

For citation: Onischenko N.A., Mesherin S.S., Alekseeva L.S., Sevastyanov V.I. The model of chronic transplantational nephropathy. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(2): 112—117. (In Russian).

For correspondence: *Sergey S. Meshcherin*, chief of the donor surgery department Federal State Budgetary Institution «Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation, e-mail: ssergeevi4@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Acknowledgments. None.

Information about authors:

Meshcherin S.S., <http://orcid.org/0000-0001-5700-7906>

Received 20.02.16

Введение

Общепризнано, что основной причиной утраты почечных трансплантатов на отдаленных сроках является прогрессирующая хроническая трансплантационная нефропатия (ХТН) [1—3], морфологические признаки которой (тубулоинтерстициальный склероз, тубулярная атрофия и гломерулопатия) начинают формироваться уже к концу первого года после трансплантации у 94,2% реципиентов [4]. Полагают [5], что развитию ХТН способствуют 3 группы факторов: продолжающаяся активность иммунных реакций на аллоантигены трансплантата, нефротоксический эффект иммуносупрессивных препаратов (ингибиторов кальциневрина) и действие на трансплантат различных факторов, не связанных с иммуносупрессией. Не отрицая значения всех вышеперечисленных факторов как способствующих развитию ХТН, нами сделано предположение, что ведущая и патогенетически важная роль в развитии и прогрессировании ХТН принадлежит 2 биологически-значимым факторам: фактору децентрализации (денервации-делимфатизации) трансплантата, способствующему развитию местного иммунного воспаления, и фактору спонтанной активации процессов регенерации, которые взаимодействуют в организме реципиента в течение всего посттрансплантационного периода и повышают чувствительность трансплантата к повреждающему действию различных специфических и неспецифических факторов. Между тем, значению этих общебиологических факторов в развитии ХТН при трансплантации почки до сих пор не уделяется должного внимания. Доказательства ведущей патогенетической роли факторов децентрализации (денервации-делимфатизации) почки и спонтанной активации процессов регенерации в ускоренном развитии ХТН могут быть получены лишь путем моделирования этих факторов в условиях ауто трансплантации почки (АТП), исключающей влияние на результаты фактора иммуногистонесовместимости. Однако такая модель на мелких лабораторных животных, удобных для выполнения хронического эксперимента, отсутствует.

Цель работы — создание модели ускоренного развития ХТН у крыс в условиях АТП.

Методика

Исследование проведено на 80 крысах-самцах Вистар с исходной массой 120—160 г. Содержание лабораторных животных и все манипуляции с ними выполнялись в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях», Страсбург, Франция (1986) и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003).

Выполнено 4 группы хронических экспериментов. 1-ю группу (n = 25) составили крысы с нефрэктомией левой почки и ауто трансплантацией правой почки (АТП) (контроль-1); во 2-ю группу были включены крысы (n = 25), которым через 35—40 сут. после нефрэктомии левой почки и моделирования АТП правой, вводили однократно в хвостовую вену аутологичные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) в дозе 3,0—5,0 × 10⁶ клеток для активизации процессов регенерации в децентрализованной почке (модель ХТН). Указанную дозу обычно используют в эксперименте для индукции репаративной регенерации почек при их остром или хроническом повреждении, но без нарушения целостности системы их нейро-иммуно-гуморальной регуляции [6]. 3-ю группу (n = 15) составили интактные животные (контроль-2). В 4-й группе интактным животным внутривенно однократно вводили МСК КМ как и во 2-й группе в дозе 3,0—5,0 × 10⁶ клеток (контроль-3). Моделирование АТП в 1-й и 2-й группах включало 2 этапа:

1. Под ингаляционным эфирным наркозом выполняли срединную лапаротомию, иссекали левую почку, затем правую почку хирургически децентрализовывали — проводили денервацию и делимфатизацию. Для этого правую почку выделяли из забрюшинных тканей, тупым и острым путем выполняли прецизионную дис-

секцию нервных и лимфатических путей в области ворот почки, что достигалось не только путем хирургического разрушения и удаления адвентиции и клетчатки, окутывающих почечную артерию, вену и мочеточник в области ворот почки, но и путем частичной хирургической

чекской декапсуляции почки в области ворот и до зоны, включающей ее полюса в радиусе 7—10 мм.

