

УДК 612.466.22

ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕФРИТА НА ФОНЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

**Бибаева Л.В., Цебоева А.А., Оганесян Д.Х., Ислаев А.А.,
Тлеужев М.Х., Джигкаева Я.И., Маликиев И.Е., Кокаев Р.И.**

*ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России,
РСО-Алания, Владикавказ, e-mail: L.bi.bio@yandex.ru*

Изучение морфологической картины почек крыс линии Wistar с моделью нефрита, индуцированного внутримышечным введением 50% раствора глицерина в дозе 0,8 мл/100 г веса, показало, что у животных, на фоне выраженных функциональных изменений почек отмечаются значительные гистологические изменения, в виде воспалительной инфильтрации, очагового фибриноидного набухания стенок клубочковых капилляров, сужения просвета сосудов, дистрофии клеток эпителия канальцев. Опытные животные, перенесшие трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека в дозе 1 млн клеток в 1 мл физиологического раствора внутривенно, характеризуются менее выраженными функциональными нарушениями почек, а также меньшими морфологическими изменениями почечной ткани по сравнению с контрольной группой, и имеют тенденцию к нормализации гистологической картины.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, токсический нефрит, гистологическое исследование

THE HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EXPERIMENTAL NEPHRITIS DURING CELL THERAPY

**Bibaeva L.V., Tseboeva A.A., Oganesyanyan D.K., Islaev A.A., Tleuzhev M.K.,
Dzhigkaeva Y.I., Malikiev I.E., Kokaev R.I.**

North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, e-mail: L.bi.bio@yandex.ru

Studying of a morphology of the Wistar rats kidneys with the nephrite model induced intramuscular injection of 50% glycerol (0,8 ml per 100 g of body weight) showed that at animals had expressed functional changes of kidneys, considerable histologic changes, like as inflammatory infiltration, focal swelling of walls of glomerular capillaries, narrowing of a vessels gleam, dystrophy of an tubular cells. The experimental animals undergoing transplantation of mesenchymal stem cells of a human placenta in a dose of 1 million cells per 1 ml of 0,9% NaCl solution intravenously are characterized by less expressed functional violations of kidneys, and also smaller morphological changes of kidneys, in comparison with control group, and tend to normalization of a histologic picture.

Keywords: mesenchymal stem cells, toxic nephritis, histologic examination

На сегодняшний день имеется ряд работ, посвященных изучению эффектов клеточных препаратов на различные формы экспериментальных нефритов, как токсических тубулоинтерстициальных, так и гломерулонефритов. При этом в большинстве работ отмечаются положительные результаты клеточной терапии. В частности, при использовании аллогенных МСК костного мозга показано проникновение их в почечную ткань, восстановление эндотелия капилляров клубочков, нормализация ультраструктуры клеток эпителия канальцев и повышение их пролиферации [5]. Также показан ангиогенный эффект МСК, выражающийся в повышении плотности капилляров после трансплантации клеток [7]. Более того, доказано ингибирование воспалительной реакции, а также усиление протективных эффектов, выражающихся в том числе в активации антиоксидантной системы и секреции цитокинов и ростовых факторов [6]. В целом положительные эффекты МСК выражаются как в восстановлении морфологической картины почек, так и в нормализации их функции.

Однако имеющихся на сегодняшний день знаний оказывается недостаточно для применения клеточных препаратов на основе МСК в клинической практике. Нет достаточных данных о механизмах действия стволовых клеток. Более того, необходимо иметь представление о возможных побочных эффектах клеточной терапии, способах их устранения и профилактики. Также нет четких представлений о наиболее эффективном при данной патологии типе клеток для клеточной терапии, их дозе, сроках и способе трансплантации. В связи с этим необходимо тщательное изучение действия МСК в условиях эксперимента.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на 40 крысах-самцах линии Wistar. Животные содержались в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде.

Модель токсического нефрита воспроизводилась у животных опытной ($n = 20$) и контрольной ($n = 20$) групп путем внутримышечного введения 50% раствора глицерина из расчета 0,8 мл/100 г веса. Внутримышечное введение глицерина приводит к развитию рабдомиолиза, миоглобинурии с токсическим поражением как клубочкового, так и канальцевого аппарата почек.

