проксимальних канальців при отруєнні нефротоксичними речовинами (в нашій моделі міоглобіном) спричинив втрату фосфатів через нирку, оскільки

близько 90 % профільтрованого фосфору реабсорбується у первинній сечі переважно в проксимальних каналцях.

Висновки

1. Застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин відновлює видільну здатність нирок, на що вказує динаміка рівня креатиніну, сечовини та сечової кислоти в сироватці крові та сечі.

2. Ефективність застосування клітинно-заміщувальної терапії з використанням мезенхімальних стовбурових клітин підтверджується функціональними пробами на кліренс ендogenous креатиніну та залишкового азоту сечовини.

Перспективи подальших досліджень. Перспективою є впровадження ефективної дози клітинного матеріалу МСК для дрібних тварин із симптомокомплексом гострої ниркової недостатності

A. Y. Mazurkevich, O. L. Bobos', M. O. Malyuk, V. V. Kovpak, Y. O. Kharkevich

BIOCHEMICAL BLOOD AND URINE INDICIES AFTER APPLICATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER EXPERIMENTAL ACUTE RENAL FAILURE IN RATS

S u m m a r y

Conducted investigations to examination of biochemical changes of blood and urine after application of allogenic mesenchymal stem cells in laboratory animals with experimental acute renal failure. Investigation results show on immediate therapeutically effect after stem cells application in 2,5 mln/head dose by animals, which observes as positive dynamics. Also observes such dynamics of urea nitrogen and clearance of endogenous createnine indexes.

A. Й. Мазуркевич, А. Л. Бобось, Н. А. Малюк, В. В. Ковпак, Ю. А. Харкевич

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И МОЧИ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

А н н о т а ц и я

Проведенные исследования по изучению изменений биохимических показателей крови и мочи после применения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток лабораторным животным с экспериментально смоделированной острой почечной недостаточностью. Результаты исследования указывают на непосредственный терапевтический эффект после применения стволовых клеток в дозе 2,5 млн./гол. животному, которое наблюдается в положительной динамике. Также выявлено динамику хода данного синдрома за показателями клиренса endogenous креатенина и остаточного азота мочевины.

1. *Кругляков П. В.* Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на течение экспериментального инфаркта миокарда / П. В. Кругляков. — М. : Российская государственная библиотека, 2006. — С. 1–160.

2. *Шейман Д. А.* Патопизиология почки / Д. А. Шейман. — М. : БИНОМ, 1997. — С. 156–167.

3. *Chander V.* reversal of experimental myoglobinurie acute renal failure in rats by quercetin, a bioflavonoid / V. Chander, D. Singh, K. Chopra // *Pharmacology*. — 2004. — Vol. 2773, № 1. — P. 49–56.
4. Методики біохімічного аналізатора Vitros-250.
5. *Кучеренко Ю. Л.* Болезни почек кошек и собак. Диагностика и лечение / Ю. Л. Кучеренко. — К. : Здоровье, 2006. — 95 с.

Рецензент: кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин національного університету біоресурсів і природокористування України Данілов В. Б.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Вудмаска І. В.