2. Спустя 7—10 сут. после хирургического вмешательства животных иммунизировали трехкратным введением водно-солевого раствора почечного аутоантигена. Для этого готовили экстракт из целой удаленной левой аутологичной почки в 3—4 мл физиологического раствора, смешивали с неполным адъювантом Фрейнда в отношении 1:1. Экстракт вводили в подкожную клетчатку 4 лапок три раза через каждые 7—10 сут. (по 1,8—2,0 мл смеси водно-солевого раствора антигена с адъювантом Фрейнда в отношении 1:1 с суммарным содержанием белка 35 мг/мл).

Моделирование ХТН осуществляли во 2-й группе крыс через 7—10 сут. после завершения иммунизации или через 35—40 сут. после моделирования АТП. Для этого под эфирным наркозом внутривенно (в хвостовую вену) вводили заранее выделенные культивированные МСК аутологичного КМ в количестве $3,0—5,0 \times 10^6$ клеток в 1 мл физиологического раствора. Заготовку аутологичного КМ проводили за 1 нед. до моделирования АТП под эфирным наркозом из костномозгового канала двух бедренных костей. Очистку и получение культуры МСК КМ осуществляли по [7]. Кроме животных 2-й группы, МСК КМ в той же дозе вводили крысам 4-й группы (контроль-3).

На сроках 1, 3, 5 и 7 мес. после моделирования АТП во всех группах проводили в динамике исследование суточного диуреза, рассчитывали экскрецию натрия с мочой, определяли содержание белка в суточной моче по Лоури, а также содержание креатинина и мочевины в плазме крови общепринятыми лабораторными методами. Кроме того, проводили морфологические исследования кусочков ткани почек, фиксированных в 10% нейтральном формалине и залитых в парафин по общепринятой методике. Депарафинизированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Маллори. Статистическую обработку результатов биохимических исследований производили на персональном компьютере с использованием специального статистического пакета Biostat. Статистическую значимость в сравниваемых группах оценивали по критерию t Стьюдента, при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование показателей азотовыделительной функции почек в всех контрольных группах опыта в течение 1—7 мес. позволило установить, что децентрализованные почки крыс в 1-й и 2-й группах так же, как почки животных других групп в течение всего периода наблюдений сохраняют свою основную гоме-

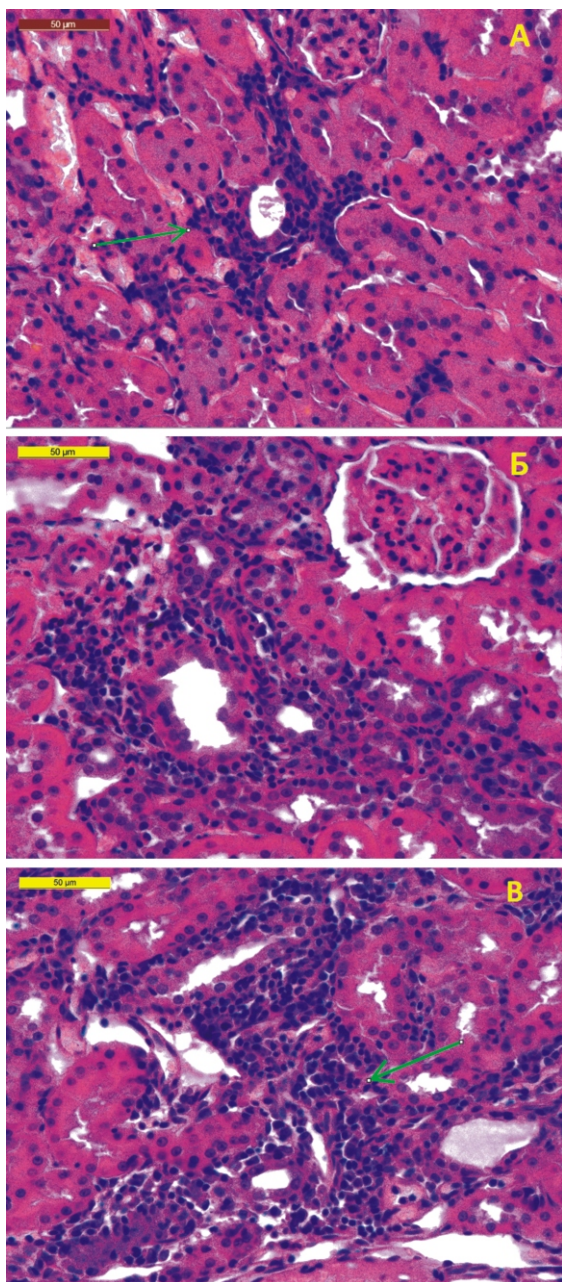


Рис. 1. Морфологические изменения в корковом слое почки через 3 мес. после моделирования АТП без (А — контроль) и с однократным введением МСК КМ (Б и В). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 400$:

