

ЗМІНИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ КЛІТИН КІРКОВОЇ РЕЧОВИНИ НИРКИ ПІСЛЯ НЕФРЕКТОМІЇ КОНТРАЛАТЕРАЛЬНОЇ У СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова (м. Вінниця)

pivtorakv@gmail.com

Дослідження є фрагментом НДР кафедри оперативної хірургії та топографічної анатомії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова «Структурні зміни в органах травної та сечостатевої систем після проведення оперативних втручань», № державної реєстрації: 0114U003688.

Вступ. Прогноз для пацієнтів з єдиною вродженою ниркою та після односторонньої нефректомії в дитячому віці є спірним. Експериментальні дослідження на тваринах показують, що компенсаторне збільшення клубочкової фільтрації може привести до прогресуючого пошкодження ниркової тканини і може викликати гіпертонію [9]. Функціональний стан єдиної нирки у дітей нерідко значно порушується, і хронічна ниркова недостатність може наступити вже в дитячому або підлітковому віці [2]. У нирці, що залишилася після нефректомії у дітей, встановлено з допомогою реносонаграфії нерівномірність проліферативних і фібротично-склеротичних процесів, наявність дисметаболических порушень, тривалі порушення природного пасажу сечі [3], з віком виникнення клубочкової гіперфільтрації може погіршити наявний гломерулосклероз і привести до ниркової недостатності [6].

У фізіологічних умовах у нирках переважає клітинний тип регенерації. Проте в експериментах на гризунах показано, що вже через 48 годин після часткової нефректомії відбувається різке збільшення мітотичного індексу канальцевих епітеліоцитів [8]. Видалення нирки розвиває компенсаторні пристосування нирки, що залишилася, (збільшення кровотоку та клубочкової гіперфільтрації), які підтримують функцію на підвищених рівнях і призводять спочатку до гіпертрофії клубочків і канальців нефрона [7,11], в подальшому відбувається зниження показників швидкості клубочкової фільтрації та кліренсу креатиніну, які у більш віддалені періоди після операції залишаються на 15-25% менше вихідних величин [4].

У ході компенсаторної реакції нирки, що залишилася після нефректомії у статевонезрілих щурів, нами встановлено достовірне зростання показників усіх структурних компонентів нефрона кіркової речовини вже на 7-му добу. В подальшому темп приросту структурних компонентів нефрона: площі

ниркового тільця, площі судинного клубочка, площі просвіту капсули, площі проксимального звивистого канальця, площі просвіту проксимального звивистого канальця, площі дистального звивистого канальця, площі просвіту дистального звивистого канальця, зменшувались зі зростанням строку післяопераційного періоду [5].

Фундаментальні дослідження клітинного циклу та клітинної загибелі стають невід'ємною частиною експериментальних робіт. В останні роки дослідники приділяли увагу в основному цитокінам і ростовим факторам, що синтезуються макрофагами [10]. Оскільки фінальний етап формування таких фізіологічних механізмів канальцевого відділу нефрону у ссавців різних біологічних видів співпадає зі становленням репродуктивної системи організму, важливо дослідити клітинний цикл та фрагментацію ДНК клітин єдиної нирки у статевонезрілих щурів.

Мета дослідження. Визначити протягом компенсаторно-приспосувального періоду особливості показників клітинного циклу клітин кіркової речовини єдиної нирки, що залишилася після нефректомії у статевонезрілих щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальне дослідження динаміки показників клітинного циклу та фрагментації ДНК єдиної нирки, що залишилася після нефректомії контралатеральної (через 7, 14, 21, 30, 60 та 90 діб) виконано на 60 одномісячних статевонезрілих щурах-самцях масою 85-130 грамів на базі науково-дослідного центру (НДЦ) Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. Отримані дані порівнювали з показниками, отриманими від інтактних тварин такого ж віку (12 щурів), та від статевозрілих тварин (60 щурів) масою 155-220 грамів, яким нефректомія лівої нирки була проведена у трьох-чотирьох місячному віці. В основу вікової періодизації онтогенезу щурів було взято розробку І.П. Западнюка і співавт. [1].

