ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВОВЫХ КЛЕТОК НА ДИНАМИКУ ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕФРОНОВ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Демьяненко Е.В.¹, Лузин В.И.¹

¹ГУ «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки», Луганск, e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua

Мезенхимальные стволовые клетки все чаще используются в качестве средств клеточной терапии различных патологических состояний, в том числе и заболеваний почек. Целью исследования было изучение динамики изменений гистоморфометрических показателей основных структурных компонентов кортикальных и юкстамедуллярных нефронов белых крыс, вызванных влиянием острого иммобилизационного стресса, при внутривенном введении мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения. Исследование выполнено на 195 самцах беспородных белых крыс, масса которых составляла 200–250 граммов, возраст 3–4 месяца. Стресс моделировали 24-часовой иммобилизацией в индивидуальных фиксирующих камерах. Оценку эффективности применения клеточной терапии проводили на 1-е, 3-е, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки постиммобилизационного периода. Исследованием установлено, что острый иммобилизационный стресс приводит к значительным морфологическим изменениям почечной ткани (гемодинамическим расстройствам, гипертрофии почечных телец, расширению пространства капсулы Шумлянско-Боумена, дилатации всех видов канальцев, гидрической дистрофии эпителиоцитов и десквамации кальциевого эпителия). При этом более выраженные изменения гистоморфометрических параметров наблюдались в нефронах кортико-медуллярной зоны. Применение мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения сопровождалось более быстрым восстановлением морфологических характеристик почечной ткани в реадaptационном периоде после вынужденной 24-часовой иммобилизации по сравнению с показателями группы контроля. Данные исследования дополняют уже имеющиеся сведения об особенностях морфофункциональных изменений в почечной ткани при действии экстремальных стресс-факторов, а также свидетельствуют о перспективности применения клеточной терапии для их коррекции.

Ключевые слова: стресс, иммобилизация, мезенхимальные стволовые клетки, нефроны

EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE PARAMETERS OF PEROXIDATIVE OXIDATION OF LIPIDS AND ANTIOXIDANT PROTECTION OF BLOOD SERUM AND RENAL TISSUE OF RATS WITH ACUTE IMMOBILIZATION STRESS

Demyanenko E.V.¹, Luzin V.I.¹

¹State Institution «Lugansk State Medical University named after St. Luke», Lugansk, e-mail: elena.demjanenko2016@yandex.ua

Mesenchymal stem cells are increasingly being used as a means of cell therapy for various pathological conditions, including kidney disease. The aim of the study was to study the dynamics of changes in histomorphometric indicators of the main structural components of cortical and juxtamedullary nephrons of white rats, caused by the influence of acute immobilization stress, when intravenously administered mesenchymal stem cells of bone marrow origin. The study was performed on 195 male outbred white rats, whose weight was 200–250 grams, age 3–4 months. Stress was modeled by 24-hour immobilization in individual fixation chambers. Evaluation of the effectiveness of cell therapy was carried out on days 1, 3, 7, 14, 21, and 30 of the post-mobilization period. The study found that acute immobilization stress leads to significant morphological changes in the renal tissue (hemodynamic disorders, hypertrophy of the renal bodies, expansion of the space of the Shumlyansky-Bowman capsule, dilation of all types of tubules, hydropic epithelial dystrophy and desquamation of the calcium epithelium). Moreover, more pronounced changes in histomorphometric parameters were observed in the nephrons of the cortico-medullary zone. The use of mesenchymal stem cells of bone marrow origin was accompanied by a more rapid recovery of the morphological characteristics of the renal tissue in the rehabilitation period after the forced 24-hour immobilization compared with the control group. These studies complement the already available information about the features of morphofunctional changes in the renal tissue under the action of extreme stress factors, and also indicate the prospects of using cell therapy for their correction.