Опытным животным под золетилевым наркозом (50 мг/кг) на 2 сутки после создания модели нефрита вводили внутривенно в бедренную вену 1 мл суспензии, содержащей 1 млн МСК плаценты человека в физиологическом растворе. Контрольным животным аналогичным образом вводили физиологический раствор. Отдельно была создана группа фоновых животных, которые содержались в таких же условиях, что и животные опытных и контрольных групп, однако они были интактны.

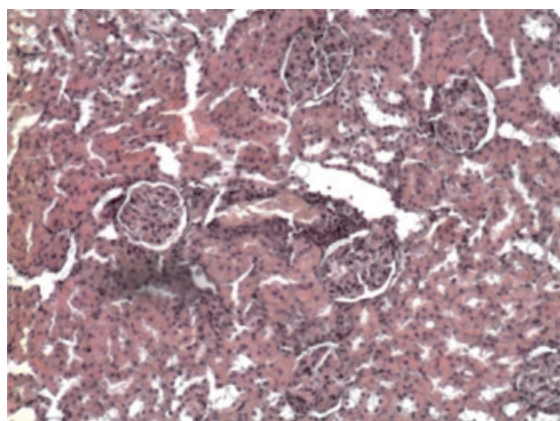
Выделение МСК из тканей плаценты человека производили ферментативным способом. Для получения клеток использовали фрагмент ткани плаценты после нормальных родов вблизи пупочного канатика. После промывания его раствором Хэнкса (ПанЭко, РФ), содержащим антибиотики, и механического воздействия полученную взвесь инкубировали в 0,1%-ном растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) в течение 30 мин при 37°C. По окончании инкубации суспензию отмывали раствором Хэнкса (5 мин, 300 g). Осадок ресуспендировали в DMEM-F12 (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, США), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 U/мл пенициллина, 2 мМ L-глутамин (все – Gibco, США), и суспензию помещали в культуральные флаконы (площадью 75 см² с фильтром (Greiner, Германия)). Культивирование проводили в CO₂ инкубаторе со следующими параметрами: 37°C, 5% CO₂, 80% влажности. При

достижении 80–90% конfluenceности клетки снимали с пластика раствором трипсина-версена (ПанЭко, РФ) (в соотношении 1:1) и рассаживали в концентрации 2,5×10⁵ клеток/флакон. Подсчет клеток проводили в камере Горяева [1].

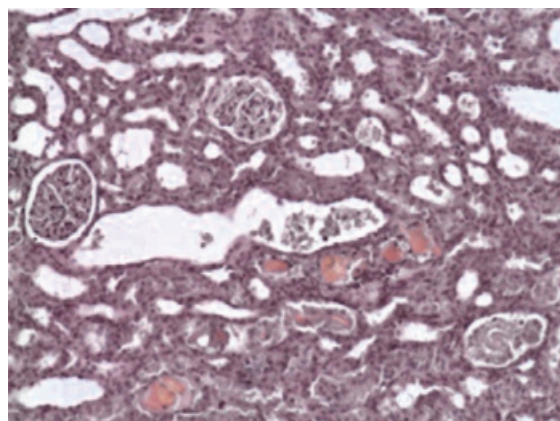
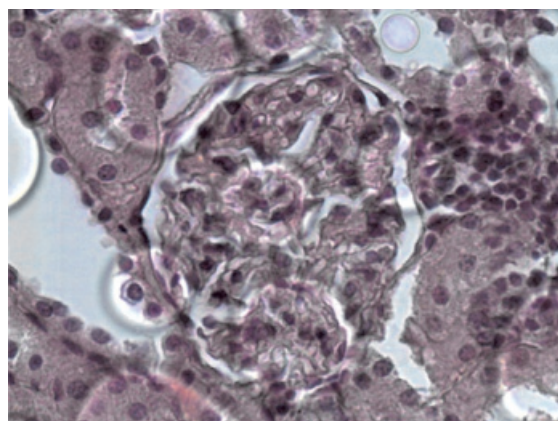
На 3, 5, 7, 10 и 14 сутки после создания модели токсического нефрита проводились исследования функциональных показателей мочеобразования. Исследования мочеобразовательной функции почек проводили в условиях спонтанного диуреза [3]. Одновременно проводилось морфологическое исследование ткани почек. Материал фиксировался в 10% растворе нейтрального формалина, заливался в парафин по общепринятой методике. Изучались срезы почек толщиной 5–6 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, в проходящем свете при помощи микроскопа Микромед-1 под увеличением х300, х600.

