

Низкомолекулярные пептидные препараты, полученные из культивированных стволовых клеток, при лечении острой почечной недостаточности

М.Ш. Хубутия ¹, А.А. Темнов ¹, А.В. Вагабов ², М.П. Лебедев ¹, А.Н. Склифас ², К.А. Рогов ³,
О.П. Фомина ², О.Ф. Вострикова ¹

¹НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва,

²Институт биофизики клетки, Пущино, ³ГКБ № 4, Москва

Приведены данные об эффективности использования низкомолекулярных пептидных препаратов, получаемых из культивированных клеток костного мозга, при лечении острой почечной недостаточности у экспериментальных животных.

Показано, что использование пептидных препаратов достоверно повышает выживаемость животных с острой почечной недостаточностью.

Ключевые слова: острая почечная недостаточность, стволовые клетки, костный мозг, пептиды, цисплатин.

Low-molecular peptide preparations obtained from cultivated stem cells in the treatment of acute renal failure

M.Sh. Khubutia ¹, A.A. Temnov ¹, A.V. Vagabov ², M.P. Lebedev ¹, A.N. Sklifas ², K.A. Rogov ³,
O.P. Fomina ², O.F. Vostrikova ¹

¹ Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow,

²Institute of cell biophysics, Puschino, ³City Clinical Hospital № 4, Moscow

Data on the efficiency of low-molecular peptide preparations, selected from cultivated stem cells of marrow, in the treatment of acute kidney insufficiency in experimental animals are resulted. It is demonstrated that the use of peptide preparations reliably promotes survivability of experimental animals suffering from acute kidney insufficiency.

Key words: acute kidney insufficiency, stem cells, marrow, peptides, cisplatin.

Введение

Острая почечная недостаточность (ОПН) является одним из тяжелых осложнений, развивающихся особенно у тяжелых больных, пребывающих в стационаре [1, 2]. По данным статистики, ОПН развивается приблизительно у 13 – 20 % госпитализированных больных [3, 4] и у 67 % пациентов, поступивших в отделения интенсивной терапии [5]. При этом риск летальных исходов при развитии ОПН повышается в 4 раза [3].

Существует все больше доказательств, что в основе развития ОПН лежит воспалительная реакция, затрагивающая как микрососуды, так и почечные каналы [6]. При этом у пациентов с хроническими заболеваниями внутренних органов, особенно

такими, как сахарный диабет, хроническая печеночная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, хроническая почечная недостаточность риск развития ОПН резко повышается, особенно при обострении основного заболевания [1].

Таким образом, разработка новых инновационных методов лечения ОПН является актуальной задачей, особенно в области экспериментальной медицины и клинической практики. Одним из таких подходов является использование для лечения ОПН в эксперименте мезенхимальных стволовых клеток [7, 8].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются мультипотентными стволовыми клетками, которые в основном находятся в костном мозге [9]. Данный тип клеток отличается высокой

пластичностью и способностью к дифференцировке в другие типы тканей [9 – 11] (остеобласты, фибробласты, хондробласты и т.д.). При этом МСК способны секретировать большое количество ростовых факторов и цитокинов, обладающих противовоспалительными, антиапоптотическими свойствами [12 – 14].

В литературе было показано, что при цисплатиновой модели ОПН суспензия МСК снижает уровень апоптоза в почечных канальцах сингенных мышей, стимулирует пролиферацию клеток в паренхиме почек, за счет локального выделения IGF-1. В других исследованиях было показано, что на модели ишемически/реперфузионного повреждения почки МСК, выделенные из здоровых доноров, снижали степень повреждения за счет паракринной секреции антиапоптотических, митогенных и васкулотрофических факторов [15, 16].

Таким образом, во многих работах была убедительно доказана перспективность использования стволовых клеток для лечения и профилактики ОПН. Следует отметить, что во всех этих работах выраженный клинический эффект был получен при использовании функционально активных аллогенных или ксеногенных стволовых клеток, полученных из тканей здорового организма [7, 8, 17]. Также следует подчеркнуть, что в большинстве работ для предотвращения реакции отторжения трансплантированных клеток в качестве реципиента использовали животных с генетически детерминированным клеточным иммунодефицитом.