Keywords: stress, immobilization, mesenchymal stem cells, nephrons

В последнее десятилетие произошел бум исследований в сфере применения различных методов регенеративной медицины, направленных на восстановление формы и функции поврежденных тканей. Одним из перспективных терапевтических подходов является использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из костного мозга [1, 2]. Ведущими механизмами реализации репаративных, регенеративных и иммуномодулирующих свойств МСК считаются паракринная активность, которая включает секрецию биологически активных пептидов и гормоноподобных веществ; перенос митохондрий путем туннелирования нанотрубок или микровезикул; перенос РНК-содержащих микровезикул [1, 2]. Понимание закономерностей функционирования МСК создает значительные перспективы для применения клеточной терапии, а также для разработки новых клеточных терапевтических средств для регенеративной медицины [3, 4]. Однако в доступной литературе практически отсутствуют данные об использовании МСК в условиях действия экстремальных стресс-факторов на организм. Одним из таких факторов является вынужденная иммобилизация [5–7], которая сопровождает техногенные катастрофы, природные катаклизмы и течение некоторых заболеваний. Известно, что в патологический процесс при действии стресс-факторов вовлекаются почки [8] как одно из ключевых звеньев системы адаптации, что может привести к их повреждению [8, 9]. Таким образом, возникла необходимость изучения динамики метаболических и морфологических изменений в почечной ткани при применении методов клеточной терапии после экстремального воздействия физических факторов.

Цель исследования: изучить динамику изменений гистоморфометрических показателей кортикальных и юкстамедуллярных нефронов при 24-часовом иммобилизационном стрессе после внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения.

Материал и методы исследования. Исследование проведено с использованием 195 самцов беспородных белых крыс, масса которых составляла 200–250 граммов, возраст 3–4 месяца. Для выращивания культуры МСК вымывали питательной средой клетки костного мозга из полостей бедренных и большеберцовых костей крыс. Полученные клетки помещали в культуральные флаконы («CORNING», США) объемом 25 см², культивировали 14 дней в среде «ИГЛА-МЕМ» с L-глутамином («Биолот», Россия), 10%-ной телячьей эмбриональной сывороткой («Биолот», Россия) и антибиотиками в условиях CO₂-инкубатора HF15UV («Heal Force», Китай) со сменой ½ среды каждые 5 суток. Выраженные клеточные культуры экспрессировали типичные маркеры МСК: CD105, CD73, CD44, CD90, CD54. Стресс моделировали однократной 24-часовой иммобилизацией животных в индивидуальных фиксирующих камерах. Выделили три группы животных: № 1 – интактную, № 2 –

контрольную (иммобилизация без введения МСК), № 3 – экспериментальную (иммобилизация с однократным внутривенным введением по 5×10^6 МСК через 1 час после окончания иммобилизации). Животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки реадаптационного периода. Извлекали почки крыс и фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. После стандартной проводки заливали парафиновые блоки, из которых на микротоме МС-2 («Точмедприбор», Украина) изготавливали парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. Гистологические препараты исследовали на цифровом морфометрическом комплексе на базе микроскопа Olympus BX 41 с последующей фотосъемкой. Гистоморфометрический анализ осуществляли с помощью компьютерной программы «Image Java». Результаты обрабатывали программой «Statistica 10.0» с использованием критерия Манна–Уитни. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представлялись в виде медианы и интерквартильного размаха.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе гистологического и гистоморфометрического исследований почек установлено, что вынужденная 24-часовая иммобилизация приводит к значительным изменениям гистоморфометрических показателей как кортикальных, так и юкстамедуллярных нефронов, которые в значительной степени нивелируются внутривенным введением аллогенных МСК в постиммобилизационном периоде. Наиболее выраженные изменения гистоморфометрических показателей отмечались в 1-е и 3-и сутки после окончания иммобилизации.

Изменения как в кортикальных, так и в юкстамедуллярных нефронах преимущественно характеризовались гипертрофией почечных телец за счет полнокровия сосудистых клубочков (при этом наблюдалось расширение петель сосудистых клубочков, благодаря чему они приобретали «лапчатую» форму), расширением пространства между сосудами клубочка и капсулой нефрона (рис. 1–3). Кроме того, местами отмечались наличие нефронов с разрушенными тельцами и разрушенными капиллярными клубочками, спадение клеток висцеральных листков капсул нефронов. Указанные изменения, вероятно, обусловлены явлениями ишемии, возникающей в ответ на спазм приносящих артериол при централизации кровообращения в ответ на выброс катехоламинов при стрессе. Следует отметить, что вариабельность изменений в юкстамедуллярных нефронах была выше по сравнению с нефронами коркового вещества почек, что можно объяснить их активным участием в перераспределении тока крови в условиях стресса. Также отмечалась дилатация всех видов канальцев нефронов обоих типов (особенно в дистальном сегменте). Одновременно с этим наблюдались и патологические изменения в эпителиоцитах канальцевого аппарата нефронов: признаки гидропической дистрофии и вакуолизации