Результаты исследования и их обсуждение

Внутримышечное введение глицерина вызывает миолиз, следствием чего является выброс большого количества свободного миоглобина в кровь. Миоглобин вызывает токсическое повреждение различных систем и органов, в большей степени – почек, где развивается токсический нефрит [2].



а



б

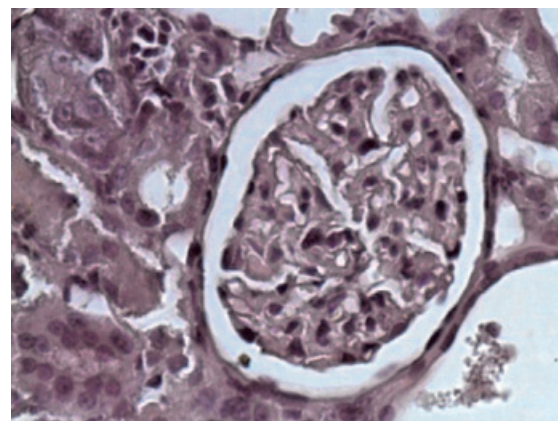


Рис. 1. Гистологическая картина ткани почек на 5 сутки после создания модели. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х300, х600:
а – контрольная группа; б – опытная группа

У всех животных с глицериновым нефритом отмечались выраженные нарушения функций почек в виде резкого изменения клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции, креатинемии и протеинурии [4].

На фоне дизурических явлений отмечались выраженные изменения морфологии почек. Так, на 3 сутки у животных и опытной, и контрольной групп выявляются признаки воспаления и дезорганизации гистологических структур почек в виде воспалительной инфильтрации, очагового фибриноидного набухания стенок клубочковых капилляров, сужение просвета сосудов. Клетки эндотелия сосудов мелкие, с гиперхромными ядрами и узкой полоской цитоплазмы. Выявляются признаки гидропической дистрофии клеток эпителия канальцев: набухание их цитоплазмы, ядра смещены к базальной мембране, бедно окрашены. Просвет канальцев сужен, местами отмечается слущивание эпителия.

На 5 сутки у животных контрольной группы отмечаются более выраженные морфологические изменения почек. Так, характерен отек интерстиция, сопровождающийся

воспалительной инфильтрацией коркового и мозгового вещества. Отчетливо отмечаются признаки плазматического пропитывания стенок сосудов, фибриноидное набухание и фибриноидный некроз, просветы сосудов сужены, вплоть до полной облитерации. Пространства между эндотелиоцитами и сосудами резко расширены. Выраженный отек эпителия канальцев, клетки его увеличены, цитоплазма просветлена, выраженные признаки гидропической дистрофии, вплоть до баллонной дистрофии. Просвет канальцев резко сужен или полностью закрыт (рис. 1, а). Отек клубочков, отек и закрытие канальцев подтверждают явления почечной недостаточности, проявившиеся при исследовании водовыделительной функции [4].

У опытных животных на этом сроке отмечаются подобные изменения, но они менее выражены. Так, имеет место менее выраженная гидропическая дистрофия клеток эпителия канальцев, явления баллонной дистрофии встречаются редко. Просвет канальцев сужен, но визуализируется. В просвете канальцев обнаруживаются белковые массы. Отмечаются небольшие очаги кровоизлияния (рис. 1, б)

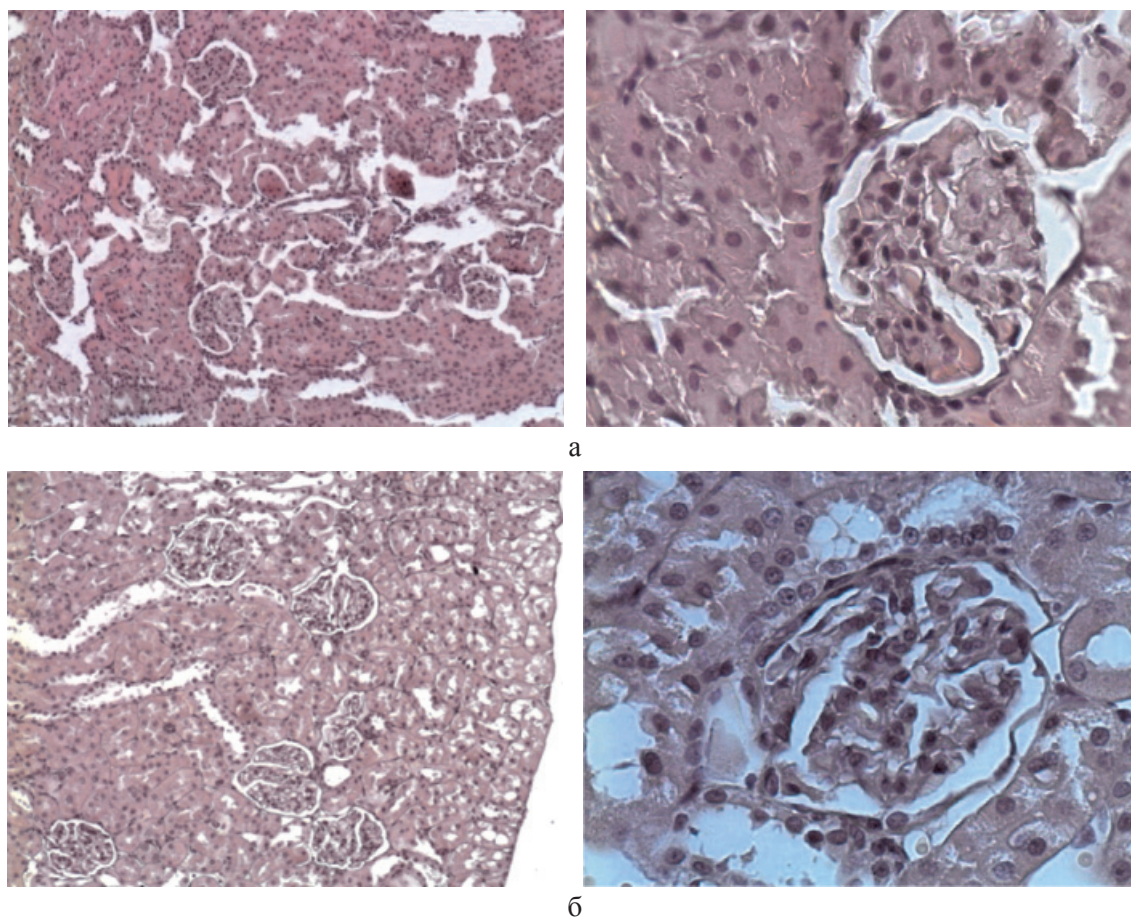


Рис. 2. Гистологическая картина ткани почек на 7 сутки после создания модели. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 300$, $\times 600$:
а – контрольная группа; б – опытная группа

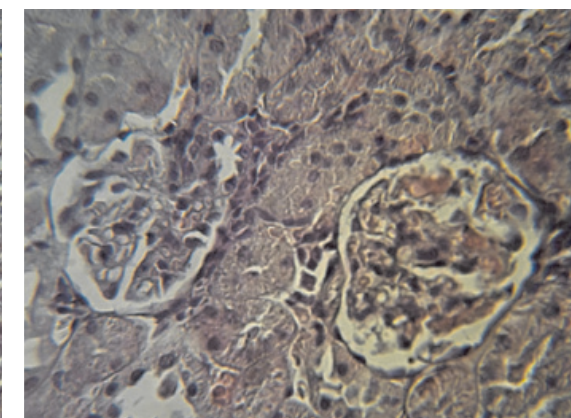
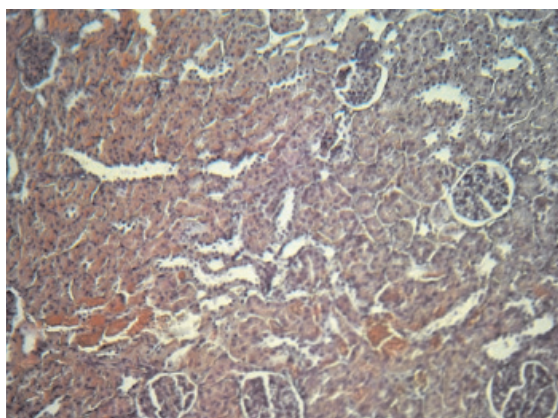
На 7 день у животных контрольной группы отмечается нарастание описанных явлений. Выраженная диффузная воспалительная инфильтрация. Отек клубочков и канальцев. Отмечаются очаги кровоизлияния, дистрофические изменения канальцев. Просвет канальцев закрыт (рис. 2, а).

