

## EXPERIMENTAL STUDY OF THE INFLUENCE OF «MIGREPINE» ON THE KIDNEYS

A.O. Syrova, T.V. Zviahintseva

**Abstract.** A study of the chronic toxicity of a new combined domestic anti-inflammatory drug “Migrepine” has shown that a prolonged (30 days) regular (everyday) introduction of the drug to rats (the dose is 2 g/kg) did not cause a negative effect on the renal function. This fact was also confirmed by pathomorphological researches. The new domestic combined drug “Migrepine” does not influence on the general state and function of the kidneys in a chronic experiment (30 days).

**Key words:** non-steroidal anti-inflammatory drugs, combined drug “Migrepine”, kidneys.

National Medical University (Kharkov, Ukraine)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 2. – P. 208-210

Надійшла до редакції 05.06.2012 року

© Г.О. Сирова, Т.В. Звягінцева, 2012

УДК 616.72-002:578.591.6:59.08

В.М. Сірман

## МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ЕМБРІОНА ЩУРА НА НИРКИ ПРИ АД'ЮВАНТНОМУ АРТРИТІ ПІРСОНА

ДП Український НДІ медицини транспорту МОЗ України, м. Одеса  
Координаційний центр трансплантації органів і тканин МОЗ України, м. Київ, Україна

**Резюме.** У роботі наводяться дані щодо розвитку порушень нирок впродовж 12 місяців після моделювання артриту Пірсона, які спостерігаються як з боку клубочків, так і каналців (зменшення швидкості клубочкової фільтрації та каналцевої реабсорбції натрію, протеїнурия). Уведення щуром з експериментальним

артритом ембріональних прогеніторних клітин нормалізує функціональний стан нирок із відновленням функції клубочків та каналців.

**Ключові слова:** прогеніторні клітини ембріона, артрит Пірсона, нефропатія.

**Вступ.** Відомо, що при ревматоїдному артриті спостерігаються порушення функції нирок, які виявляються і при експериментальному артриті у щурів [1]. Механізм цих порушень пов'язують з імунними пошкодженнями, які виходять за межі тканин суглобів [7]. Ці порушення можуть стати початком формування хронічної хвороби нирок із переходом у хронічну ниркову недостатність. У зв'язку з цим вельми актуальним є пошук патогенетично обґрунтованих технологій і засобів запобігання ускладненням запальних процесів у суглобах. В останній час особливу увагу викликає використання стовбурових клітин для лікування тяжких запальних процесів із системними проявами та порушеннями [2, 6]. У нашій лабораторії розроблено технологію отримання ембріональних плюрипотентних клітин від вагітних щурів та їх використання в експериментальній терапії широкого кола захворювань [4, 5].

**Мета дослідження.** Встановлення ефективності використання стовбурових клітин при експериментальному артриті в експерименті і вивчення можливих механізмів їх дії при ускладненні нефропатією.

**Матеріал і методи.** Досліди проведені на 189 самцях-щурах, у яких викликали артрит Пірсона протягом 12 місяців розвитку патології. Для

моделювання артриту використовували введення повного ад'юванта Фрейнда в апоневроз правої задньої кінцівки щурів під ефірним наркозом. Через три тижні щурам дослідної групи під нембуталовим наркозом (40 мг/кг маси тіла) в яремну вену вводили суспензію ембріональних прогеніторних клітин у середовищі RPMI або розчині Хенкса. Тваринам групи порівняння вводили відповідний об'єм середовища RPMI або розчину Хенкса. Контрольну групу склали 11 щурів, яким замість повного ад'юванта Фрейнда в апоневроз правої задньої кінцівки вводили 0,1 мл вазелінового масла.

Для виділення ембріональних прогеніторних клітин вагітних самок вводили в наркоз (натрію етамінал – 40 мг/кг маси тіла) на 11-13-й стадіях розвитку ембріонів за методом Астаурова. Після асептичної обробки операційного поля (96° етиловий спирт, йод) виконували серединну лапаротомію за *linea alba*. Обидва роги матки виводили в операційну рану і розрізали стерильними ножицями впоперек (біля ембріонів). Останні вилушували в стерильну чашку Петрі з охолодженням до 4°C середовищем Хенкса з гентаміцином (кінцева концентрація – 0,001 %). Після потрібної промивки з ембріонів виділяли ембріональні прогеніторні клітини за розробленою нами методикою

[5]. Суспензію ембріональних прогеніторних клітин профільтрували через капроновий фільтр (200 мкм). Контроль життєздатності клітин здійснювали шляхом світлової мікроскопії при забарвленні клітин трипановим синім. Щурам з артритом дослідної групи ембріональні прогеніторні клітини вводили в яремну вену (венесекція під нембуталовим наркозом: натрію етамінал, 40 мг на 1 кг маси тіла) у дозі  $3,5 \times 10^7$ /мл на 0,1 кг маси тіла. Декапітацію щурів здійснювали під нембуталовим наркозом (натрію етамінал, 40 мг на 1 кг маси тіла). Виділяли кортикальну тканину нирок, яку відразу заморожували в рідкому азоті для біохімічних досліджень. Визначення досліджуваних біохімічних параметрів проводили в гомогенатах кортикальної тканини нирок із перерахунком отриманих показників на одиницю маси вологої тканини або білка за методом Лоурі.