цитоплазмы, очаги колликативного некроза, отделение клеток почечного эпителия от стенок, скопление клеточного детрита в просветах канальцев. Также местами визуализировались признаки периканаликулярного отека. Кроме указанных изменений, в паренхиме почек крыс, перенесших 24-часовой иммобилизационный стресс, наблюдались выраженное полнокровие и плазматическое пропитывание стенок капилляров сосудистых клубочков, венозное полнокровие капилляров перитубулярной зоны, явления стаза, рассеянные диапедезные и мелкоочаговые кровоизлияния. В динамике все эти изменения постепенно нивелировались, однако в группе животных, пролеченных МСК, это происходило в более ранние сроки (рис. 1–3).

Рис. 1. А. Кортикальное вещество почки крысы интактной группы. Б. Кортико-медуллярная зона крысы интактной группы. В. Кортикальное вещество почки крысы контрольной группы на 3-и сутки после иммобилизации. Г. Кортико-медуллярная зона крысы контрольной группы на 3-и сутки после иммобилизации. Д. Кортикальное вещество крысы опытной группы на 3-и сутки после иммобилизации и введения МСК. Е. Кортико-медуллярная зона крысы опытной группы на 3-и сутки после иммобилизации и введения МСК. Окраска гематоксилин-эозином.

Увеличение x200

Согласно данным проведенного гистоморфометрического исследования с 1-х по 30-е сутки наблюдения у животных, перенесших 24-часовую иммобилизацию, отмечалось достоверное увеличение относительно интактных значений общей площади почечного

тельца на 44,32% ($p<0,001$), 53,61% ($p<0,001$), 52,53% ($p<0,001$), 42,37% ($p<0,001$), 26,32% ($p<0,001$) и 7,96% ($p<0,001$) соответственно, площади сосудистого клубочка соответственно на 35,74% ($p<0,001$), 43,32% ($p<0,001$), 41,93% ($p<0,001$), 33,58% ($p<0,001$), 22,27% ($p<0,001$) и 9,52% ($p<0,001$), площади капсулы нефрона соответственно на 127,78% ($p<0,001$), 155,55% ($p<0,001$), 152,39% ($p<0,001$), 137,76% ($p<0,001$), 56,77% ($p<0,001$) и 5,85% ($p<0,01$).

Рис. 2. А. Кортиковое вещество почки крысы контрольной группы на 14-е сутки после иммобилизации. Б. Кортико-медуллярная зона крысы контрольной группы на 14-е сутки после иммобилизации. В. Кортиковое вещество крысы опытной группы на 14-е сутки после иммобилизации и введения МСК. Г. Кортико-медуллярная зона крысы опытной группы на 14-е сутки после иммобилизации и введения МСК. Окраска гематоксилин-эозином.

Увеличение $\times 200$

Наружные диаметры извитых канальцев соответственно увеличились на 14,96% ($p<0,001$), 21,26% ($p<0,001$), 19,27% ($p<0,001$), 15,25% ($p<0,001$), 7,62% ($p<0,001$) (для проксимального сегмента) и 34,99% ($p<0,001$), 44,03% ($p<0,001$), 39,67% ($p<0,001$), 28,92% ($p<0,001$), 14,84% ($p<0,001$) (для дистального сегмента), достигая к 30-м суткам интактных цифр. В то же время значения высоты эпителиоцитов проксимальных и дистальных извитых канальцев кортикальных нефронов были достоверно ниже показателей крыс интактной группы в 1-е сутки наблюдения соответственно на 11,96% ($p<0,001$) и 11,98% ($p<0,001$), на 3-и сутки – на 18,58% ($p<0,001$) и 20,91% ($p<0,001$), на 7-е сутки – на 11,17% ($p<0,001$) и

14,42% ($p<0,001$), на 14-е сутки – на 9,2% ($p<0,001$) и 12,54% ($p<0,001$), на 21-е сутки – на 3,97% ($p<0,001$) и 5,19% ($p<0,001$). К 30-м суткам числовые значения изучаемых морфологических структур достигали показателей группы № 1. У животных, получавших инъекции МСК, в начальные сроки наблюдения отмечались сходные изменения гистоморфометрических параметров кортикальных нефронов, статистически не отличающиеся от показателей группы контроля.