Утримання та маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), також керувалися рекомендаціями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей»

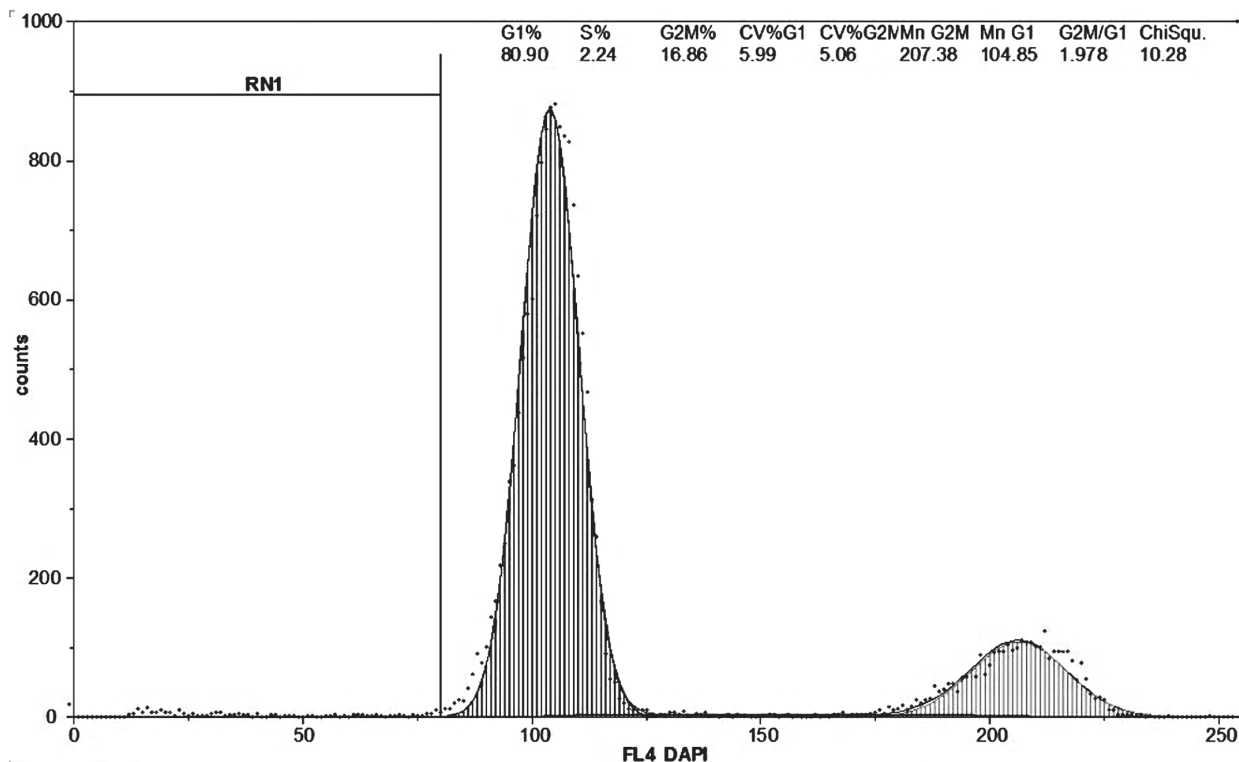


Рис. 1. ДНК-гістограма суспензій ядер клітин кіркової речовини єдиної правої нирки статевонезрілого щура на 7 добу після нефректомії.

Умовні позначення: G1% – відсоткове співвідношення клітин фази G1 до всіх клітин клітинного циклу; S% – відсоткове співвідношення клітин фази S до всіх клітин клітинного циклу; G2M% – відсоткове співвідношення клітин фази G2M до всіх клітин клітинного циклу; CV% G1 – відносний коефіцієнт варіації піку G1; CV% G2 – відносний коефіцієнт варіації піку G2M; MnG2M – середнє значення каналу піку G2M; MnG1 – середнє значення каналу піку G1; ChiSqu – вимірена варіація між експериментальними даними та відповідною математичною моделлю; інтервал RN1 – субдиплоїдна ділянка, яка відображає фрагментацію ядерної ДНК.

(Страсбург, 1985) і положеннями «Правил доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)».

Вміст ДНК в ядрах клітин кіркової речовини нирок щурів визначався методом проточної цитометрії на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі «Partec PAS» фірми Partec, Німеччина. Суспензії ядер з клітин нирки були отримані за допомогою спеціального розчину для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 1 фірми Partec, Німеччина, який дозволяє швидко та одночасно виконувати екстракцію ядер і маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI), який входить до його складу. У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались спеціальні одноразові фільтри CellTrics 50 мкм.

Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 20 тис. подій. Розподілення ДНК, що відображає клітинний цикл та фрагментацію ДНК показані на сторінці з однією гістограмою з використанням лінійної шкали. Циклічний аналіз клітин виконаний засобами програмного забезпечення у повній цифровій відповідності згідно математичної моделі. Цифровий результат показаний у вікні циклічного аналізу клітин за алгоритмом клітинного циклу разом з графічним представленням фаз G0G1, S, G2 + M та експериментальними даними.

Статистична обробка отриманих результатів була проведена в пакеті «STATISTICA 6.1» (належить НДЦ ВНМУ імені М. І. Пирогова, ліцензійний № ВХХR901E246022FA) із застосуванням непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним із отриманих варіаційних рядів, середні значення кожної ознаки, що вивчалася, та стандартне квадратичне відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерія Мана-Уїтні.

Результати досліджень та їх обговорення. Провівши аналіз розподілу ядер клітин кіркової речовини нирки, що залишилася після нефректомії контралатеральної, за фазами клітинного циклу, необхідно відзначити, що у порівнянні з інтактними тваринами статистично значуще (на 33,6%) збільшилась кількість клітин у S-фазі вже на сьому добу післяопераційного періоду (**рис. 1**). Статистично значуще збільшення клітин на 14 добу продовжувалось на 14,8% порівняно з інтактними тваринами (**рис. 2**).

В подальшому кількість клітин у фазі S зменшувалась. Порівняно з інтактними тваринами на 30, 60, 90 добу клітин у цій фазі було менше на 13,2%, 22,0%, 40,0% відповідно (**табл.**).

Кількість клітин кіркової речовини єдиної правої нирки у фазах G0G1 та G2+M в динаміці спостереження після нефректомії суттєво не змінювалась

МОРФОЛОГІЯ

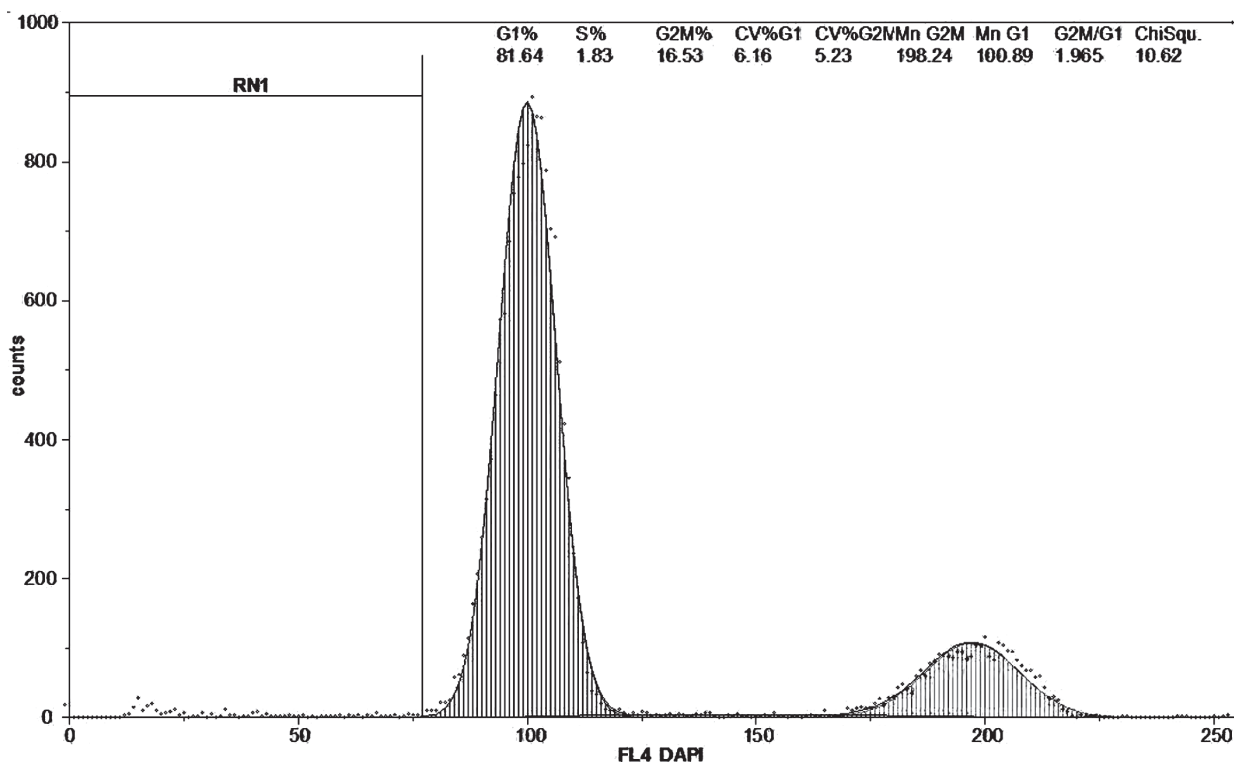


Рис. 2. ДНК-гістограма суспензій ядер клітин кіркової речовини єдиної правої нирки статевонезрілого щура на 14 добу після нефректомії.

Примітка. Умовні позначення див. рис. 1.

порівняно з показниками в інтактних тварин, лише через 90 діб у фазі G0G1 статистично значуще збільшилась на 2,8%, а у фазі G2+M на 9,9%. Порівняння розподілу ядер клітин кіркової речовини нирки у клітинному циклі серед статевонезрілих та статевозрілих тварин показало, що кількість клітин у фазі S на 7 та 14 добу була статистично значуще більшою (на 23,6% та на 17,5% відповідно) у статевонезрілих. Крім того, кількість клітин у цій фазі порівняно з показниками статевозрілих тварин мала тенденцію до збільшення протягом усього терміну спостереження (рис. 3).

Кількість клітин кіркової речовини єдиної правої нирки у фазах G0G1 та G2+M порівняно з показниками статевозрілих та статевонезрілих тварин у динаміці спостереження після нефректомії статистично значуще не змінювалась.

Висновки

1. Клітинний цикл клітин кіркової речовини єдиної нирки у статевонезрілих тварин має свої особливості: кількість клітин у синтетичний період клітинного циклу (фазу S) зростає у найближчому післяопераційному періоді після нефректомії (7-14 доба), в подальші терміни спостереження (30-90 доба) навпаки статистично значуще зменшується.

2. У статевонезрілих тварин зростання клітин у фазі S через 7-14 діб статистично значуще більше, ніж у статевозрілих. У фазах G0G1 та G2+M у динамі-

Таблиця.
Показники клітинного циклу клітин кіркової речовини єдиної нирки після нефректомії контралатеральної у статевонезрілих щурів (M±σ)

Доба	Групи тварин	Показники клітинного циклу (%)		
		G0G1	S	G2 + M
7	Інтактні тварини	82,20±0,93	1,54±0,04	16,26±0,95
	Після нефректомії	81,98±0,79	2,25±0,16*	15,77±0,80
14	Інтактні тварини	81,15±0,76	1,56±0,04	17,29±0,71
	Після нефректомії	82,49±0,78	1,83±0,07*	15,67±0,83
21	Інтактні тварини	80,51±0,75	1,58±0,04	17,88±0,86
	Після нефректомії	83,09±0,98	1,48±0,06	15,46±0,93
30	Інтактні тварини	82,70±0,82	1,51±0,04	15,78±0,94
	Після нефректомії	83,75±0,97	1,31±0,04*	14,94±0,90
60	Інтактні тварини	82,53±0,89	1,50±0,04	15,96±0,98
	Після нефректомії	82,69±0,94	1,17±0,04*	16,14±0,92
90	Інтактні тварини	81,03±0,96	1,45±0,04	17,52±0,93
	Після нефректомії	83,36±0,75*	0,87±0,06*	15,78±0,75*

Примітка: * – статистично значущі відмінності (p<0,05) за критерієм Манна-Уїтні між відповідними показниками у порівнянні з контролем.