Визначення вмісту цитокінів у кірковій речовині нирок щурів проводили імуноферментним методом за допомогою реактивів "Rat IL-4 ELISA kit", "Rat IFN $\gamma$  ELISA kit", "Rat TNF $\alpha$  ELISA kit" (DiaCione, Франція), "Rat IL-6", "Rat IL-12", "Rat IL-10", "Rat IL -2" (BioSource Int., США), "R&D Systems. Quantikine<sup>TM</sup> – TGF $\beta_1$ " (США). Екстракцію цитокінів проводили на мікроколонках C<sub>2</sub> Amprep<sup>TM</sup> (Велика Британія) з реєстрацією показників світлопоглинання на ридері "Уніплан-М" (Росія).

Функцію нирок вивчали в умовах індукованого водного діурезу. Швидкість клубочкової фільтрації (GFR) розраховували за кліренсом ендogenous креатиніну:  $GFR = (V \times U_{cr}) / P_{cr}$ , де V – об'єм сечі,  $U_{cr}$  – концентрація креатиніну в сечі,  $P_{cr}$  – у плазмі крові. Здатність нирок концентру-

вати та розводити сечу оцінювали за концентраційним індексом ендogenous креатиніну ( $U_{cr}/P_{cr}$ ) і концентраційним індексом іонів натрію ( $UNa^+ : PNa^+$ ), де  $UNa^+$  – концентрація іонів натрію в сечі,  $PNa^+$  – концентрація іонів натрію в плазмі крові. Для інтегральної оцінки транспорту іонів натрію в нирках використовували показники екскреції ( $ENa^+ = UNa^+ \times V$ ) і кліренсу іонів натрію ( $CNa^+ = ENa^+ : PNa^+$ ). Реабсорбцію води визначали за формулою:  $KH_2O = [(GFR - V) : GFR] \times 100 \%$ . Показники функції нирок стандартизували шляхом перерахунку їх абсолютних величин на одиницю маси тіла тварини або об'єму клубочкового фільтрату. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за програмою «БіоСтат» з визначенням t-критерію Стьюдента.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Встановлено, що у щурів з артритом Пірсона вже через два місяці виявляються ознаки нефропатії, які прогресували протягом 12 місяців спостереження. Вони були зумовлені як порушеннями з боку клубочків (зменшувалася швидкість клубочкової фільтрації), так і каналців (зменшувалася реабсорбція іонів натрію та води) з одночасною протеїнурією і є ознаками розвитку нефропатії [3].

Зміни функціональних показників нирок супроводжуються морфологічними ознаками пошкодження: гіпотрофія та некроз клубочків і зерниста дистрофія з некробіозом епітеліоцитів, одночасно виявлено збільшення в нирках прозапальних цитокінів (інтерлейкінів 2,12 і фактору некрозу пухлини  $\alpha$ ) поряд із дисбалансом із протизапальним (інтерлейкіни 4, 6, 10 та фактор трансформуючого росту). Уведення щурам з експериментальним артритом ембріональних проге-

Таблиця 1

#### Порівняльний аналіз динаміки деяких показників іонорегулювальної функції нирок досліджуваних груп щурів з ад'ювантним артритом Пірсона ( $x \pm Sx$ )

Показник	Досліджувані групи	Термін від початку моделювання артриту Пірсона			
		2 місяці	4 місяці	6 місяців	12 місяців
Концентраційний індекс іонів натрію, од.	Артрит	0,178 $\pm$ 0,028 n=11	0,063 $\pm$ 0,007 n=11	0,153 $\pm$ 0,009 n=25	0,243 $\pm$ 0,015 n=25
	Артрит + ЕПК	0,087 $\pm$ 0,005 n=15 p<0,01	0,045 $\pm$ 0,006 n=11 p>0,06	0,066 $\pm$ 0,004 n=30 p<0,001	0,054 $\pm$ 0,003 n=30 p<0,001
Кліренс іонів натрію, мл за 2 год	Артрит	0,277 $\pm$ 0,041 n=11	0,158 $\pm$ 0,013 n=11	0,265 $\pm$ 0,036 n=25	0,330 $\pm$ 0,018 n=25
	Артрит + ЕПК	0,228 $\pm$ 0,010 n=15 p>0,1	0,139 $\pm$ 0,017 n=11 p>0,3	0,197 $\pm$ 0,011 n=30 p>0,05	0,182 $\pm$ 0,008 n=30 p<0,001
Кліренс безнатрієвої води, мл за 2 год	Артрит	1,35 $\pm$ 0,11 n=11	2,44 $\pm$ 0,12 n=11	1,48 $\pm$ 0,07 n=25	1,03 $\pm$ 0,08 n=25
	Артрит + ЕПК	2,38 $\pm$ 0,10 n=15 p<0,001	3,01 $\pm$ 0,19 n=11 p<0,05	2,78 $\pm$ 0,13 n=30 p<0,001	3,21 $\pm$ 0,09 n=30 p<0,001

Примітка. ЕПК – ембріональні прогеніторні клітини; p – ступінь вірогідності різниць показників у досліджуваних групах тварин; n – кількість тварин у групі

ніторних клітин нормалізувало функціональний стан нирок (табл. 1).