А — редкие очаги инфильтрации полинуклеарными клетками;
Б — различная степень повреждения лимфоцитами стенки канальцев;
В — интенсивная воспалительная инфильтрация.

остатическую функцию: уровень креатинина и мочевины в крови поддерживается в пределах референтных значений. Между тем, некоторые канальцевые функции почек крыс 1-й и 2-й групп по сравнению с исходными значениями и значениями показателей в 3-й группе (контроль 2) были нарушены (таблица): повышена экскреция натрия с мочой, причем во 2-й группе она была повышена в значимо большей степени, чем в 1-й. Примечательно, что в 1-й, и особенно во 2-й группе на всех сроках наблюдения имела место прогрессирующая протеинурия, которая была более выражена во 2-й группе, где к 7-му мес. она достигала $12,6 \pm 2,4$ мг/сутки/100 г массы, а к 10-му мес. — $15,1 \pm 1,4$ мг/сутки/100 г. В 3-й группе (контроль 2) статистически значимых отклонений от исходного (фоновая) уровня обнаружено не было, а в 4-й группе (контроль 3) белок в моче вообще не был обнаружен.

Более выраженные нарушения канальцевых (экскреция натрия) и клубочковых (протеинурия) функций во 2-й группе опытов были подтверждены при морфологическом исследовании почек. У крыс 1-й группы (рис. 1) через 3 мес. в почках отмечается незначительно выраженное полнокровие капилляров и редкие очаги инфильтрации коркового слоя почек клетками воспалительного ряда (рис. 1, А).

В то же время в почках крыс 2-й группы на этом сроке значительно чаще встречаются очаги интенсивной клеточной инфильтрации (рис. 1, Б, В). Через 5 мес. морфологические признаки ХТН в почках крыс 2-й группы нарастают: в клубочках выявляется неравномерность кровенаполнения капилляров, пролиферация эндотелиальных и мезангиальных клеток, инфильтрация клубочков воспалительными клетками. Эпителий извитых канальцев и собирательных трубочек в состоянии белковой дистрофии; часть клубочков и канальцев рас-