Рис. 3. А. Кортикальное вещество почки крысы контрольной группы на 30-е сутки после иммобилизации. Б. Кортико-медуллярная зона крысы контрольной группы на 30-е сутки после иммобилизации. В. Кортикальное вещество крысы опытной группы на 14-е сутки после иммобилизации и введения МСК. Г. Кортико-медуллярная зона крысы опытной группы на 30-е сутки после иммобилизации и введения МСК. Окраска гематоксилин-эозином.

Увеличение $\times 200$

С 14-х по 30-е сутки эксперимента наблюдались статистически достоверные изменения показателей основных морфологических структур нефронов коркового вещества почек крыс опытной группы относительно контрольных значений. Так, показатели общей площади почечного тельца достоверно снизились на 14-е, 21-е и 30-е сутки наблюдения соответственно на 9,92% ($p<0,001$), 20,19% ($p<0,001$) и 7,3% ($p<0,001$), площади сосудистого клубочка – соответственно на 5,16% ($p<0,001$), 19,3% ($p<0,001$), 8,75% ($p<0,001$), площади капсулы нефрона – на 32,83% ($p<0,001$), 32,77% ($p<0,01$) и 5,25% ($p<0,001$), наружный

диаметр проксимальных канальцев – соответственно на 4,12% ($p<0,001$), 4,22% ($p<0,001$) и 2,18% ($p<0,001$), наружный диаметр дистальных извитых канальцев – соответственно на 10,73% ($p<0,001$) и 12,71% ($p<0,001$), а к 30-м суткам наблюдения статистически не отличался от значений групп № 1 и № 2. Высоты эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев кортикальных нефронов крыс опытной группы были выше контрольных значений на 14-е сутки соответственно на 3,1% ($p<0,001$) и 3,09% ($p<0,001$), на 21-е сутки – соответственно на 4,38% ($p<0,001$) и 5,06% ($p<0,001$), на 30-е сутки статистически не отличались от показателей животных интактной и контрольной групп.

При оценке гистоморфометрических показателей структур юкстамедуллярных нефронов было установлено, что после моделирования экспериментального стресса они были максимально выражены на 3-и сутки постиммобилизационного периода как в контрольной, так и в опытной группах. Так, у экспериментальных животных групп № 2 и № 3 в 1-е и 3-и сутки наблюдения значения общей почечного тельца возросли относительно интактных цифр соответственно на 57,26% ($p<0,001$) и 5,99% ($p<0,001$), площади сосудистого клубочка – на 43,22% ($p<0,001$) и 43,87% ($p<0,001$), площади пространства капсулы нефрона – на 211,64% ($p<0,001$) и 200,16% ($p<0,001$), диаметра проксимального извитого канальца – на 26,15% ($p<0,001$) и 26,56% ($p<0,001$), диаметра дистального извитого канальца – на 60,57% ($p<0,001$) и 60,83% ($p<0,001$). Также отмечалось снижение высоты эпителиальных клеток как в проксимальных (соответственно на 24,09% ($p<0,001$) и 23,66%, ($p<0,001$)), так и в дистальных (соответственно на 34,25% ($p<0,001$) и 34,28%, ($p<0,001$)) отделах почечных канальцев. При этом в начальные сроки наблюдения между показателями групп № 2 и № 3 какая-либо статистическая разница отсутствовала. Начиная с 7-х суток исследования отмечалась постепенная нормализация изучаемых параметров, однако у животных, пролеченных МСК, темпы их восстановления были более быстрыми по сравнению с группой контроля. Так, на 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки эксперимента показатели группы животных, получавших клеточную терапию, были достоверно снижены по сравнению с контрольными значениями при оценке общей площади почечного тельца соответственно на 4,84% ($p<0,05$), 12,56% ($p<0,001$), 17,22% ($p<0,001$) и 9,05% ($p<0,001$), площади сосудистого клубочка – соответственно на 5,26% ($p<0,01$), 6,5% ($p<0,001$), 15,6% ($p<0,01$) и 4,63% ($p<0,01$), площади капсулы нефрона – на 8,19% ($p<0,001$), 30,71% ($p<0,001$), 25,09% ($p<0,001$) и 30,14% ($p<0,001$), диаметра наружного просвета проксимального извитого канальца – соответственно на 2,82% ($p<0,001$), 2,96% ($p<0,001$), 5,79% ($p<0,001$) и 1,36% ($p<0,001$), диаметра наружного просвета дистального извитого канальца – соответственно на 5,06% ($p<0,001$), 11,76% ($p<0,001$), 13,45% ($p<0,001$) и 1,13% ($p<0,05$). Что касается значений высоты эпителиоцитов канальцев юкстамедуллярных нефронов крыс

опытной группы, то с 7-х по 21-е сутки наблюдения они увеличивались относительно цифр группы контроля в проксимальных отделах на 1,43% ($p<0,05$), 2,92% ($p<0,001$) и 7,15% ($p<0,001$), в дистальных отделах – соответственно на 4,33% ($p<0,001$), 4,88% ($p<0,001$) и 7,26% ($p<0,001$), а на 30-е сутки статистически от них не отличались.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о более быстрых темпах восстановления изучаемых параметров морфологических структур почечной ткани при применении мезенхимальных стволовых клеток в условиях моделируемого эксперимента, что, вероятно, обусловлено их паракринными эффектами, направленными на ингибирование апоптоза, поддержку регенерации и стимуляции, пролиферацию и дифференцировку тканеспецифических предшественников [1, 2, 4].

Заключение. Действие вынужденной 24-часовой иммобилизации приводит к гемодинамическим расстройствам в почечной ткани и значительным изменениям морфологических показателей нефронов обоих типов, проявляющихся гипертрофией почечных телец, расширением пространства капсулы Шумлянско-Боумана, дилатацией всех видов канальцев, гидропической дистрофией эпителиоцитов и десквамацией кальциевого эпителия. Явления дилатации были более выражены в дистальных отделах. При этом в юкстамедуллярных нефронах изменения гистоморфометрических параметров были более выражены. Применение аллогенных мезенхимальных стволовых клеток после вынужденной 24-часовой иммобилизации способствовало ускорению процессов восстановления гистоморфометрических показателей у животных опытной группы по сравнению с группой контроля.

Список литературы

1. Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016. 7. P. 125. DOI: 10.1186/s13287-016-0363-7.
2. Burdon T.J., Paul A., Noiseux N., Prakash S., Shum-Tim D. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Journal of Bone Marrow Research*. 2011. Vol. 11. P.1-14.
3. Кирпатовский В.И. Возможности клеточной терапии в восстановлении нарушенной функции органов мочеполовой системы // *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии*. 2016. № 1 (56). С.60-67.
4. Reinders M.E, Fibbe W.E., Rabelink T.J. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010. Vol. 25. P. 17-24.

5. Кузьменко Е.В. Современные представления о проявлениях механизмов психоэмоционального стресса // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2013. Т. 26. № 65 (2). С. 95-106.
6. Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2000. № 2. С. 24-31.
7. Фомочкина И.И., Харченко В.З., Кубышкин А.В. Механизмы развития и патогенетическая коррекция стресс-синдрома // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения: Труды Крымского государственного медицинского университета имени С.И. Георгиевского. 2006. Т. 142. Ч. III. С. 159-164.
8. Тупикин В.Д., Родзаевская Е.Б., Уварова И.А., Шорина Л.Н. Гисто-функциональная характеристика кортикальных и околомозговых нефронов почки при реакции на экспериментальный стресс // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13 (4). С. 58-65.
9. Коптев М. М., Пронина О. М., Билаш С. М., Пирог-Заказникова А. В., Николенко Д.Е. Морфологическая характеристика почек крыс, подвергшихся воздействию острого иммобилизованного стресса // Клиническая анатомия и оперативная хирургия. 2016. Т. 15 (1) .С. 39-41 (на укр. яз.).