

функціональних показателів сперматозоїдів у половозрілих крыс під впливом етилового ефіру α -бромізовалеріанової кислоти при внутрішньочеревній введенні в дозах 32,8 мг/кг і 6,56 мг/кг. Змінені досліджені показателі не виявлено, за виключенням значительного збільшення відносної маси семенників. Даний факт може трактуватися як потенціальна гонадотоксичність сполучення. Отримані дані є основою для проведення подальших досліджень стану морфологічних показателів сперматогенного епітелію.

Ключевые слова: гонадотоксическое действие, этиловый эфир α -бромізовалеріанової кислоти, лабораторні крысы

functional values of spermatozoa in adult rats which received 32.8 mg / kg and 6.56 mg / kg of ethyl α -bromo-isovalerate directly to stomach. The only changes to be observed was a significant increase of relative weight of the testicles. Such an effect could be considered as an eventual gonadotoxicity of the compound. Received data can be used in further studies in order to better understand the changes of morphological values of seminiferous epithelium in rats.

Key words: gonadotoxic effect, ethyl ester of α -bromoisovaleric acid, laboratory rats

Стаття надійшла 3.03.2016 р.

УДК 616.61-008.64-036.11-08-092.9

А. А. Чеботарьова

ДЗ «Луганський державний медичний університет», м. Рубіжне

ВПЛИВ АПОПТОЗ-ІНДУКОВАНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ФУНКЦІЮ НИРОК ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГОСТРОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

В статті приведені дослідження рівня продуктів азотистого обміну в крові лабораторних тварин – щурів, що перенесли експериментальну гостру ниркову недостатність і зміни цих показників на фоні введення суспензії мезенхімальних стовбурових клітин, які були культивовані в апоптоз-індукованому середовищі. Стовбурові клітини отримували з кісткового мозку здорових щурів і культивували їх з додаванням до стандартного середовища гомогената ниркової тканини тварин, які перенесли гостру ниркову недостатність за три доби до експерименту, таким чином створюючи апоптоз-індуковані умови. Отримані дані свідчать про різке збільшення в крові тварин, які перенесли гостру ниркову недостатність продуктів азотистого обміну, як маркерів ураження ниркової функції. Внутрішньовенне введення тваринам суспензії мезенхімальних стовбурових клітин значно покращувало біохімічні показники лабораторних щурів.

Ключові слова: гостра ниркова недостатність, мезенхімальні стовбурові клітини, апоптоз, креатинін, сечовина.

Робота є фрагментом НДР «Механізми апоптозу в культурах клітин і репараційні процеси в тканинах» (№ державної реєстрації 0111U001159).

Медична наука останніх років приділяє велику увагу вивченню питання проблеми ішемічних ниркових захворювань, що пов'язано з постійним зростанням кількості хворих на цю патологію і високим відсотком смертності від неї [1]. Труднощі складає і своєчасна діагностика ниркових хвороб і адекватна їх корекція, що зумовлено швидким розвитком вторинних поліорганичних уражень [7].

Одним з найбільш загрозливих ішемічних станів ниркової тканини є гостра ниркова недостатність (ГНН) – патологія, зростання якої в останні роки зумовлена несприятливими побутово-соціальними умовами, безконтрольним використанням лікарських засобів, маючих нефротоксичний ефект та погіршенням якості питної води [9, 10].

Гостра ниркова недостатність – це тяжкий патологічний стан, який може супроводжувати хронічні захворювання сечовивідної системи, що важко піддається корекції медикаментозними засобами. Важливу роль у розвитку цього патологічного стану відіграє апоптоз – процес запрограмованої клітинної загибелі, що може бути розглянутий як захисна реакція організму на процес ураження [2].

За умов постійного пошуку нових, більш ефективних засобів фармакотерапії ішемічних уражень різних органів і систем, велику увагу приділяють розробці альтернативних методів лікування, таких як застосування клітинних технологій. На сьогодні клінічно і експериментально доведено ефективність застосування терапії стовбуровими клітинами таких патологічних станів як ішемічні ураження серцево-судинної системи і м'язової тканини, опікова хвороба, генералізовані запальні процеси [3, 5, 6].