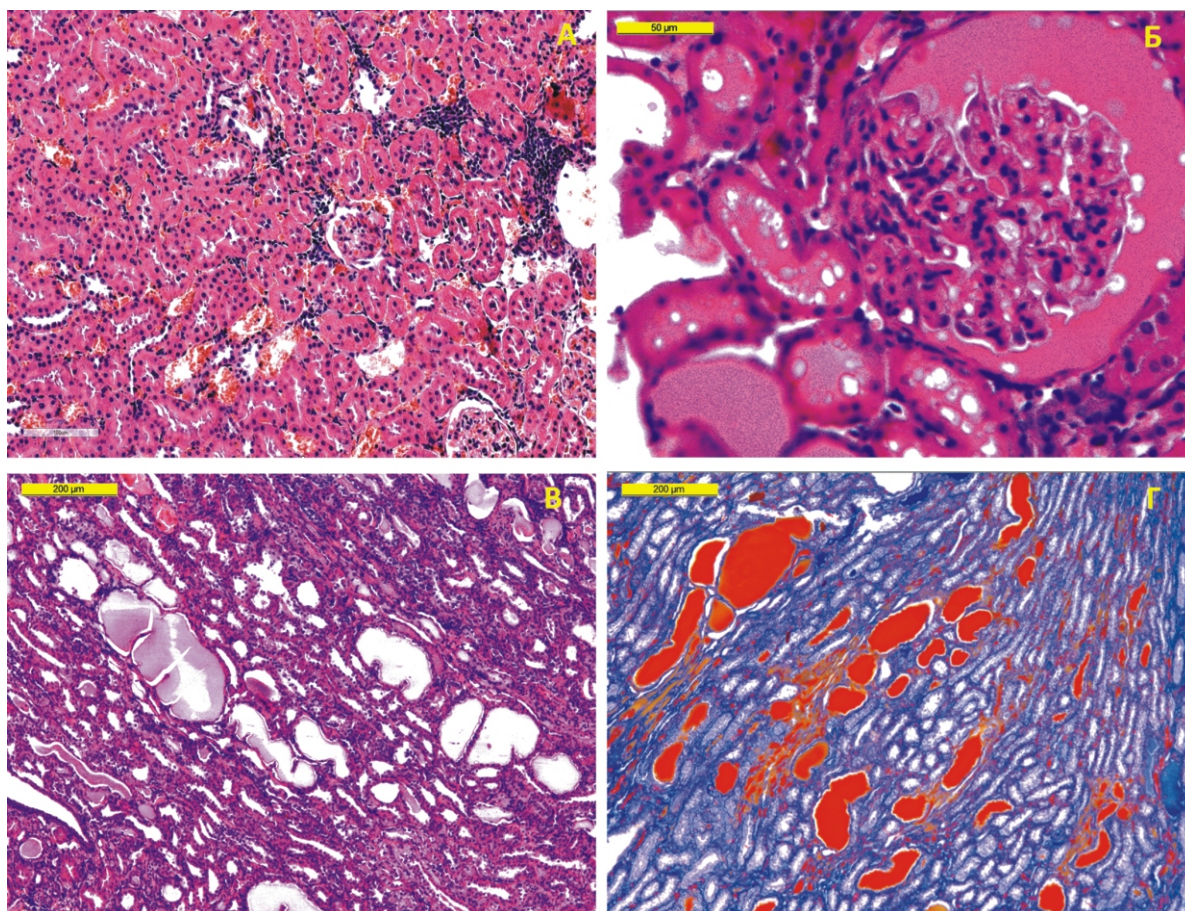


Рис. 2. Морфологические изменения в почке через 7 мес. после моделирования АТГ без (А — контроль) и с однократным введением МСК КМ (Б, В, Г). — Окраска гематоксилин эозином (А, Б, В) и по Маллори (Г). Ув. X100 (А, В, Г) и X400 (Б):

А — очаговая воспалительная инфильтрация; Б — скопление белкового ультрафильтрата в просвете расширенной капсулы клубочка; В — кистозно-расширенные канальцы с белковым ультрафильтратом («щитовидная» почка); Г — большое количество белка в просвете собирательных трубочек мозгового слоя почки.

Некоторые показатели выделительной функции почек
при динамическом наблюдении в разных экспериментальных группах (M ± m)

Показатели	Группы	Исходные значения	Сроки наблюдения (месяцы)			
			1	3	5	7
Диурез, мл/сут./100 г	I (контроль 1)	2,2 ± 0,15	3,25 ± 0,4	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,35	2,0 ± 0,3
	II		4,8 ± 0,7 ^{х)}	3,2 ± 0,20 ^{х)}	2,15 ± 0,2	1,76 ± 0,2 ^{х)}
	III (контроль 2)		2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1
	IV (контроль 3)		2,45 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Экскреция натрия с мочой, ммоль/сут./100 г	I (контроль 1)	0,15 ± 0,05	0,29 ± 0,01 ^{х)}	0,30 ± 0,02 ^{х)}	0,29 ± 0,05 ^{х)}	0,29 ± 0,02 ^{х)}
	II		0,26 ± 0,07 ^{х)}	0,40 ± 0,04 ^{х),0)}	0,41 ± 0,05 ^{х),0)}	0,41 ± 0,0 ^{5х),0)}
	III (контроль 2)		0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,04
	IV (контроль 3)		0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,08
Экскреция белка с мочой, мг/сут./100 г	I (контроль 1)	0,5 ± 0,4	1,7 ± 0,3 ^{х)}	2,2 ± 0,7 ^{х)}	3,2 ± 0,2 ^{х)}	3,6 ± 0,5 ^{х)}
	II		1,6 ± 0,05 ^{х)}	7,2 ± 0,1 ^{х),0)}	10,3 ± 2,7 ^{х),0)}	12,6 ± 2,4 ^{х),0)}
	III (контроль 2)		0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,3
	IV (контроль 3)		—	—	—	—

Примечание. ^{х)} — $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем; ⁰⁾ — $p < 0,05$ по сравнению с контролем 1 на том же сроке исследования

ширена, выстлана уплощённым эпителием и заполнена гомогенной белковой эозинофильной жидкостью.