При гистологическом исследовании почек животных опытной группы отмечается умеренная степень гидропической дистрофии клеток эпителия канальцев. Просветы канальцев визуализируются. Клубочки

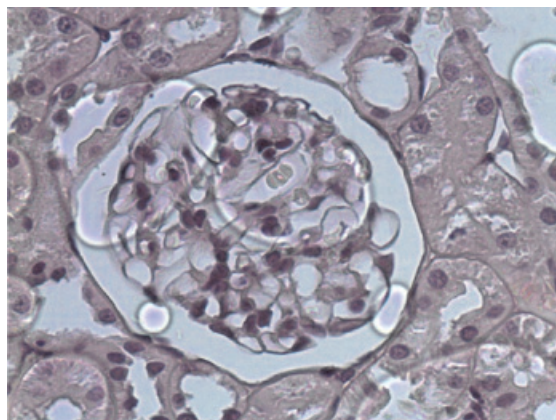
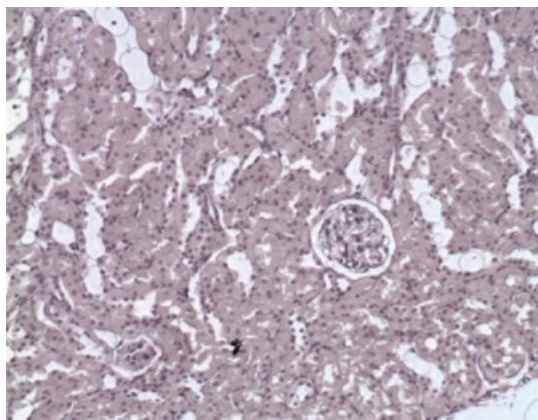
несколько отечны. Очаговая воспалительная инфильтрация (рис. 2, б).

На 10 сутки отмечались аналогичные явления. Выраженная воспалительная инфильтрация ткани почек у контрольных животных, отечный эпителий канальцев, просвет канальцев не визуализируется, некроз эпителия канальцев и эндотелия сосудов.

У животных опытной группы отмечаются менее выраженные явления дезорганизации гистологических структур, отмечается тенденция к нормализации гистологической картины.



а



б

Рис. 3. Гистологическая картина ткани почек на 14 сутки после создания модели. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х300, х600:
а – контрольная группа; б – опытная группа

На 14 сутки у животных контрольной группы отмечаются более интенсивные изменения. Характерна воспалительная инфильтрация тканей почек. Выраженный отек эпителия канальцев, закрытие их просвета. Фибриноидный некроз артериол и капиллярных петель клубочков, отек стромы, кровоизлияния, дистрофические изменения канальцев и, как следствие, склероз почечной ткани (рис. 3, а).

У опытных животных на этом сроке отмечаются умеренные явления гидропиче-

ской дистрофии клеток эпителия канальцев. Просветы канальцев хорошо визуализируются. Менее выраженные, чем на предыдущих сроках, повреждения клубочков. Признаков воспалительной инфильтрации не отмечается (рис. 3, б).

Выводы

1. Однократное внутримышечное введение 50% раствора глицерина крысам линии Wistar в дозе 0,8 мл/100 г веса вызывает развитие токсического нефрита с нарушением

основных процессов мочеобразования и выраженными морфологическими изменениями ткани почек в виде воспалительной инфильтрации, очагового фибриноидного набухания стенок клубочковых капилляров, сужения просвета сосудов, дистрофии клеток эпителия канальцев.

2. Опытные животные, перенесшие трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека в дозе 1 млн клеток в 1 мл физиологического раствора внутривенно, характеризуются менее выраженными морфологическими изменениями почечной ткани, по сравнению с контрольной группой, и имеют тенденцию к нормализации гистологической картины.

Работа выполнена за счет средств Гранта для государственной поддержки научных исследований в Республике Северная Осетия-Алания по договору № 5 от 18.09.14.

Список литературы

1. Кониева А.А., Холоденко И.В., Шрагина О.А., Холоденко Р.В., Бурунова В.В., Бибиева Л.В., Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н. Функциональная оценка мезенхимальных стволовых клеток, меченных магнитными микрокапсулами, in vitro и анализ их распределения в организме после трансплантации // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 3. – С. 147–153.
2. Джиоев И.Г., Фидарова А.М. Некоторые особенности функции и морфологии почек крыс в условиях различных моделей экспериментальной почечной недостаточности // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. XV. – № 1. – С. 38–39.
3. Плахтий Л.Я., Еналдиева Д.А., Бибиева Л.В., Кониева А.А., Дзахова Г.А., Цховребов А.Ч. Хроническое токсическое действие фторидов натрия на функции почек крыс в эксперименте // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (часть 4). – С. 696–700.
4. Цебоева А.А., Кокаев Р.И., Бибиева Л.В., Оганесян Д.Х., Маликиев И.Е., Гуцаева Э.А., Ислаев А.А. Возможности применения клеточной терапии на фоне токсического нефрита // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10 (часть 7). – С. 1394–1398.
5. Bruno S., Grange C., Deregibus M.C., et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury // J. Am. Soc. Nephrol. – 2009 May. – № 20(5). – С. 1053–67.
6. Chen Y.T., Sun C.K., Lin Y.C., et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction // J. Transl. Med. – 2011 May. – № 5; 9. – С. 51.
7. Uchimura H., Marumo T., Takase O., et al. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis // J. Am. Soc. Nephrol. – 2005 Apr. – № 16(4). – С. 997–1004.

References

1. Konieva A.A., Holodenko I.V., Shragina O.A., Holodenko R.V., Burunova V.V., Bibaeva L.V., Jarygin K.N., Jarygin V.N. Funkcional'naja ocenka mezenhimal'nyh stvolovykh kletok, mechenykh magnitnymi mikrochasticami, in vitro i analiz ih raspredelenija v organizme posle transplantacii // Kletochnye tehnologii v biologii i medicine. 2010. no. 3: 147–153.
2. Dzhioev I.G., Fidarova A.M. Nekotorye osobennosti funkcii i morfologii почек krys v uslovijah razlichnykh modelej jekperimental'noj pochechnoj nedostatochnosti // Vestnik novykh medicinskih tehnologij. 2008. T. XV. no. 1. pp. 38–39.
3. Plahitij L.Ja., Enal'dieva D.A., Bibaeva L.V., Konieva A.A., Dzhahova G.A., Chovrebov A.Ch. Hronicheskoe toksicheskoe dejstvie florida natrija na funkciu почек krys v jeksperimente // Fundamental'nye issledovaniya. no. 11 (chast' 4), 2013. 696–700.
4. Ceboeva A.A., Kokaev R.I., Bibaeva L.V., Oganessian D.H., Malikiev I.E., Gucaeva Je.A., Islaev A.A. Vozmozhnosti primeneniya kletочноj terapii na fone toksicheskogo nefrita // Fundamental'nye issledovaniya. 2014. no. 10 (chast' 7).
5. Bruno S., Grange C., Deregibus M.C., et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury // J. Am. Soc. Nephrol. 2009 May; 20(5): 1053–67.
6. Chen Y.T., Sun C.K., Lin Y.C., et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction // J. Transl. Med. – 2011 May. 5;9:51.
7. Uchimura H., Marumo T., Takase O., et al. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis // J. Am. Soc. Nephrol. 2005 Apr; 16(4): 997–1004.

Рецензенты:

Албегова Ж.К., д.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ;

Джиоев И.Г., д.м.н., профессор, заведующий ЦНИЛ, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ.

Работа поступила в редакцию 27.12.2014.