Наведені дані, підтверджуючі доцільність використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), в лікуванні гострих і хронічних уражень нирок [11, 12]. Для вивчення глибини порушення ниркової функції і її відновлення, за умов застосування лікарських засобів, зазвичай оцінюють концентрацію в крові продуктів азотистого обміну – креатиніну і сечовини, які в нормі екскретуються з організму з сечею [4].

Метою роботи було встановити зміни у функції нирок в умовах моделювання експериментальної гострої ниркової недостатності на тлі застосування мезенхімальних

стовбурових клітин, культивованих в апоптоз-індукованому середовищі і порівняння їх ефективності з стовбуровими клітинами, культивованими в класичних умовах.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження було виконано на 52 безпородних білих щурах-самцях віком 14-16 тижнів і вагою 200-250 грамів, згідно норм Європейської конвенції про захист прав тварин. Експериментальна гостра ниркова недостатність моделювалася в умовах лабораторії шляхом перетискання обох ниркових ніжок на 30 хвилин за типом ішемія-реперфузія. Операція проводилася під ефірним наркозом.

Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з кісткового мозку стегнових і великогомілкових кісток здорових лабораторних щурів. Культивування одних зразків мезенхімальних клітин проводили в умовах стерильної лабораторії у CO₂ інкубаторі, на живильному середовищі ІГЛА-МЕМ, збагаченому 10% телячою сироваткою з додаванням антибіотику та L-глутаміну впродовж 12 днів. Другі зразки МСК було культивовано у апоптоз-індукованих умовах, досягнутих шляхом додавання до зазначеного живильного середовища гомогенату ниркової тканини щурів, яким було змодельовано експериментальну гостру ниркову недостатність по моделі ішемія-реперфузія за три доби до забою. Забій проводили під тіопенталовим наркозом шляхом декапітації, нирки тварин вилучали одразу після забою і гомогенізували їх в стерильних умовах.

Суспензію мезенхімальних стовбурових клітин вводили експериментальним тваринам у хвостову вену через годину після операції – 5 мільйонів клітин. Усі тварини були поділені на 4 групи: I група – інтактні тварини (11 тварин), II група – тварини, яким було змодельовано гостру ниркову недостатність (13 тварин), III група – тварини, яким після моделювання експериментальної гострої ниркової недостатності вводили мезенхімальні стовбурові клітини, культивовані у стандартних умовах (15 тварин), IV – тварини, яким після моделювання ГНН вводили мезенхімальні клітини, культивовані в апоптоз-індукованих умовах (13 тварин). Рівень креатиніну і сечовини в сироватці крові визначали стандартними методами на 3, 7 і 14 добу після формування ГНН [8].

Отримані результати оброблялися з використанням статистичного коефіцієнту Стюдента (t) із застосуванням програмного пакету обробки даних Statistica 6.0.

Результати дослідження та їх обговорення. В ході роботи було виявлено різке зростання концентрації сечовини і креатиніну в крові лабораторних тварин, які перенесли експериментальну гостру ниркову недостатність, в порівнянні з показниками інтактної групи. Так на 3 добу дослідження рівень сечовини в плазмі крові тварин II групи у 1,89 разів перевищував показники інтактної групи.

На 7 добу з моменту операції по моделюванню експериментальної ГНН вміст сечовини у крові тварин II групи перевищував такий у I групі у 3,51 разів. На 14 добу дослідження концентрація сечовини у крові щурів, що перенесли експериментальну ГНН дещо знижувався, але все ж залишався вищим за показники інтактної групи у 2,56 разів.

Результати, які були отримані нами у III групі тварин – після введення їм внутрішньовенно суспензії мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в стандартних умовах – відрізнялися від попередніх.