К 7-му месяцу у крыс 2-й группы количество клубочков и канальцев, содержащих белковый ультрафильтрат (типа белка Тамма—Хорсфила), нарастает: выявляется в клубочках (рис. 2, Б), в просвете извитых канальцев коркового слоя (рис. 2, В) и в собирательных трубочках мозгового слоя (рис. 2, Г), что создаёт морфологическую картину «щитовидной» почки. У крыс 2-й группы на этом сроке в почках сохраняются также умеренно выраженные перитубулярные и перигломерулярные лимфоцитарные инфильтраты, что позволяет считать их проявлением развивающегося перигломерулярного и перитубулярного склероза. Однако, в почках крыс 1-й группы к 7-му месяцу признаки деструкции не нарастали (рис. 2, А), а при динамическом исследовании почек во 2-й и 4-й группах каких-либо отклонений от нормы нам вообще выявить не удалось. Из представленных результатов следует, что сама по себе модель АТП не вызывает глубоких структурных изменений в почках в указанные сроки наблюдения и, очевидно, поэтому фактору децентрализации трансплантата до сих пор в клинике не уделяется должного внимания. Между тем, во 2-й группе морфологические признаки ХТН становились отчетливо выраженными, прогрессировали и были аналогичны тем, которые возникают, при аллогенной трансплантации на отдаленных сроках [2—4] на фоне длительного применения иммуносупрессивных препаратов или при воздействии на почку других факторов. Децентрализация почки при АТП, таким образом, является фактором, сенси-

билизирующим ткань почки, а при длительном применении препаратов (например, иммуносупрессоров) даже в терапевтически допустимых дозах — становится фактором их ускоренного токсического повреждения. Об определяющей роли фактора ненарушенной иннервации в нормализации метаболических процессов в почке с фиброзирующим процессом при введении МСК КМ свидетельствуют результаты опытов Alfaraño и соавт. (2012) [8].

Вышеизложенное позволяет заключить, что моделирование у крыс АТП путем её децентрализации и индукции воспаления в сочетании с однократным введением терапевтической дозы аутологических МСК КМ позволяет к 3—5 мес. создать модель ХТН. Показано так же, что децентрализация почки сенсбилизирует её ткань, снижает порог токсического повреждения и при действии различных неспецифических факторов становится одним из ведущих механизмов развития хронической трансплантационной нефропатии.

References

1. Artero M., Biava C., Amend W. et al. Recurrent focal glomerulosclerosis: natural history and response therapy. *Am J Med.* 1992; 92 (4): 375-83.
2. Tejani A., Stablein D.H. Recurrence of focal glomerulosclerosis posttransplantation: a special report of the North American Pediatric Renal Transplantant Cooperative Study. *J Am Soc Nephrol.* 1992; V2, (12): S258-263
3. Stolyarevich E.S., Tomilina N.A. Morphology and diagnostic criteria of the chronic kidney transplant dysfunction. *Transplantologiya*, 2009; t.1 (1):19-31.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl. J Med.* 2003; Dec 11; 349(24): 2326-33.

5. Tomilina N.A., Stolyarevich E.S., Kim I.G., Artyuhina L.Yu. Long-term results of kidney transplantation in point of view of the different ways of the basis immunosepression. *Transpantologiya* 2014; 3: 6-16.

6. Rinders E.J., Fibbe W.E., Rabelink T.J. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant* 2010; 25: 17-24

7. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells *J. Orthop. Res.*, 1991; N9:641-650

8. Alfarano C., Roubeix C., Chaaya R., Ceccaldi C., Calise D., Mias C. et al. Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats. *Cell Transplant.* 2012; 21 (9): 2009-2019

Сведения об авторах:

Онищенко Нина Андреевна — главный научный сотрудник, доктор медицинских наук, профессор, отдела «Биомедицинских технологий и тканевой инженерии», ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва

Мещерин Сергей Сергеевич — зав. отделения координации органного донорства ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва Тел. +7-963-644-96-36. E-mail: ssergevi4@mail.ru

Алексеева Лидия Сергеевна — научный сотрудник отд. клинической патоморфологии, кандидат медицинских наук

Севастьянов Виктор Иванович — доктор биологических наук, профессор, зав. отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии