

УДК 612.465.084.1:616-002.1

*М.В. Репін, Л.М. Марченко, Т.П. Говоруха, А.М. Васькович, В.І. Строна,
І.І. Кондаков, О.Ф. Брусенцов*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОГО ВВЕДЕННЯ КРІОЕКСТРАКТІВ ПЛАЦЕНТИ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Введення алогенного кріоекстракту плаценти до початку моделювання токсичної гострої ниркової недостатності покращувало функціональні показники нирок щурів і мінімізувало запалення інтерстицію до двох тижнів після введення гліцеролу на відміну від ксеногенних кріоекстрактів плаценти (людини та кроля).

Ключові слова: гліцеровола модель, гостра ниркова недостатність, кріоекстракт плаценти, ультраструктура.

Із-за значної складності лікування ниркової недостатності провідним напрямом залишається профілактичний, що включає розробку доступних методів відновної корекції функції нирок.

Більшість дослідників вважають, що основною ланкою в патогенезі гострої ниркової недостатності (ГНН) є порушення ниркового кровообігу і гемодинаміки при дії речовин, що викликають стан токсичного, опікового або больового шоку і супроводжуються змінами тканинного метаболізму. Для ГНН характерним є ураження всього комплексу діяльності нирок, зокрема тубулярно-інтерстиціального апарату [1, 2].

Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що введення кріоекстракту алогенної плаценти на ранніх термінах ГНН приводило до нормалізації структурно-функціонального стану нирок, «омолодження» крові і затримувало розвиток хронічної ниркової недостатності (ХНН) до 8-го тижня спостереження [3, 4].

Процеси, що виникають в організмі після введення біологічно активних речовин плацентарної тканини при модельованій патології, носять адаптаційно-приспосувальний характер і спрямовані на підвищення неспецифічної резистентності до дії ушкоджуючих факторів.

Важливим моментом є оцінка нефропротекторних і репаративних властивостей кріо-

екстракту плаценти як чинника попередження й мінімізації наслідків ниркової патології.

Метою роботи було порівняльне дослідження впливу попереднього введення кріоекстрактів плаценти різного походження (щура, людини та кроля) на морфофункціональний стан нирок щурів при моделюванні гострої ниркової недостатності.

Матеріал і методи. Матеріалом дослідження служили 65 білих безпородних щурів масою 200–300 г, віком 4 місяці. Тваринам вводили кріоекстракти плацентарної тканини різного походження по 0,5 мл тричі на тиждень. Кріоконсервовані екстракти плаценти виготовляли за медичними рекомендаціями [5]. Через тиждень після введення кріоекстрактів розпочинали моделювання ГНН.

Для моделювання ГНН щурів витримували 24 години без їжі, після чого однократно внутрішньом'язово вводили 50%-вий водний розчин гліцеролу в дозі 10 мл на 1 кг маси тіла. Тварини були розподілені на чотири групи: 1-ша – щури з моделлю ГНН; 2-га – щури з моделлю ГНН, яким попередньо вводили кріоекстракт плаценти щура (КПЩ); 3-тя – щури з моделлю ГНН, яким попередньо вводили кріоекстракт плаценти людини (КПЛ); 4-та – щури з моделлю ГНН, яким попередньо вводили кріоекстракт плаценти кроля (КПК). Щурів виводили з експерименту на 1-й, 2-й та 3-й тижні після введення гліцеролу. Тварин усіх груп поміщали в об-

© М.В. Репін, Л.М. Марченко, Т.П. Говоруха та ін., 2017

мінні 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). Для електронно-мікроскопічних досліджень фрагменти нирок фіксували глутаровим альдегідом і тетроксидом осмію та поміщали в епон-аралдит. Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім і лужним фуксином. Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю. Ультраструктуру клітин досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К (АТ «Selmi», Україна) при прискорувальній напрузі 75 кВ, забезпеченого системою знімання і аналізу зображення САІ-01А (АТ «Selmi») з використанням високочутливої CCD камери DX-2 і пакета програм обробки зображення фірми «КАРРА», Німеччина.

Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і

«Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Результати. При дослідженні напівтонких зрізів нирок щурів через один тиждень після введення гліцеролу та з попереднім введенням кріоекстрактів плаценти в усіх піддослідних тварин структурні зміни були подібними і відповідали шоківій стадії розвитку ГНН (рис. 1). В структурі коркової речовини спостерігалися явища осередкової ішемії, що супроводжувалися лімфостазом і набряком інтерстицію.

Епітелій проксимальних і дистальних каналців був у стані гіаліново-краплинної та гідропічної дистрофії. Нерівномірно розширені просвіти каналців містили клітинний детрит і циліндри, деякі каналці були заповнені міоглобіном. Зустрічалися вогнища некротичних змін епітелію каналців головних відділів нефронів. У корі нирки спостерігалося розширення міжканалцевих кровоносних і лімфатичних капілярів. В інтерстиції в перикапілярних зонах подекуди містилися клітини запалення. В структурі ниркових клу-

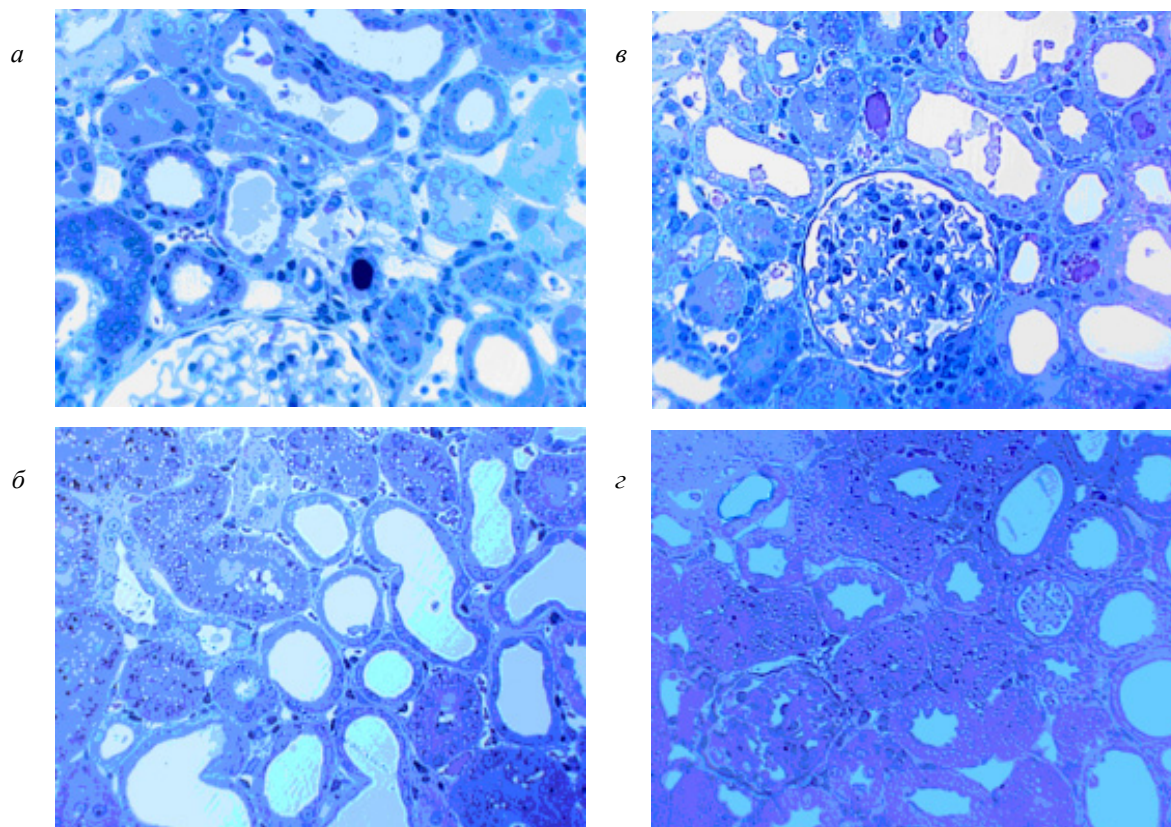


Рис. 1. Структурні зміни нефронів через 1 тиждень після введення гліцеролу: *а* – попереднє введення кріоекстракту плаценти щура; *б* – попереднє введення кріоекстракту плаценти людини; *в* – попереднє введення кріоекстракту плаценти кроля; *г* – модель гострої ниркової недостатності. Напівтонкі зрізи. Забарвлення метиленовим синім і лужним фуксином, $\times 400$

бочків спостерігалися мінімальні зміни, пов'язані зі збільшенням мезангіального матриксу. Дослідження через один тиждень моделювання ГНН показали, що у щурів усіх груп сформувалося гостре порушення видільної функції нирок, яке характеризувалося анурією і високими показниками креатиніну крові [(53,0±14,3) мкмоль/л], що в 1,8 раза перевищувало нормальні показники (в групі ГНН). В групі тварин з введенням КПЩ рівень креатиніну крові складав (48,3±10,0) мкмоль/л, з введенням КПЛ – (52,3±8,7) мкмоль/л, а з введенням КПК – (75,0±13,0) мкмоль/л.