ці спостереження після нефректомії кількість клітин статистично значуще не змінювалась.

Перспективи подальших досліджень

Перспективно вивчити вплив нефректомії на активність апоптозу клітин у нирці, що залишилась, з метою комплексної оцінки механізмів регуляції регенерації єдиної нирки.

МОРФОЛОГІЯ



Рис. 3. Динаміка кількості ядер клітин кіркового шару нирки, що перебувають у S-фазі, після нефректомії конралатеральної у статевозрілих та статевонезрілих щурів.

Література

1. Западнюк И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. – Київ: Вища школа, 1983. – 383 с.
2. Кундін В.Ю. Комплексна радіонуклідна оцінка структурно-функціонального стану єдиної нирки в дітей / В. Ю. Кундін // Український журнал нефрології та діалізу. – 2014. – № 2 (42). – С. 19-24.
3. Макеева Н.І. Ультразвукова характеристика структурно-тканинних змін єдиної нирки в дітей / Н.І. Макеева, Н.А. Підвальна // Педіатрія. – 2015. – № 2. – С. 40-42.
4. Марченко Т.В. Функціональне состояние единственной почки после нефрэктомии у живых доноров родственной почки: так ли все просто? / Т.В. Марченко, Ю.А. Морозов, Л.Г. Долецкая // Почка. – 2014. – № 1 (7). – С. 18-22.
5. Півторак В.І. Особливості структурних компонентів нефрона кіркової речовини єдиної нирки у нестатевозрілих щурів / В.І. Півторак, В.М. Монастирський // Галицький лікарський вісник – 2015. – Т. 22. Число 3, частина 2. – С. 43-46.
6. Adaptive hyperfiltration in the aging kidney after contralateral nephrectomy / A.B. Saxena, B.D. Myers, G. Derby [et al.] // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2006. – Vol. 291, № 3. – P. 629-634.
7. Donckerwolcke R.M. Adaptation of renal function after unilateral nephrectomy in children with renal tumors / R.M. Donckerwolcke, M.J. Coppes // Pediatr. Nephrol. – 2001. – Vol. 16, № 7. – P. 568-574.
8. Fujigaki Y. Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease / Y. Fujigaki // World J. Nephrol. – 2012. – Vol. 1, № 4. – P. 92-99.
9. Inui Y. Effects of aging and uninephrectomy on renal changes in Tsukuba hypertensive mice / YO. Inui, H. Mochida, F. Yamairi [et al.] // Biomed. Rep. – 2013. – Vol. 1, № 3. – P. 359-364.
10. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration / S.L. Lin, B. Li, S. Rao [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, № 9. – P. 4194-4199.
11. Mavinkurve-Groothuis A.M.C. Long-term follow-up of blood pressure and glomerular filtration rate in patients with a solitary functioning kidney: a comparison between Wilms tumor survivors and nephrectomy for other reasons / A.M.C. Mavinkurve-Groothuis, F. van de Kracht, R. Westland // Pediatr. Nephrol. – 2016. – Vol. 31. – P. 435-441.

УДК: 612.46:616.61-089.878:611.61.018

ЗМІНИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ КЛІТИН КІРКОВОЇ РЕЧОВИНИ НИРКИ ПІСЛЯ НЕФРЕКТОМІЇ КОНТРАЛАТЕРАЛЬНОЇ У СТАТЕVONEЗРІЛИХ ЩУРІВ

Півторак В. І., Монастирський В. М.

Резюме. У статті розглянуті особливості показників клітинного циклу клітин кіркової речовини єдиної нирки, що залишилася після нефректомії у **статевонезрілих щурів**. Встановлено, що кількість клітин у синтетичний період клітинного циклу (фазу S) зростає у найближчому післяопераційному періоді (7-14 діб) після нефректомії, в подальші терміни спостереження (30-90 діб) статистично значуще зменшується. Кількість клітин у фазах G0G1 та G2+M клітинного циклу у динаміці спостереження після нефректомії статистично значуще не змінювалась.

Ключові слова: єдина нирка, нефректомія, клітинний цикл, статевонезрілі щури.

УДК: 612.46:616.61-089.878:611.61.018

ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТЧНОГО ЦИКЛА КЛЕТОК КОРЫ ПОЧКИ ПОСЛЕ НЕФРЭКТОМИИ КОНТРАЛАТЕРАЛЬНОЙ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

Пивторак В. И., Монастырский В. Н.

Резюме. Статья посвящена особенностям клеточного цикла клеток коры единственной почки после нефрэктомии у неполовозрелых крыс. Выявлено увеличение количества клеток в синтетический период клеточного цикла (фазу S) непосредственно через 7-14 суток послеоперационного периода после нефрэктомии.

мии, в дальнейшем (30-90 суток) наблюдается статистически значимое уменьшение количества клеток в этой фазе. Количество клеток в фазах G0G1 и G2+M клеточного цикла после нефрэктомии статистически значимо не меняется.

Ключевые слова: единственная почка, нефрэктомия, клеточный цикл, неполовозрелые крысы.

UDC: 612.46:616.61-089.878:611.61.018

CHANGES CELL CYCLE KIDNEY CELLS CORTEX CONTRALATERAL AFTER NEPHRECTOMY IN IMMATURE RATS

Pivtorak V. I., Monastirskiy V. M.

Abstract. Introduction. The final stage of formation of the physiological mechanisms of the tubular nephron mammals of different species coincides with the formation of the reproductive system of the body. The cell cycle of cells of the cortex on single kidney, after the removal of the contralateral, in immature animals insufficiently studied.

The purpose of the study – to characterize of the cell cycle cells of single kidney after contralateral removal in immature rats in the experiment.

Materials and methods. Experimental study done 60 immature male rats weighing 85-130 grams. The data were compared with data obtained from intact animals of the same age (12 rats) and in mature animals (60 rats) weighing 155-220 grams, which left kidney was removed at the age of three to four months. All animals experimental group out under ketamine-anaesthesia performed surgery – nephrectomy of the left kidney. The animals were taken out of the experiment by intra-pleural administration of thiopental sodium 50 mg/kg every 7, 14, 21, 30, 90 days after nephrectomy. Maintenance and manipulation of animals is carried out in accordance with the «General ethical animal experimentation» adopted the first National Congress on Bioethics (Kyiv, 2001), also guided by the recommendations of the «European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes» (Strasbourg, 1985) and the provisions of the «Rules of preclinical safety evaluation of pharmacological agents (GLP)». The content of DNA in the nuclei of cells of rat kidney cortex is determined by flow cytometry. Suspensions nuclei of kidney cells were obtained using a special solution for the study of nuclear DNA CyStain DNA Step 1 from Partec, Germany, which allows you to quickly and simultaneously perform the extraction of cores and label a 4', 6-diamidino-2-phenylindole nuclear DNA (DAPI), which is part of it.

Results and discussion. Experimental study immature male rats showed, that compared to intact animals statistically significant (33.6%) increase in the number of cells in S-phase at the seventh postoperative day. A statistically significant increase in cell 14 day continued by 14.8% compared to intact animals. In the future, the number of cells in S phase decreased. Compared to intact animals at 30, 60, 90 days the cells in this phase was less by 13.2%, 22.0%, 40.0% respectively. Comparing the distribution of nuclei in the kidney cortex cell cycle of immature and mature animals showed that the number of cells in S phase 7 and 14 days was statistically significantly higher (by 23.6% and 17.5% respectively) in immature.

Conclusions. An increase in number of cells in synthetic period of the cell cycle (phase S) directly over postoperative days 7-14 after nephrectomy later (30-90 days) there is a statistically significant decrease in the number of cells in this phase. The number of cells in the G0G1 phase and G2+M cell cycle after nephrectomy was not significantly changed.

Keywords: single kidney, nephrectomy, cell cycle, immature rats.

*Рецензент – проф. Проніна О. М.
Стаття надійшла 18.03.2016 року*