Наведені данні свідчать, що клубочкова фільтрація практично нормалізується до чотирьох місяців, збільшується діурез, зменшується протеїнурія. Одночасно збільшується реабсорбція іонів натрію в каналцях. Поряд із ним показано, що в нирках зменшується вміст прозапальних цитокінів (інтерлейкінів 2, 12 і фактору некрозу пухлини  $\alpha$ ) – у 6,4 та 4,9 раза через 12 місяців з одночасним збільшенням протизапальних цитокінів.

Отримані дані дозволяють припустити, що нефропатія, яка виникає при експериментальному артриті Пірсона, пов'язана з нефротоксичною дією прозапальних цитокінів та усувається за допомогою уведення препарату стовбурових клітин унаслідок нормалізації вмісту цитокінів у нирках.

#### Висновки

1. У патогенезі нефропатії при експериментальному артриті Пірсона важлива роль належить прозапальним цитокінам.

2. Ембріональні стовбурові клітини щурів покращують перебіг нефропатії при експериментальному артриті, нормалізуючи обмін цитокінів.

**Перспективи подальших досліджень.** Розробка лікувальної технології з використанням стовбурових клітин у терапії.

#### Література

1. Баженов А.Н. Ревматоидный артрит и остеопороз / А.Н. Баженов, В.В. Трусов // *Клин. мед.* – 1998. – № 7. – С. 15-20.
2. Борис Р.М. Механізми терапевтичної дії стовбурових клітин ембріонального походження

при експериментальному колоногенному перитоніті: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологія»/ Р.М. Борис. – Луганськ, 2011. – 16 с.

3. Гоженко А.И. Энергетическое обеспечение основных почечных функций в норме и при повреждении почек: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук: спец. 14.03.05 «Патологічна фізіологія»/ А.И. Гоженко. – К., 1987. – 38 с.
4. Кухарчук О.Л. Ембріональні прогеніторні клітини молекули МНС, апоптоз та імунологічна толерантність / О.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, В.М. Сірман // *Трансплантологія.* – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 221-223.
5. Пат. 72796 Україна, МПК С 12 №5/06. Спосіб отримання життєздатних ембріональних плюрипотентних клітин за допомогою колагенази / Сірман В.М., Кухарчук О.Л., Радченко В.В., № 20022697445; опубл. 15.04.05, Бюл. № 4.
6. Cell therapy using allogenic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis / P. Tasso, S.M. Negrini [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 56, № 4. – P. 1175-1186.
7. Bettelli E. Th-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity / E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo // *Nat. Immunol.* – 2007. – № 8. – P. 345-350.
8. Cao Y. IL-27 induces FR1 immuno response and susceptibility to experimental arthritis / P.D. Doocles, T.T. Glant, A. Finnegan // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, № 2. – P. 922-930.

## МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНА КРЫСЫ НА ПОЧКИ ПРИ АДЬЮВАНТНОМ АРТРИТЕ ПИРСОНА

*В.Н. Сирман*

**Резюме.** В работе приводятся данные по развитию нарушений почек на протяжении 12 месяцев после моделирования артрита Пирсона, которые наблюдаются как со стороны клубочков так и каналцев (снижение скорости клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции натрия, протеинурия). Введение крысам с экспериментальным артритом эмбриональных прогениторных клеток нормализует функциональное состояние почек с восстановлением функции клубочков и каналцев.

**Ключевые слова:** прогениторные клетки эмбриона, артрит Пирсона, нефропатия.

## MECHANISMS OF THE INFLUENCE OF THE PROGENITOR CELLS OF THE RAT EMBRYO ON THE KIDNEYS IN PEARSON'S ADJUVANT ARTHRITIS

*V.M. Sirman*

**Abstract.** The paper presents the data dealing with the development of renal abnormalities over a period of 12 months following a simulation of Pearson's arthritis that are observed both on the side of glomeruli and tubules (a decrease of the glomerular filtration and tubular reabsorption of sodium, proteinuria). The injection to the rats with experimental arthritis of the embryonal progenitor cells normalizes the functional state of the kidneys with a recovery of the function of the tubules and glomeruli.

**Key words:** embryonal progenitor cells, Pearson's arthritis, nephropathy.

SE "Ukrainian Research Institute of Transport Medicine" of Ukraine's MHC (Odessa, Ukraine)  
Coordination Center for Organs, Cells and Tissues Transplantation of Ukraine's MHC (Kyiv, Ukraine)

Рецензент – проф. Ю.С. Роговий

*Buk. Med. Herald.* – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 2. – P. 210-212