Таким образом, вопрос об источнике мезенхимальных стволовых клеток для лечения острой почечной недостаточности у человека остается открытым. Использование аутоклеток, по-видимому, будет не оправдано по следующим причинам: во-первых, время культивирования для получения достаточного количества клеточного материала занимает от 5 до 15 дней, что может быть критичным при лечении ОПН; во-вторых, при острых патологических процессах в костном мозге происходит физиологическое подавление пролиферативной и секреторной активности стволовых клеток для предотвращения их гибели под действием патогенных факторов [18] (активные формы кислорода, токсины, продукты распада клеток и тканей), что, в свою очередь, повлияет на клиническую эффективность трансплантации. Использование аллогенного материала, наряду с морально-этическими проблемами, может привести к развитию вирусных осложнений, особенно у тяжелых больных с ослабленной реакцией иммунной системы; развитию реакции трансплантат против хозяина;

ухудшению общего состояния больного при развитии иммунологической реакции отторжения трансплантированных клеток [19]. Ксеногенный клеточный материал, наряду с развитием вышеперечисленных иммунологических реакций, может вызвать развитие антропозоонозных инфекций [20, 21]. Так было показано, что геном свиньи содержит от 3 до 7 ретровирусных последовательности, способных заражать клетки человека [22].

Одним из возможных выходов из сложившейся ситуации может быть получение низкомолекулярных пептидных препаратов, содержащих факторы роста и цитокины, выделяемые функционально активными аллогенными или ксеногенными стволовыми клетками в процессе культивирования. Проводимое фракционирование и очистка пептидов по молекулярной массе, отсутствие живого клеточного материала позволит снизить риск развития иммунологических реакций и осложнений у тяжелых больных с ОПН.

Целью нашей работы было изучить клиническую эффективность низкомолекулярных пептидных препаратов, получаемых из культивированных клеток костного мозга, при лечении цисплатиновой модели острой почечной недостаточности у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Стволовые клетки получали из костного мозга мини-свиней. У животного под общим наркозом из гребня подвздошной кости получали 150 – 200 мл суспензии клеток костного мозга. Мононуклеарную фракцию клеток костного мозга выделяли на градиенте плотности с использованием стандартного раствора Lympholyte-H (фирма Cedarlane, Ontario, Canada). После получения суспензию мононуклеарных клеток высевали на чашки Петри и культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки.

После 5 – 7 дней культивирования из культуральной среды и культивируемых клеток выделяли фракцию низкомолекулярных пептидов по описанной ранее методике [23, 24].

В работе использовали стандартную методику моделирования ОПН у лабораторных животных [15]. Мышам-самцам линии Balb/c массой 21 – 22 г вводили цисплатин внутривентриально (в/в) в дозе 13 мг/кг.

Для лечения острой почечной недостаточности животным после в/в инъекции цисплатина через 1, 12 и 24 ч в/в вводили низкомолекулярные пептидные препараты из расчета 20 мг на животное.

Материалы для гистологического исследования забирали на 4-е сут после введения цисплатина. Одновременно с забором тканей почки проводили биохимический анализ крови на содержание мочевины на биохимическом анализаторе «Рефлатрон 4» с использованием стандартных тест-полосок на мочевины. Для морфологической оценки характера изменений почки мышей фиксировали в нейтральном забуференном 10 % формалине и готовили серийные парафиновые срезы толщиной 3 мкм.

Результаты и обсуждение

У животных обеих групп наблюдались признаки обезвоживания и анорексии, хотя в контрольной группе эти признаки были более выраженные.

В контрольной группе при введении данной дозы цисплатина происходит 100 % гибель животных с 4-х по 6-е сут. Следует отметить, что введение пептидного препарата через 1 и 12 ч после введения цисплатина достоверно повышает выживаемость животных, однако, если введение препарата перенести на более поздние сроки (24 ч), смертность в опытной группе резко возрастает и не отличается от контрольной (рис. 1).

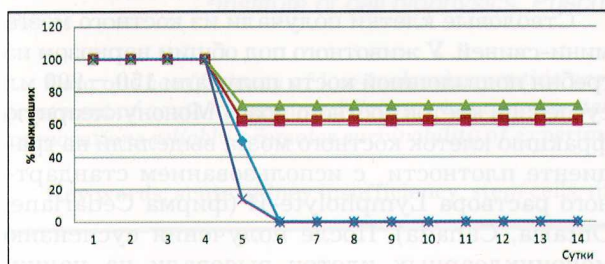


Рис. 1. Влияние введения пептидных препаратов (20 мг) на выживаемость животных с цисплатин-индуцированной (цисплатин 13 мг/кг) ОПН

◆ — физиологический раствор (контроль); ■ — введение пептидного препарата через 1 ч после введения цисплатина; ▲ — через 12 ч; × — через 24 ч

Биохимический анализ крови, проведенный на 4 сут, показал, что у животных под действием цисплатина резко повышается уровень мочевины с 22 до 112 мг/дл, у животных опытной группы, которым пептидные препараты вводили через 12 ч, после введения цисплатина уровень мочевины был достоверно ниже и составил 75 мг/дл (рис. 2).

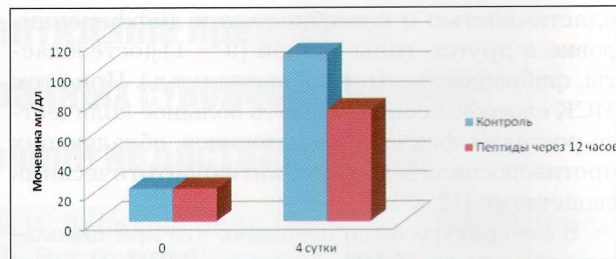


Рис. 2. Изменение уровня мочевины в сыворотке крови у мышей на 4-е сут после в/в введения цисплатина

При анализе гистологических срезов было выявлено, что по сравнению с интактными животными (рис. 3) под действием цисплатина в тканях почки наблюдается дисциркуляторные изменения (рис. 4, 5), выраженные дистрофические изменения и некроз эпителия в проксимальных отделах извитых канальцев (рис. 6).

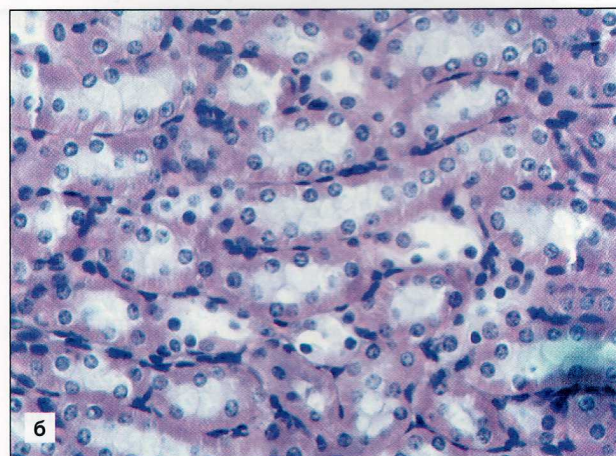
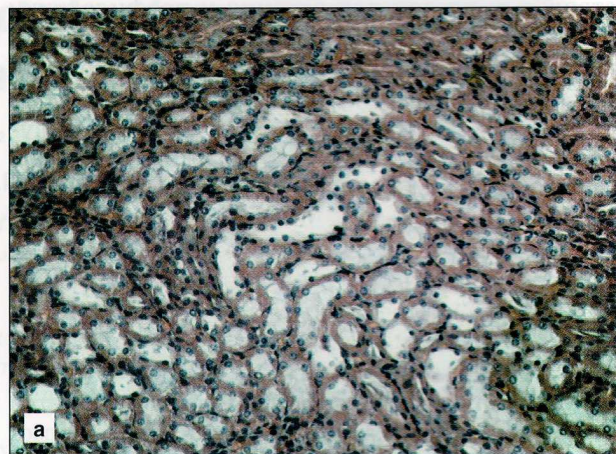


Рис. 3. Гистологический препарат интактной почки мыши (а — $\times 100$; б — $\times 200$)

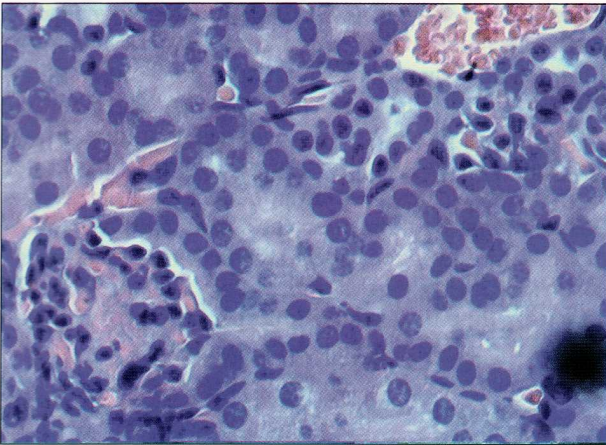


Рис. 4. Стазы крови и микротромбы в капиллярах клубочков и интертубулярных сосудах (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином.х400

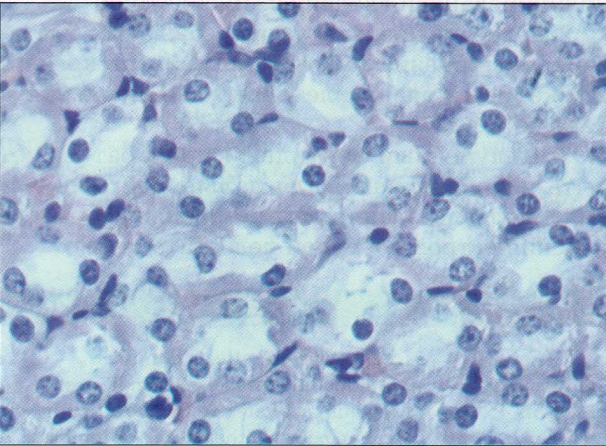


Рис. 5. Набухание и вакуолизация эпителиоцитов (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином.х400

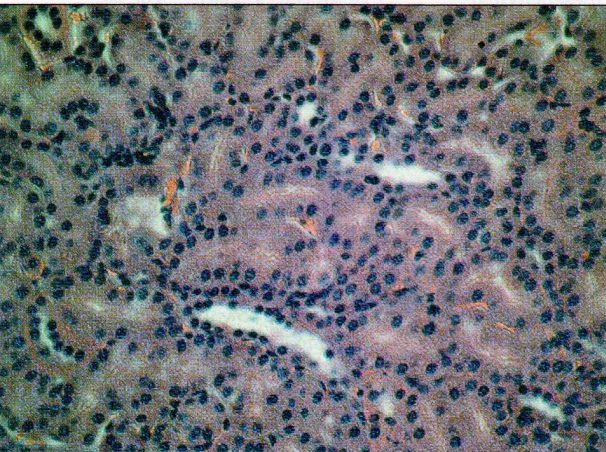


Рис. 6. Полнокровие и тромбы в интертубулярных сосудах. Некроз эпителиоцитов канальцев (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином.х200

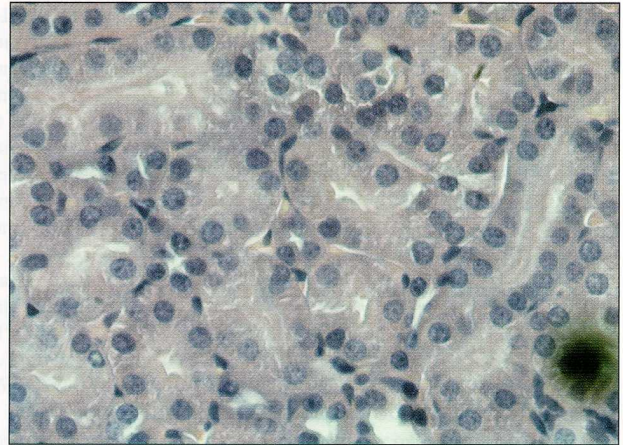


Рис. 7. Фестончатость апикальных отделов эпителиоцитов канальцев. Перинуклеарное просветление цитоплазмы отдельных эпителиоцитов (опытная группа). Окраска гематоксилином и эозином.х400

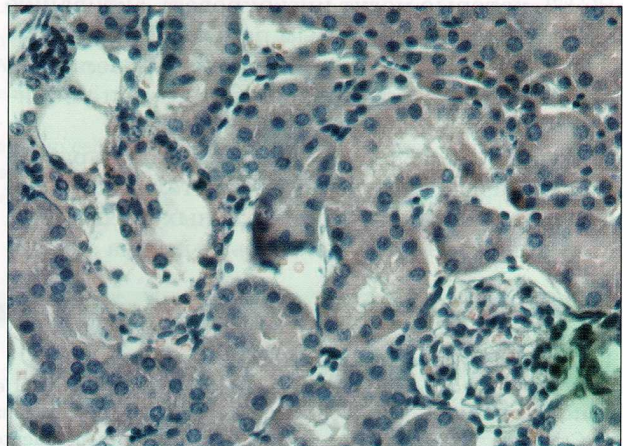


Рис. 8. Канальцевый некроз с вторичной клеточной реакцией в строме (опытная группа). Окраска гематоксилином и эозином.х200

При сравнении групп наибольшие отличия наблюдались в извитых канальцах. В группе с применением пептидных препаратов значительно менее выражены дистрофия эпителиоцитов, единичные некрозы канальцевого эпителия (рис 7, 8).

Несмотря на очевидный клинический эффект трансплантации мезенхимальных стволовых клеток экспериментальным животным с ОПН, многочисленные научно-исследовательские работы не дают четкого ответа на вопрос – участвуют ли стволовые клетки в процессах регенерации, формируя ткань почки [25, 26]. Вместе с тем, имеются убедительные данные, что стволовые клетки костного мозга секретируют факторы, которые могут препятствовать цисплатин-индуциро-

ванному апоптозу клеток эпителия канальцев [17] и тем самым ограничить повреждение почечной ткани и увеличить выживаемость животных с ОПН. Как было показано, МСК выделяют целый ряд факторов, таких как HGF, фактор роста эндотелия сосудов, IGF-1 и EGF, простагландины, такие как PGE2, и цитокины, включая G-CSF и M-CSF [26 – 29]. При этом действие HGF и IGF-1 приводит к снижению уровня повреждения эпителиальных клеток почечных канальцев, возникающих под действие токсинов или ишемии [30, 31]. С другой стороны, фактор роста эндотелия сосудов может стимулировать пролиферацию предшественников эндотелиальных клеток в процессе регенерации после окончания действия повреждающих факторов (токсины, ишемия) [32, 33]. МСК секретируют факторы TGF- β и PGE2, которые могут ингибировать активацию лимфоцитов, и тем самым подавляют воспалительные реакции, которые могли бы увеличить повреждение канальцевого эпителия и увеличить уровень апоптоза [28, 29, 34].

Таким образом, полученные в нашей работе экспериментальные данные убедительно показывают, что использование пептидных препаратов, полученных из МСК, может быть весьма эффек-

тивным при лечении ОПН. Низкомолекулярная пептидная фракция, полученная из культивированных клеток костного мозга, содержит необходимые факторы, которые, с одной стороны, снижают уровень повреждения, возникающего под действием цисплатина, а с другой стороны, способствуют ускорению процессов регенерации. Дальнейшее изучение механизмов действия пептидных препаратов, полученных из клеток костного мозга, может стать основой для разработки перспективных инновационных препаратов для лечения острой почечной патологии.

Выводы

1. Низкомолекулярные пептиды, полученные из культивированных клеток костного мозга, повышают выживаемость животных с ОПН, индуцированной введением цисплатина.
2. Действие препарата сопровождается достоверным снижением уровня мочевины в крови и снижением уровня клеточных повреждений в паренхиме почки.
3. Полученный пептидный препарат может быть перспективным для дальнейшего изучения с целью создания лекарственных форм для лечения острой почечной недостаточности.