Через два тижні розвитку ГНН основним було порушення мікрогемодинаміки й лімфоциркуляції в тканині кори нирки. Крім того, спостерігалися осередкова дистрофія епітелію каналців головних відділів і деструкція базальних мембран дистальних каналців. В інтерстиції визначалися явища набряку й лейкоцитарної інфільтрації. Такі структурні зміни відповідали олігоануричній стадії ГНН.

При введенні КПЛ і КПК структурні перебудови тканини нирки не відрізнялися від таких при розвитку ГНН, лише у тварин з введенням КПЩ осередки запалення інтерстицію майже не визначалися (рис. 2, а).

ної функції зберігався. В групі ГНН, незважаючи на олігоурію, значне зниження ШКФ, гіперкреатинінемію (концентрація креатиніну перевищувала показник у інтактних тварин в середньому в 2 рази, $p < 0,05$), концентрація креатиніну в сечі складала (2,7±0,9) ммоль/л, що двократно перевищувало норму. Вживаність експериментальних тварин була високою – близько 100 %. У групі з введенням КПЩ ШКФ була вище за норму і становила (0,76±0,05) мл/хв, а рівень креатиніну крові знизився з (48,3±10,0) до (27,7±3,2) мкмоль/л за рахунок збільшення концентраційної здатності каналцевого апарату нирок, на що вказують низький добовий діурез і висока концентрація креатиніну сечі. В групі з введенням КПЛ зросла ШКФ до (0,06±0,001) мл/хв і знизився рівень креатиніну крові до (45,3±5,8) мкмоль/л за рахунок збільшення його рівня в сечі. В групі з введенням КПК ШКФ становила (0,07±0,002) мл/хв, рівень креатиніну крові зріс до (104±12) мкмоль/л за рахунок зменшення його рівня в сечі та низького добового діурезу.

Через три тижні після введення гліцеролу у тварин усіх груп спостерігалось відновлення діурезу. В структурі нирки зберігалися ознаки порушення мікроциркуляції, які виражалися

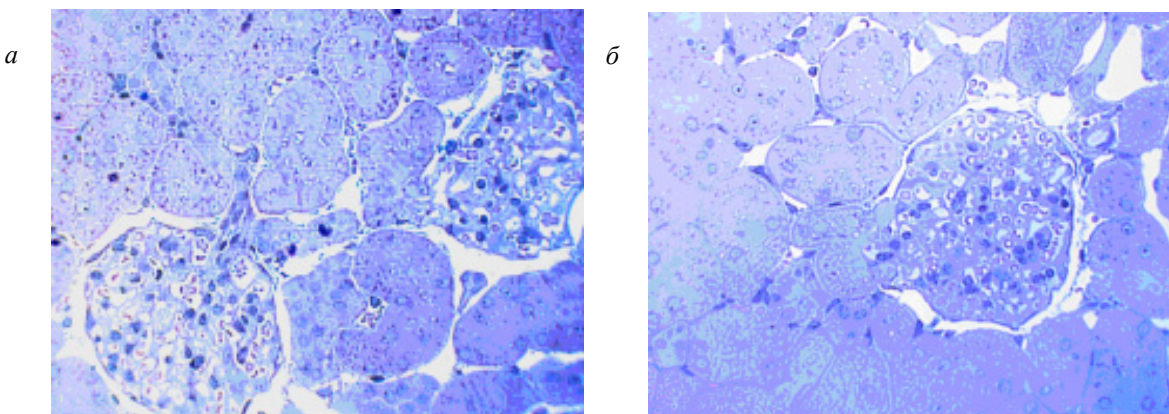


Рис. 2. Структура кори нирки щурів з попереднім введенням кріоекстракту плаценти щура (а) та кріоекстракту плаценти людини (б) через 2 тижні після введення гліцеролу. Напівтонкі зрізи. Забарвлення метиленовим синім і лужним фуксином, $\times 400$

У тварин з попереднім введенням КПЛ спостерігалось осередкове розширення просвітів каналців головних відділів нефронів. Для каналцевого епітелію була характерна гіаліново-краплинна дистрофія. В інтерстиції кори та мозкової речовини спостерігалися ознаки запалення різної інтенсивності у різних тварин цієї групи (рис. 2, б).

Аналіз функціональних показників нирок свідчив, що стан гострого порушення виділь-

розширенням міжканалцевих кровоносних і лімфатичних судин (рис. 3, а).

В частині клубочків був відсутній ультрафільтрат в просвіті капсули Шумлянського, такі клубочки мали лапчасту форму. Канальцевий епітелій головних відділів нефронів перебував у стані регенерації, однак все ще зберігалися осередки з наявністю гіаліново-краплинної та гідропічної дистрофії епітеліоцитів (рис. 3, б).

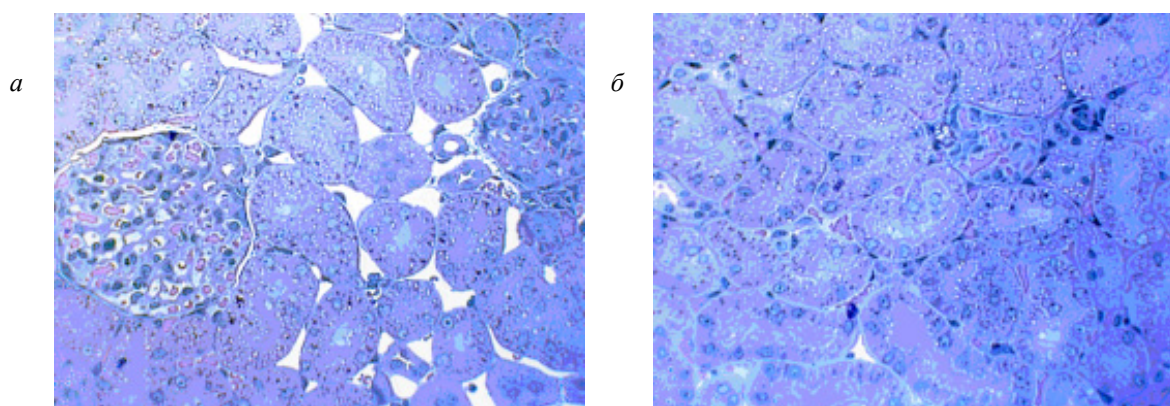


Рис. 3. Структура кори нирки щура через три тижні після введення гліцеролу: *а* – порушення мікроциркуляції (модель ГНН); *б* – попереднє введення КПЩ. Напівтонкі зрізи. Забарвлення метиленовим синім і лужним фуксином, х 400

В клубочках спостерігалось збільшення мезангіального матриксу. Інтерстиціальне запалення також мало місце у тварин усіх груп незалежно від виду введеного кріоекстракту.

Стан гострого порушення видільної функції нирок в групі ГНН залишався стабільним. Про це свідчили олігоурія, гіперкреатиніємія (концентрація креатиніну крові перевищувала показник у інтактних тварин і становила $(55,5 \pm 9,7)$ мкмоль/л), концентрація креатиніну в сечі складала $(2,3 \pm 0,2)$ ммоль/л, що перевищувало норму, але відзначалося значне збільшення ШКФ – з $(0,02 \pm 0,001)$ до $(0,46 \pm 0,02)$ мл/хв. В групі з введенням КПЩ рівень креатиніну крові та ШКФ вірогідно погіршились і становили $(66,0 \pm 8,8)$ та $(0,25 \pm 0,02)$ мл/хв відповідно. В групі з введенням КПЛ рівень креатиніну крові та ШКФ вірогідно поліпшились і становили $(56,7 \pm 4,5)$ та $(0,53 \pm 0,05)$ мл/хв за рахунок збільшення добового діурезу з $(0,75 \pm 0,01)$ до $(14,3 \pm 4,5)$ мл. В групі з введенням КПК на цей термін рівень креатиніну

крові та ШКФ вірогідно не змінювались і становили $(66,0 \pm 7,2)$ та $(0,07 \pm 0,01)$ мл/хв за рахунок зменшення добового діурезу з $(8,0 \pm 1,2)$ до $(6,0 \pm 1,0)$ мл та дуже низької концентраційної здатності каналцевого апарату.

Дослідження ультраструктури тканини нирки виявило найбільш суттєві зміни на 2-й та 3-й тиждень розвитку ГНН.

Через два тижні введення гліцеролу у тварин усіх груп спостерігалось розширення капілярів петель клубочків. Базальні мембрани в основному були тонкими, проте зустрічались ділянки їх потовщення і прояснення. У деяких петлях клубочків спостерігалось сегментарне відшаровування подоцитів від базальної мембрани. У мезангіальній ділянці відбувалося збільшення мезангіального матриксу, спостерігалась фокальна інтерпозиція відростків мезангіоцитів на периферію капілярних петель, що супроводжувалось порушенням цілісності ендотеліальних клітин (рис. 4, *а*). У тварин з введенням КПЛ

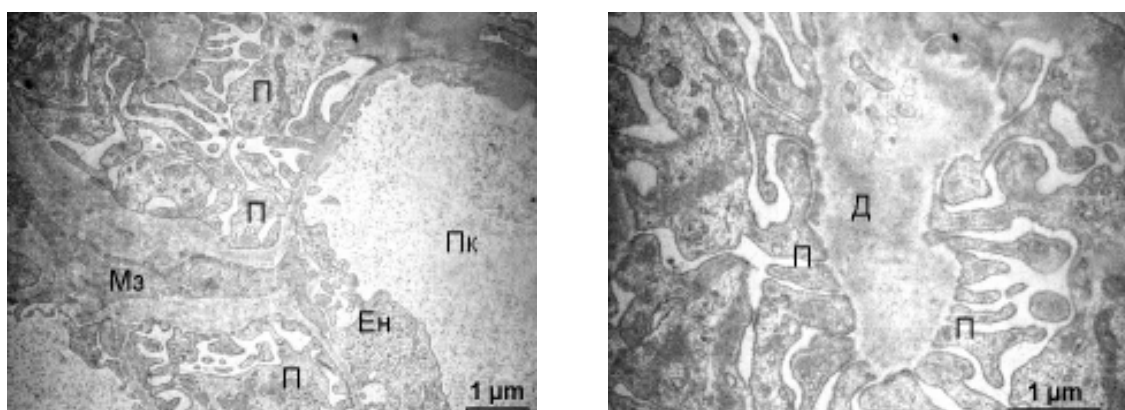


Рис. 4. Ультраструктура фрагментів ниркових клубочків після введення КПЛ (два тижні ГНН): *а* – інтерпозиція відростка мезангіоциту на периферію капілярних петель клубочка; *б* – відкладення депозитів імунних комплексів у базальній мембрані клубочкового капіляра кори нирки: П – відростки подоцитів; Ен – ендотелій; Д – депозити імунних комплексів; Мз – відросток мезангіоциту; Пк – просвіт капіляра

в коркових клубочках виявлено розширення гломерулярних базальних мембран з відкладенням депозитів імунних комплексів, що свідчить про розвиток гломерулонефриту (рис. 4, б). У ряді проксимальних канальців відмічалось розширення міжклітинних контактів, а також руйнування апікальної плазмолеми з виходом вмісту клітин у просвіт канальця.

У більшості епітеліоцитів проксимальних канальців спостерігалися ознаки набряку цитоплазми та її органодів, розширення цистерн ендоплазматичного ретикулу, гомогенізація матриксу і деструкція крист мітохондрій.

В епітеліоцитах дистальних канальців спостерігалася гіпертрофія мітохондрій з ущільненням матриксу (рис. 5). В біляканальцевих зонах виявлялися вогнища лейкоцитарної інфільтрації.

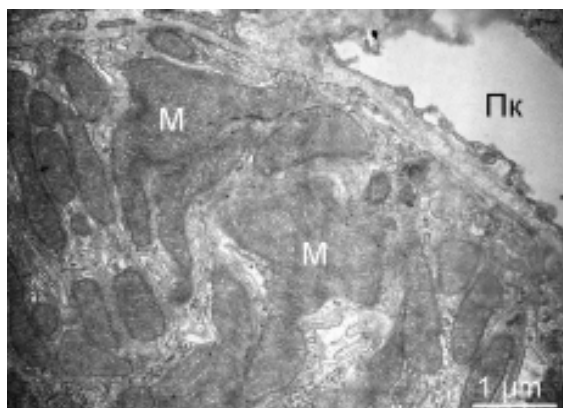


Рис. 5. Гіпертрофія мітохондрій дистального канальця кори нирки щура через 2 тижні після введення гліцеролу (введення КПЛ): Пк – просвіт капіляра; М – мітохондрії

Через три тижні після введення гліцеролу в корі нирки експериментальних тварин виявлялися патологічні зміни як клубочків, так і канальців нефронів, найменше виражені при введенні КПЦ.

Характерним було значне звуження просвіту капсули клубочків, яке могло супроводжуватися відсутністю в ньому ультрафільтрату. Мали місце ознаки деструкції деяких клубочків. Ряд клубочків характеризувався наявністю петель капілярів, що спалися, деструкцією і десквамацією ендотелію. Спостерігалася лімфоцитарна інфільтрація інтерстиція біляканальцевої локалізації при попередньому введенні КПЛ і КПК.

Клітини епітелію проксимальних і дистальних канальців мають ознаки гідропічної

і гіаліново-краплинної дистрофії. За даними електронно-мікроскопічного дослідження, гідропічна дистрофія характеризувалася появою в клітинах ниркових канальців вакуолей, наповнених цитоплазматичною рідиною і пластинчастим вмістом. Ядра зміщувалися до периферії, набували неправильної форми, іноді зморщувалися, ядерні пори були розширені. Спостерігався розпад ультраструктур клітин. Канальці ендоплазматичного ретикулу розширювалися з утворенням вакуолей і втратою рибосом. Мітохондрії мали гетерогенну ультраструктуру: велика частина їх мали просвітлений матрикс і зредуковані кристи (рис. 6), тоді як інші ха-

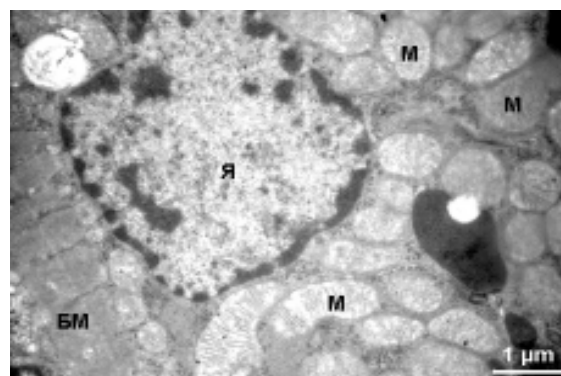


Рис. 6. Ультраструктурні зміни мітохондрій нефроцитів дистального відділу нефрону щура (ГНН, три тижні після введення гліцеролу):

Я – ядро; БМ – базальна мембрана;
М – мітохондрії

рактеризувалися щільним матриксом і стисненими кристами.

Мікроворсинки щіткової облямівки в проксимальному відділі нефрону коротшали і злипалися, а в дистальному відділі повністю редукувалися. В деяких канальцях базальні мембрани розпушувалися і товщали.

Ендотеліоцити клубочкових і міжканальцевих кровоносних капілярів демонстрували деякі ознаки реактивності: ускладнення люмінальної поверхні, розширення пор, локальний лізис фенестр, контактування з тромбоцитами. Спостерігалася також інтерпозиція відростків мезангіоцитів на периферію капілярних петель.

Подоцити характеризувалися зменшенням кількості цитоподій, відсутністю в деяких місцях щілистої діафрагми, що приводило до відшарування ендотелію від базальної мембрани. Наявність електронно прозорих ділянок в міжканальцевому інтерстиції свідчила

про його осередковий набряк (рис. 7), характерний для всіх груп тварин.

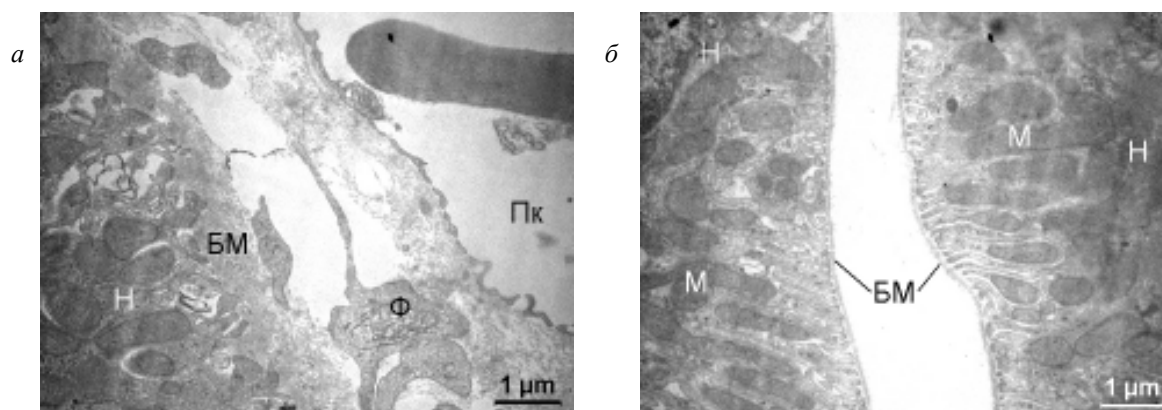


Рис. 7. Інтерстиціальний набряк в корі нирки через три тижні після введення гліцеролу (КПЩ):
 а – перикапілярний набряк інтерстицію розшарування БМ дистального канальця;
 б – набряк міжканальцевого інтерстицію.

Н – нефроцити дистального канальця; М – мітохондрії; БМ – базальна мембрана; Пк – просвіт капіляра; Ф – фіброцит

Для ГНН через три тижні після введення гліцеролу характерна гіаліново-краплинна дистрофія нефроцитів проксимальних канальців, в основі якої лежить недостатність вакуольно-лізосомального апарату клітини, а також гідропічна дистрофія переважно дистальних канальців, обумовлена порушенням водно-електролітного і білкового обміну, які ведуть до зміни колоїдно-осмотичного тиску в клітині. Гідропічна дистрофія є результатом пошкодження гломерулярного фільтра, яке веде до гіперфільтрації й недостатності ферментних систем базального лабіринту нефроцитів, що забезпечують реабсорбцію води [6, 7].

Таким чином, електронно-мікроскопічним аналізом тканини нирок при моделюванні нефротоксичної ГНН (1–2 тижні) виявлено

пошкодження нефрону з розвитком осередкової гідропічної й гіаліново-краплинної дис-

трофії клітин епітелію і некрозу епітелію головних відділів незалежно від попереднього введення кріоекстрактів плаценти. Найменш виражені запальні процеси в інтерстиції відбувались при введенні КПЩ до початку моделювання ГНН.

Порівняльний аналіз показників функції нирок у експериментальних тварин усіх груп показав, що помітний нефропротекторний ефект спостерігався у тварин при введенні КПЩ до моделювання ГНН. При введенні КПЛ відбувалось вірогідне покращення ШКФ на третьому тижні ГНН за рахунок збільшення добового діурезу. Для КПК характерна відсутність нефропротекторного ефекту, оскільки показники рівня креатиніну сечі та ШКФ вказують на дуже низьку концентраційну здібність канальцевого апарату.

Список літератури

1. Романенко А.М., Непомнящий В.М. Морфологічна діагностика нефрологічних хвороб // Нефрологія / за ред. Л.А. Пирога. К.: Здоров'я, 2004. С. 38–97.
2. Шулушко Б.И. Нефрологія. СПб.: Ренкор, 2002. 779 с.
3. Топчий І.І., Кондаков І.І., Кірієнко О.М. Вплив кріоекстракту плаценти людини на структурно-функціональний стан нирок щурів при моделюванні гострої та хронічної ниркової недостатності // Український журнал нефрології та діалізу. 2014. № 3 (43). С. 62–67.
4. Юрченко Т.М., Говоруха Т.П., Марченко та ін. Ультроструктура і функціональні особливості нирок щурів при моделюванні токсичної гострої ниркової недостатності // Експерим. і клін. медицина. 2012. № 3 (56). С. 49–53.
5. Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Кузьміна І.Ю. та ін. Заготівля, кріоконсервування плацентарної тканини і її клінічне застосування: Метод. рекомендації. Харків, 1996. 15 с.
6. Тареев Е.М. Клиническая нефрология. Москва: Медицина, 1993. Т. 1. 688 с.
7. Meyer T.W. Tubular injury in glomerular disease // Kidney Int. 2003. Vol. 63. P. 774–787.

Н.В. Репин, Л.Н. Марченко, Т.П. Говоруха, А.М. Васькович, В.И. Строна, И.И. Кондаков, А.Ф. Брусенцов

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КРИОЭКСТРАКТОВ ПЛАЦЕНТЫ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Введение аллогенного криоэкстракта плаценты до начала моделирования токсической острой почечной недостаточности улучшало функциональные показатели почек крыс и минимизировало воспаление интерстиция до двух недель после введения глицерола в отличие от ксеногенных криоэкстрактов плаценты (человека и кроля).

Ключевые слова: глицероловая модель, острая почечная недостаточность, криоэкстракт плаценты, ультраструктура.

N.V. Repin, L.N. Marchenko, T.P. Govorukha, A.M. Vaskovich, V.I. Strona, I.I. Kondakov, A.V. Brusentsov

EFFECT OF PRELIMINARY INTRODUCTION OF PLACENTAL CRYOEXTRACTS OF VARIOUS ORIGINS ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF RATS' KIDNEYS IN ACUTE RENAL FAILURE

Introduction of allogenic placental cryoextract prior to the beginning of modeling the toxic acute renal failure improved the functional indices of rats' kidneys and minimized an inflammation of interstitium to two weeks after glycerol administration in contrast to xenogenic placental cryoextracts (human and rabbit).

Keywords: glycerol model, acute renal failure, placental cryoextract, ultrastructure.

Поступила 07.04.17