Так, на 3 добу після операції моделювання гострої ниркової недостатності і введення МСК рівень сечовини в крові тварин складав $7,51 \pm 1,04$ ммоль/л, що перевищувало показники інтактної групи в 1,59 разів, але було на 18,9% ($p < 0,05$) нижче за результати, отримані у II групі на відповідну добу експерименту. На 7 добу дослідження концентрація сечовини у плазмі крові тварин після введення культури МСК перевищувала показники інтактної групи в 1,27 разів і була нижче за результати тварин, які не отримували ін'єкцію мезенхімальних стовбурових клітин на 50,37% ($p < 0,05$).

У IV групі тварин, які отримували після операції по моделюванню ГНН ін'єкцію мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в апоптоз-індукованому оточенні на 3 добу експерименту рівень сечовини становив $6,12 \pm 0,17$ ммоль/л, що перевищувало показники інтактної групи 1,38 разів, але було нижче результатів, отриманих в II і III групах у 1,46 і 1,23 рази відповідно. На 7 добу рівень сечовини в крові тварин IV групи перевищував результати інтактної групи в 1,83 рази, залишаючись нижче результатів, отриманих у тварин, які перенесли ГНН без введення мезенхімальних стовбурових клітин в 1,93 рази і нижче результатів отриманих після ін'єкції МСК, культивованих в стандартних умовах в 1,36 разів. На 14 добу дослідження показники концентрації даного метаболіту практично порівнювався з результатами інтактної

групи, перевищуючи їх всього на 8,47% ($p < 0,05$) і будучи нижчими за результати отримані у II і III групах в 2,34 і 1,17 разів відповідно (таблиця 1).

Подібна картина спостерігалася і під час визначення концентрації креатиніну в плазмі крові лабораторних тварин. Різке підвищення її в II групі, порівнюючи з інтактними тваринами спостерігалася на 3, 7 і 14 добу експерименту (у 3,48, 11,03 і 5,72 рази відповідно). Введення суспензії мезенхімальних стовбурових клітин, культивованих в стандартних умовах характеризувалося зниженням концентрації цього метаболіту в крові тварин III групи, відносно II групи ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Концентрація сечовини в крові щурів, які перенесли експериментальну ГНН на фоні введення мезенхімальних стовбурових клітин

	3 доба експерименту	7 доба експерименту	14 доба експерименту
Інтактні тварини (I група)	4,72 ммоль/л \pm 0,16	4,72 ммоль/л \pm 0,16	4,72 ммоль/л \pm 0,16
ГНН (II група)	8,93 ммоль/л \pm 0,56*	16,56 ммоль/л \pm 1,07*	12,11 ммоль/л \pm 0,72*
ГНН + класичні МСК (III група)	7,51 ммоль/л \pm 1,04* [^]	11,62 ммоль/л \pm 0,98* [^]	6,01 ммоль/л \pm 0,17* [^]
ГНН + апоптоз-індуковані МСК (IV група)	6,12 ммоль/л \pm 0,21* [^]	8,56 ммоль/л \pm 0,19* [^]	5,12 ммоль/л \pm 0,14* [^]

Примітки: 1. * – достовірність змін щодо інтактної групи, 2. [^] – достовірність змін щодо II групи, 3. [^] – достовірність змін, щодо III групи (*[^] – $p < 0,05$).

На 3 добу дослідження концентрація креатиніну в плазмі щурів III групи було у 1,26 разів нище за показники II групи, але в 2,76 разів вищою за інтактні показники. На 7 добу рівень креатиніну дещо зростає, залишаючись нижчим за показники тварин, яким після моделювання ГНН не вводили МСК у 1,86 разів. На 14 добу його рівень знижувався, становлячи $63,98 \pm 8,72$ мкмоль/л, що все ще перевищувало показники інтактних тварин у 1,75 разів.

На фоні введення апоптоз-індукованих мезенхімальних клітин тваринам IV групи на 3 добу після операції рівень креатиніну крові перевищував показники інтактної групи на 58%, але був нижче за показники II і III груп у 1,46 і 1,15 разів відповідно. На 7 добу експерименту концентрація креатиніну сягала $101,17 \pm 9,52$ мкмоль/л, що перевищувало показники інтактних тварин майже у 2,77 разів, але було нижче даних, отриманих у II і III групах. На 14 добу дослідження рівень креатиніну майже дорівнював показникам I групи тварин, будучи вищим за них всього на 29,3% (таблиця 2).

Таблиця 2

Концентрація креатиніну в крові щурів, які перенесли експериментальну ГНН на фоні введення мезенхімальних стовбурових клітин

	3 доба експерименту	7 доба експерименту	14 доба експерименту
Інтактні тварини (I група)	36,62 мкмоль/л \pm 8,16	36,62 мкмоль/л \pm 8,16	36,62 мкмоль/л \pm 8,16
ГНН (II група)	127,54 мкмоль/л \pm 7,52*	404,04 мкмоль/л \pm 9,14*	209,34 мкмоль/л \pm 8,06*
ГНН + класичні МСК (III група)	100,92 мкмоль/л \pm 9,05* [^]	217,09 мкмоль/л \pm 7,42* [^]	63,98 мкмоль/л \pm 8,72* [^]
ГНН + апоптоз-індуковані МСК (IV група)	87,59 мкмоль/л \pm 8,22* [^]	101,17 мкмоль/л \pm 952* [^]	51,76 мкмоль/л \pm 6,14* [^]

Примітки: 1. * – достовірність змін щодо інтактної групи, 2. [^] – достовірність змін щодо II групи, 3. [^] – достовірність змін, щодо III групи (*[^] – $p < 0,05$).

Отримані дані свідчать, що функціональна активність нирок у лабораторних тварин, які перенесли експериментальну гостру ниркову недостатність знижується, що є найбільш помітним на 7 добу з моменту моделювання патологічного процесу. Застосування терапії мезенхімальними стовбуровими клітинами, особливо культивованими в апоптоз-індукованих умовах, демонструє покращення ниркової функції (стосовно показників концентрації в крові креатиніну і сечовини) на всі дні дослідження, з майже наближенням до інтактних показників через 14 діб. Це може свідчити про активацію компенсаторних систем в нирковій тканині мезенхімальними стовбуровими клітинами і більш швидким протіканням репаративних процесів, які стимулюються застосуванням апоптоз-індукованих МСК.

Висновок

У тварин, які перенесли експериментальну гостру ниркову недостатність і не отримували ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин, спостерігалася підвищення в крові маркерів, які свідчать про погіршення ниркової функції. Застосування для корекції даних змін мезенхімальних

стовбурих клітин дало позитивний ефект, а терапія МСК, культивованими в апоптоз-індукованих умовах скоротила термін наявності цих патологічних змін.

Перспективи подальших розробок у даному напрямку: у подальшому планується вивчити механізм впливу апоптоз-індукованого оточення на процеси проліферації і диференціювання мезенхімальних стовбурих клітин.

