



ХИРУРГИЯ

УДК 619:616-003.93+619:616.61-089:636.92

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.216

РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОЧЕЧНЫХ ТЕЛЬЦАХ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ НЕФРЭКТОМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЛЯ УШИВАНИЯ НИТИ «АЛЛОПЛАНТ»

Сидельников А.И. – к.б.н., доц., Квочко А.Н. – д.б.н, проф., проф. РАН, Некрасова И.И. –
к.в.н., доц.

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет

Ключевые слова: кролики, нефрэктомия, аллоплант, иммуногистохимия, Ki-67, регенерация. **Key words:** rabbits, nephrectomy, alloplant, immunohistochemistry, Ki-67, regeneration.



РЕФЕРАТ

На сегодняшний день изучение процесса клеточной пролиферации в органах и тканях, а также возможность ее стимуляции очень важно при многих видах патологии. Первичное повреждение типов соматических клеток в гломерулярном аппарате почек связано с различными патологиями. Поврежденные эндотелиальные и мезангиальные клетки восстанавливаются за счет пролиферации соседних клеток. Для исследования репаративных процессов в почечных тельцах оценивали изменение количества Ki-67+ клеток. Ki-67 экспрессируется в ядре клетки на всех стадиях клеточного цикла, кроме G0. Следовательно, количество клеток Ki-67+ отражает пролиферативную активность. Поиск новых способов стимуляции регенерации органов и методов ее оценки является актуальным направлением. При оценке белка Ki-67 в клетках почечных телец выделяются три типа экспрессии: зернистый, диффузный и зернисто-диффузный. Мы установили, что увеличенное (на 40,21%) количество Ki-67+ клеток в зоне повреждения на 3-и сутки, свидетельствует о активно протекающих процессах регенерации, затем с 6-х суток значения данного параметра снижаются, но все еще остаются выше, чем во время операции. Мы связываем такую динамику изменения исследуемого параметра с альтерацией и активно протекающими воспалительными процессами, локализующимися в этой зоне. В зоне без повреждения мы отметили волнообразную динамику изменения количества Ki-67+ клеток в почечных тельцах в зоне без повреждения с 2-мя периодами увеличения (на 3-и и 18-е сутки) и снижением до значений, полученных во время операции к 60-м суткам. Мы считаем, что это указывает на раннюю (3-и сутки) регенеративную активность клеток, а также процесс ремоделирования ткани. Полученные нами результаты могут помочь в усовершенствовании диагностики и лечения животных с патологиями почек.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение процесса клеточной пролиферации в органах и тканях, а также возможность ее стимуляции очень важно при многих видах патологии [1, 2].

Почки являются важным органом, поддерживающим гомеостаз в организме. Однако в настоящее время у животных все чаще встречаются различные патологии почек.

В нефроне все структуры имеют различную регенеративную способность. В отличие от канальцев, почечные тельца проявляют наименее выраженную регенерацию.

При гибели почечных телец происходит гибель всего нефрона, что приводит к развитию гломерулосклероза и хронической почечной недостаточности. Однако, при слабой пролиферативной активности клеток почечных телец, в экспериментальных моделях патологий почек выявляли признаки регенерации, при этом точных данных об источнике этого процесса не получено. Наиболее важным клеточными элементами почечных телец являются подоциты, которые обеспечивают фильтрацию [1, 5].

Первичное повреждение типов соматических клеток в гломерулярном аппарате почек связано с различными патологиями. Поврежденные эндотелиальные и мезангиальные клетки восстанавливаются за счет пролиферации соседних клеток. Подоциты представляют собой высокоспециализированные, терминально дифференцированные клетки, находящиеся в фазе G0 клеточного цикла. Эти клетки способны к реорганизации своих актиновых цитоскелетных волокон для запуска механизма клеточного деления [8].

Потеря до 20% подоцитов может быть компенсирована, потеря 20-40% подоцитов приводит к рубцеванию, а потеря более 60% приводит к гломерулосклерозу [4, 9].

Подоциты могут подвергаться гипертрофии, то есть увеличению размера клеток, чтобы покрыть нижележащий слой базальной мембраны клубочка в

областях, где соседние клетки отделились или погибли. Однако, когда травма превышает определенный порог, со временем процесс гипертрофии подоцитов оказывается не эффективным, так как потеря подоцитов и сегментарный склероз приводят к снижению ультрафильтрационной способности и снижению скорости клубочковой фильтрации [5, 6].

Первые доказательства регенерации почечных клубочков были представлены в исследовании Fioretto в 1998 году, в котором был показан процесс восстановления гломерулярных поражений. Это исследование дало начало для быстро развивающегося направления по гломерулярной регенерации [8].

Целью нашей работы было изучение уровня экспрессии Ki-67 антигена в клетках почечных телец после частичной нефрэктомии с использованием для ушивания раны почки нити «Аллоплант» и оценка таким образом уровня пролиферации.

Дефект почки после нефрэктомии ушивали нитью «Аллоплант». Этот материал обладает низкой антигенностью, предотвращает разрастание коллагеновых волокон, стимулирует регенеративные процессы органов и тканей.

Для исследования репаративных процессов в почечных тельцах оценивали изменение количества Ki-67+ клеток. Ki-67 экспрессируется в ядре клетки на всех стадиях клеточного цикла, кроме G0. Следовательно, количество клеток Ki-67+ отражает пролиферативную активность [7].

На протяжении десятилетий определение экспрессии белка Ki-67 широко используется в медицине для определения опухолевых клеток, однако имеются ограниченные данные о его применении при неопухолевых патологиях.

Таким образом, поиск новых способов стимуляции регенерации органов и методов ее оценки является актуальным направлением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 18 кроликах породы шиншилла. Для моделирова-

ния повреждения мы проводили частичную нефрэктомии. Рану почки ушивали нитью «Аллоплант». Для иммуногистохимического исследования пробы отбирали из 2-х зон: зона повреждения и зона без повреждения (на расстоянии 1 см).

Окрашивание белка Ki-67 проводили на срезах толщиной 4 мкм моноклональными мышиными антителами Ki-67 (Dako, Дания). Проводили подсчет Ki-67+ клеток в почечных тельцах в 1 мм².

Статистическую обработку данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и множественного сравнения (критерий Ньюмена-Кейлса) на MS Excel. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При оценке белка Ki-67 в клетках почечных телец можно выделить три типа экспрессии: зернистый, диффузный и зернисто-диффузный.

Для зернистого типа окрашивания клеток характерна слабая интенсивность, при этом ядра практически не окрашиваются, но ядрышки хорошо видны. Диффузный тип – ядра клеток окрашиваются, но ядрышки не визуализируются. Зернисто-диффузный тип – ядра клеток с умеренным окрашиванием и в них обнаруживается зернистость (интенсивно окрашенные ядрышки). Такие типы экспрессии зависят от того, на каком этапе клеточного цикла находится клетка.

Анализ количества Ki-67+ клеток в почечных тельцах помог установить вол-

нообразный характер изменения того параметра (Таблица 1).

Уже к 3-м суткам количество Ki-67+ клеток в почечных тельцах увеличивается как в зоне повреждения, так и в зоне без повреждения на 40,21% и 34,21% соответственно.

К 6-м суткам по сравнению с 3-ми мы установили снижение количества Ki-67+ клеток в зоне повреждения почки на 13,16% и увеличение в зоне без повреждения на 10,37%.

С 6-х по 12-е сутки достоверных изменений исследуемого параметра не установлено.

С 12-х по 15-е сутки достоверное отличие количества Ki-67+ клеток отмечено только в зоне без повреждения – снижение 12,53%.

Сравнивая полученные данные на 18-е и 15-е сутки, мы установили достоверные отличия исследуемого параметра только в зоне без повреждения – увеличение на 16,16%.

На 60-е сутки после проведения частичной нефрэктомии количество Ki-67+ клеток в почечных тельцах снижается в зоне повреждения на 9,91%, а в зоне без повреждения на 33,48%.

Сопоставляя данные о количестве Ki-67+ клеток в почечных тельцах после частичной нефрэктомии между зонами исследования, мы установили, что на 3-и сутки значение данного параметра в зоне без повреждения меньше на 4,28% чем в зоне повреждения.

Таблица 1

Количество Ki-67+ клеток в почечных тельцах

Срок взятия материала	Зона повреждения (кл./мм ²)	Зона без повреждения (кл./мм ²)
Во время нефрэктомии	100,67±1,25	
3 сутки	141,15±2,39*	135,11±0,51*#
6 сутки	122,58±0,51*	149,12±1,79*#
12 сутки	120,42±3,05	148,79±0,58#
15 сутки	121,15±0,55	130,14±0,51*#
18 сутки	119,44±0,56	155,22±2,78*#
60 сутки	107,60±4,15*	103,25±2,71*

Примечание: статистические различия с предыдущим сроком взятия материала: * – $p < 0,05$; статистические различия между зонами взятия материала: # – $p < 0,05$.

Сравнительный анализ количества Ki-67+ клеток на 6-е сутки показал, что в зоне без повреждения этот параметр выше на 21,65%.

На 12-е, 15-е и 18-е сутки значение данного параметра в почечных тельцах в зоне без повреждения выше на 23,56%, 7,42% и 29,96% соответственно.

На 60-е сутки мы не установили достоверных отличий количества Ki-67+ клеток между исследуемыми участками.

По нашему мнению, увеличенное (на 40,21%) количество Ki-67+ клеток в зоне повреждения на 3-и сутки, свидетельствует о активно протекающих процессах регенерации, затем с 6-х суток значения данного параметра снижаются, но все еще остаются выше, чем во время операции. Мы связываем такую динамику изменения исследуемого параметра с альтерацией и активно протекающими воспалительными процессами, локализующимися в этой зоне. Когда повреждение превышает определенный порог, со временем процесс гипертрофии подоцитов оказывается не эффективным, так как потеря этих клеток и сегментарный склероз приводят к снижению ультрафильтрационной способности и скорости клубочковой фильтрации нефрона.

В зоне без повреждения мы отметили волнообразную динамику изменения количества Ki-67+ клеток в почечных тельцах в зоне без повреждения с 2-мя периодами увеличения (на 3-и и 18-е сутки) и снижением до количества, которое было во время операции к 60-м суткам. Это указывает на раннюю (3-и сутки) регенеративную активность клеток, а также процесс ремоделирования ткани. По нашему мнению, такая динамика связана с менее выраженными процессами воспаления благодаря стимулирующему регенерацию эффекту нити «Аллоплант». Подобную динамику изменения пролиферативной активности клеток получал В.Д. Труфанов с соавторами при изучении репарации тканей [3].

В большинстве почечных эпителиоцитов процесс замены поврежденных или погибших клеток поддерживается благо-

даря наличию стволовых клеток или клеток-предшественников. Кроме того, установлено наличие субпопуляции CD24+CD133+ почечных предшественников в капсуле почечного клубочка, которые обеспечивают регенеративный потенциал для поврежденных клеток почечного эпителия. Хроническое повреждение вызывает дисфункцию эпителиальных клеток канальцев, что вызывает высвобождение фиброгенных цитокинов и рекрутирование воспалительных клеток в поврежденных почках. Однако наличие почечных эпителиальных предшественников в почках может объяснить восстановление при повреждении почек, наблюдаемое у экспериментальных животных. Таким образом, управление раневым процессом с целью смещения его в сторону регенерации, требует возможности замедлять быстрый фиброзный ответ, чтобы почечные клетки-предшественники могли обеспечить регенерацию ткани, а не образование рубца [4].

ВЫВОДЫ

При проведении частичной нефрэктомии с ушиванием операционной раны нитью «Аллоплант», мы установили, что процесс регенерации в почечных тельцах имеет волнообразный характер и восстановление функции нефронов происходит за счет соседних, наименее поврежденных клеток, на это указывает значительное увеличение количества Ki-67+ клеток в зоне без повреждения. Полученные нами результаты могут помочь в усовершенствовании диагностики и лечения животных с патологиями почек.

REGENERATIVE PROCESSES IN THE RENAL BODIES AFTER PRIVATE NEPHRECTOMY WITH THE USE OF THE ALLOPLANT SUTURE FOR SEWING.

Sidelnikov A.I. – candidate of biological sciences, docent, Kvochko A.N. – doctor of biological sciences, professor, professor of the Russian Academy of Sciences, Nekrasova I.I. – candidate of veterinary sciences, docent «Stavropol State Agrarian University»

ABSTRACT

To date, the study of the process of cell proliferation in organs and tissues, as well as the possi-

bility of its stimulation is very important in many types of pathology. Primary damage to somatic cell types in the glomerular apparatus of the kidneys is associated with various pathologies. Damaged endothelial and mesangial cells are restored due to the proliferation of neighboring cells. To study the reparative processes in the renal corpuscles, the change in the number of Ki-67+ cells was assessed. Ki-67 is expressed in the cell nucleus at all stages of the cell cycle, except for G0. Therefore, the number of Ki-67+ cells reflect proliferative activity. The search for new ways to stimulate organ regeneration and methods for its evaluation is an important direction. When evaluating the Ki-67 protein in the cells of the renal corpuscles, three types of expression are distinguished: granular, diffuse, and granular-diffuse. We found that an increased (by 40.21%) number of Ki-67+ cells in the damaged area on the 3rd day indicates active regeneration processes, then from the 6th day the values of this parameter decrease, but still remain higher than during surgery. We associate such dynamics of changes in the studied parameter with alteration and active inflammatory processes localized in this zone. In the zone without damage, we noted a wave-like dynamics of changes in the number of Ki-67+ cells in the renal corpuscles in the zone without damage with 2 periods of increase (on the 3rd and 18th days) and a decrease to the values obtained during the operation by 60 -m days. We believe that this indicates an early (3rd day) regenerative activity of cells, as well as the process of tissue remodeling. Our results can help improve the diagnosis and treatment of animals with kidney pathologies.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Стекольников, А.А. Биохимическое исследование концентрации креатинина и мочевины в крови у кошек-реципиентов после трансплантации почек / А.А. Стекольников, П.А. Пец // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2020. № 1. – С. 206-209
- 2.Стекольников, А.А. Сопоставление различных видов микрохирургического шва для создания сосудистых анастомозов при трансплантации почек у крыс / А.А. Стекольников, П. А. Пец // Международный вестник ветеринарии. 2019. № 1. – С. 161-165
- 3.Труфанов, В.Д. Радиочастотные скальпели в челюстно-лицевой и пластической хирургии: экспериментальное, иммуногистохимическое исследование / В. Д. Труфанов, С. Ю. Иванов, Е. А. Коган // Институт стоматологии. 2015. №2. – С. 90-93
- 4.Andrianova, N.V. Kidney Cells Regeneration: Dedifferentiation of Tubular Epithelium, Resident Stem Cells and Possible Niches for Renal Progenitors/ N.V. Andrianova, M.I. Buyan, L.D. Zorova, I.B. Pevzner, V.A. Popkov, V.A. Babenko, D.N. Silachev, E.Y. Plotnikov, D.B. Zorov // Int J Mol Sci. 2019 Dec 15;20(24):6326
- 5.Berger, K. Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury / K. Berger, J.-M. Bangen, L. Hammerich, C. Liedtke, J. Floege, B. Smeets, M. J. Moeller // PNAS, January 28, 2014, vol. 111, no. 4. – P. 1533-1538
- 6.Lasagni, L. Podocyte mitosis – a catastrophe / L. Lasagni, E. Lazzeri, S.J. Shankland, H.J. Anders, P. // Romagnani Curr Mol Med 2013;13. – P. 13-23
- 7.Mowla, K. Ki-67 proliferative index in kidney biopsies of lupus nephritis patients: a preliminary study / K. Mowla, E. Emami, M. B. Abhari, S. Z. Vahed, M. Mubarak, M. Bahadoram, A. R. Maghsoudi, H. Nasri, N. Hooshyar // Immunopathologia Persa Volume x, Issue x, 2022 x(x):e0x
- 8.Peired, A. Glomerular regeneration: when can the kidney regenerate from injury and what turns failure into success? / A. Peired, E. Lazzeri, L. Lasagni, P. Romagnani // Nephron Exp Nephrol. 2014;126(2). – P. 70-75
- 9.Pippin, JW Cells of renin lineage are progenitors of podocytes and parietal epithelial cells in experimental glomerular disease / Pippin JW, Sparks MA, Glenn ST, Buitrago S, Coffman TM, Duffield JS, Gross KW, Shankland SJ // Am J Pathol 2013;183P.542-557.