Литература

1. Acute Kidney Injury Network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury / R.L. Mehta [et al.] // *Crit. Care* – 2007. – N 11. – R 31.
2. Acute renal failure: Definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy / R.W. Schrier [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 114.P. 5–14.
3. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients / G.M. Chertow [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 3365–3370.
4. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients / S. Uchino [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 34. – P. 1913–1917.
5. RIFLE criteria for acute kidney injury is associated with hospital mortality in critically ill patient: A cohort analysis / E. Hoste [et al.] // *Crit. Care* – 2006. Vol.10. – R. 73–82.
6. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure / Wang Wei [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – Mar., 284(3). – F. 532–537.
7. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury / M. Morigi [et al.] // *Stem Cells*. – 2010. – Mar., 31, 28(3). – P. 513–522.
8. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice / M. Morigi [et al.] // *Stem. Cells*. – 2008. – Aug. 26(8). – P. 2075–2082.
9. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger [et al.] // *Science*. – 1999. – Vol. 284. – P. 143–147.
10. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates / S.M. Devine [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 2999 – 3001.
11. Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions / F. Anjos-Afonso, E.K. Siapati, D. Bonnet // *J. Cell. Sci.* – 2004. – Vol. 117. – P. 5655–5664.
12. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis / S.C. Hung [et al.] // *Stem cells*. – 2007. – Vol. 25. – P. 2363–2370.
13. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms / F. Togel [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – F31–42.
14. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages / M.K. Majumdar [et al.] // *J. Hematother. Stem. Cell. Res.* – 2000. – Vol. 9. – P. 841–848.
15. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure / M. Morigi [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2004. – Vol. 15. – P. 1794 –1804.

16. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair / B. Imberti [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – 18. – P. 2921–2928.
17. Stromal Cells Protect against Acute Tubular Injury via an Endocrine Effect / Bi. Baoyuan [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 2486–2496.
18. Переверзев, А.Е. Кроветворные колониеобразующие клетки и физические стресс-факторы / А.Е. Переверзев // *Л. : Наука, 1986.* – С. 172.
19. Clinical characteristics of patients with Epstein Barr virus in cerebrospinal fluid / T. Martelius [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2011. – Oct., 21, 11. – P. 281. – doi: 10.1186/1471-2334-11-281.
20. Зуев, В.А. Медленные вирусные инфекции человека и животных / В.А. Зуев. – М. : Медицина, 1988.
21. Зуев, В.А. Прионные болезни человека и животных : рук-во для врачей / В.А. Зуев, И.А. Завалишин, В.М. Ройхель. – М. : [Б. и.], 1999. – 191 с.
22. Denner, J. Infectious risk in xenotransplantation--what post-transplant screening for the human recipient? / J. Denner // *Xenotransplantation.* – 2011. – May-Jun., Vol. 18(3). – P. 151–157. – doi: 10.1111/j.1399-3089.2011.00636.x. Review.
23. Композиция для стимулирования роста и регенерации клеток, а также способ ее получения : пат. № 2341270; опубл. 20.12.08, Бюл. № 35.
24. Композиция для стимулирования роста и регенерации клеток, (варианты), а также способ ее получения (варианты) : пат. № 2391990; опубл.: 20.06.2010, Бюл. № 17.
25. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells / J.S. Duffield [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 1743–1755.
26. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms / F. Togel [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – F31–F42.
27. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / A.I. Caplan, J.E. Dennis // *J. Cell. Biochem.* – 2006. – Vol. 98. – P. 1076–1084.
28. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells / M.E. Groh [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2005. – Vol. 33. – P. 928–934.
29. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood.* – 2005. – Feb. 15. – Vol. 105(4). – P. 1815–1822.
30. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats / S.B. Miller [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – F129–F134.
31. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat / S.B. Miller [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89. – P. 11876–11880.
32. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer / T. Asahara [et al.] // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94. – P. 3291–3302.
33. Vascular endothelial growth factor induces branching morphogenesis/tubulogenesis in renal epithelial cells in a neuropilin-dependent fashion / A. Karihaloo [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 7441–7448.
34. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells / P.A. Sotiropoulou [et al.] // *Stem. Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 74–85.