Список літератури

1. Багдасарова І. В. Хронічна хвороба нирок у дітей та стан замісної ниркової терапії в Україні / І. В. Багдасарова, С. П. Фоміна // Український журнал нефрології та діалізу. – 2015. – № 1. – С. 3-7.
2. Бурлака Є. А. Порушення в системі контролю апоптозу при хронічному гломерулонефриті у дітей / Є. А. Бурлака // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2015. – № 1. – С. 39-45.
3. Галстян Г. М. Применение мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток для лечения сепсиса / Г. М. Галстян, П. М. Макарова, Е. Н. Паровичникова // Анестезиология и реаниматология. – 2015. – № 5. – С. 59-65.
4. Джіоев І. Г. Механізми водовидельничельної функції почек при експериментальній гострій почечній недостаточності на фоні гіперкальціємії / І. Г. Джіоев, А. В. Козаєв, Б. Н. Кабоєва [и др.] // Фундаментальні дослідження. – 2014. – №10 (10). – С. 1924-1928.
5. Зорина А. І. Перспективи використання ствольових кліток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Ч. 2 Популяції ствольових кліток м'язечного і нем'язечного походження / А. І. Зорина, А. А. Пулін, П. Б. Копнін [и др.] // Патологіческая фізіологія і експериментальна терапія. – 2015. – Т. 59, № 3. – С. 106-117.
6. Козель А. І. Новые аспекты клеточной терапии ишемических заболеваний сердца / А. И. Козель, Е. С. Головнева, Т. Г. Кравченко [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2015. – Т. 22, № 3. – С. 165-171.
7. Хорошилов С. Е. Возможности медикаментозной нефропротекции и профилактики острой почечной недостаточности / С. Е. Хорошилов, А. В. Никулин // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16, № 3 (2). – С. 31-35.
8. Чеботарєва А. А. Изменение состояния системы антиоксидантной защиты в условиях введения апоптоз-индуцированных мезенхимальных стволовых клеток на фоне экспериментальной острой почечной недостаточности / А. А. Чеботарєва, И. А. Комаревцева // Человек и его здоровье. – 2015. – № 3. – С. 101-104.
9. Cerda J. Promoting Kidney Function Recovery in Patients with AKIR requiring RRT / J. Cerda, K. D. Liu, D. N. Cruz, et al. // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2015. – № 10-10. – P. 1859-1867
10. Heung M. Acute kidney injury: gateway to chronic kidney disease / M. Heung, L. S. Chawla // Nephron. Clinical practice. – 2014. – № 127 (1-4). – P. 30-34.
11. Humphreys B.D. Kidney injury, stem cells and regeneration / B.D. Humphreys // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 2014. – № 1. – P. 25-31.
12. Rivera J. A. Update on the management of chronic kidney disease / J. A. Rivera, A. M. O'Hare, G. M. Harper // Am. Fam. Physician. – 2012. – № 86. – P. 749-754.

Реферати

ВЛИЯНИЕ АПОПТОЗ-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ФУНКЦИЮ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Чеботарєва А. А.

В статье приведены исследования уровня продуктов азотистого обмена в крови лабораторных животных – крыс, перенесших экспериментальную острую почечную недостаточность и изменения этих показателей на фоне введения суспензии мезенхимальных стволовых клеток, культивированных в апоптоз-индуцированном окружении. Стволовые клетки получали из костного мозга здоровых крыс и культивировали с добавлением к стандартной среде гомогената почечной ткани животных, перенесших острую почечную недостаточность за трое суток до эксперимента, таким образом создавая апоптоз-индуцированные условия. Полученные данные свидетельствуют о резком повышении в крови животных, перенесших острую почечную недостаточность, продуктов азотистого обмена, как маркеров поражения почечной функции. Внутривенное введение животным суспензии мезенхимальных стволовых клеток значительно улучшало биохимические показатели крови животных.

Ключевые слова: острая почечная недостаточность, мезенхимальные стволовые клетки, апоптоз, креатинин, мочеви́на.

Стаття надійшла 12.02.2016 р.

INFLUENCE OF APOPTOSIS-INDUCED MESENCHYMAL STEM CELLS ON RENAL FUNCTION IN EXPERIMENTAL ACUTE RENAL FAILURE

Chebotareva A. A.

The article presents the measuring of nitrogen metabolism products level in the blood of rats undergoing experimental acute renal failure, and changes in these indicators on the background of an injection mesenchymal stem cells cultured in the apoptosis-induced environment. Stem cells from bone marrow were obtained from normal rats and cultured with standard medium with adding the homogenate of kidney tissue after acute renal failure, thus creating apoptosis-induced conditions. The data show a increase nitrogen metabolism products in the blood of animals with acute renal failure. Intravenous injection of a suspension of the animal mesenchymal stem cells significantly improved biochemical indices of the blood of animals.

Key words: acute renal failure, mesenchymal stem cells, apoptosis, creatinine, urea.

Рецензент Шепітько В.І.