Дата публикации: 01.09.2022
DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_03_27
УДК 612.1/.8

Publication date: 01.09.2022
DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_03_27
UDC 612.1/.8

ВЫЯВЛЕНИЕ СЕНЕСЦЕНТНЫХ КЛЕТОК В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ИММУНОСУПРЕССИВНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Е.В. Тризно, Д.Р. Давыдова, М.Н. Тризно, И.А. Беднов
ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава РФ, г. Астрахань, Россия

Аннотация. В статье описаны физиологические аспекты иммуно-опосредованного формирования сенесцентных клеток в почках и почечных сосудах. Описаны структурные нарушения в паренхиме во взаимосвязи с местными показателями сенесцентно-ассоциированного фенотипа — липофусцином, интерлейкином-6 и гуморальными факторами системы иммунитета: системой комплемента и иммуноглобулинами A, M и G. Использование в эксперименте молодых (6 месяцев) и старых крыс (24 месяца) позволило раскрыть возрастные особенности полученных результатов. В процессе ингибирования клеточного звена иммунитета нефротоксической циклоспориновой моделью активируется система комплемента, увеличивается содержание IgM и G и формируются сенесцентные клетки, особенно у старых животных.

Ключевые слова: сенесцентные клетки, липофусцин, интерлейкин, почки, крысы, иммуносупрессия.

DETECTION OF SENESCENT CELLS IN RAT KIDNEYS WITH IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS

E.V. Trizno, D.R. Davydova, M.N. Trizno, I.A. Bednov
Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Annotation. The article describes the physiological aspects of immune mediated formation of senescent cells in the kidneys and renal vessels. Structural disorders in the parenchyma are described in relation to local indicators of the senescence associated secretory phenotype – lipofuscin, interleukin-6 and humoral factors of the immune system: complement cascade and immunoglobulins A, M and G. The use of young (6 months) and old rats (24 months) in the experiment allowed us to reveal the age features of the results obtained. In the process of inhibition of the cellular link of immunity with the model of cyclosporine nephrotoxicity, the complement cascade is activated, the content of IgM and G increases and senescent cells are formed, especially in old animals.

Keywords: senescent cells, lipofuscin, interleukin, kidneys, rats, immunosuppression.

Введение. Почки, как главный экскреторный орган, являются мишенью для многих токсических веществ, поэтому, наряду с иммунной системой, отвечают за гомеостатическое равновесие в организме и одними из первых реагируют на экзогенные воздействия. Особенно значимым в развитии ренальной дисфункции является возрастной фактор. Известно, что старение – это развивающийся с возрастом биологический разрушительный процесс, приводящий к нарушению адаптивных и компенсаторных механизмов, развитию возрастной патологии, часто затрагивающей сосудистый и нефротический компоненты в цепи кардиоренального континуума [1-3].

Многочисленными исследованиями установлено, что одним из пусковых факторов возникновения патологических процессов в сосудистой стенке является дисфункция сосудистого эндотелия. Длительное существование дисбаланса основных вазоактивных веществ на уровне эндотелиальной клетки способствует формированию гиперплазии и гипертрофии гладкомышечных клеток стенки сосудов.

Это приводит к ремоделированию мышечной оболочки артерий и сопровождается нарушением эластических свойств [3-4].

В свою очередь, структурные нарушения сосудистой оболочки с возрастом ведут к дисфункции сосудистого эндотелия и изменению реологических и гемостазиологических свойств крови [5]. Такие возрастные изменения в почках, как обширный фиброз, потеря способности к регенерации, усиление апоптоза выраженно коррелируют с увеличением образования в почках пероксида водорода [6], усиленным образованием гликозилированных продуктов, усиленным апоптозом и повышенным отложением липофусцина [7-8]. Накопление в клетках так называемого «пигмента старения» в виде гранул липофусцина, вероятно, связано с активацией свободнорадикального перекисного окисления [9-10]. Супероксидный радикал, являющийся восстановителем, инициирует реакции, в которых образуются гидроксильные радикалы, пероксид водорода и пероксиды липидов [11].

Для острых и хронических повреждений почек весьма значимыми факторами риска являются старение и неспецифическое воспаление [12-15]. В последнее время в литературе появляются данные об участии в механизмах старения сенесцентных клеток (СК). Не исключают, что в развитии возрастзависимой патологии почечной гемодинамики СК играют значимую роль [16-20]. Итак, СК – это непролиферирующие клетки, игнорируемые иммунной системой, но метаболически активные, секреторный фенотип у которых ассоциирован с клеточным старением (senescence associated secretory phenotype, SASP). Предполагают, что остановка митоза данных клеток происходит в фазе G0-G1 клеточного цикла. СК выделяют целый ряд активных молекул: различные факторы роста (инсулиноподобный IGFBPs, эпидермальный EGF и др.), цитокины (IL-6, IL-1β и др.), хемокины (IL-8, моноцитарный хемотаксический белок MCP-2 и др.), матриксные металлопротеазы (MMPs) и компоненты внеклеточного матрикса (коллагены, фибронектин, ламинин) – около 40 молекул. Некоторые из этих молекул являются постоянными составляющими SASP, несмотря на разнородность сенесцентных клеток, и используются в качестве маркёров сенесценции, например, IL-6, IL-8, липофусцин [21]. Секретируемые СК активные молекулы попадают во внеклеточное пространство и, воздействуя на соседние нормальные клетки, инициируют остановку клеточного цикла и пролиферации, что в значительной степени ускоряет развитие клеточного старения в тканях. Указанные изменения связаны с развитием целого ряда возрастных патологий: сердечно-сосудистой, резистентностью к инсулину, диабетом, и возрастным иммунодефицитом [8, 22, 23]. Последнее, вероятно, связано с перегрузкой организма стареющими клетками и перепроизводством Т-киллеров, нацеленных на СК в ущерб другим видам иммунных клеток. Поэтому для раскрытия иммуномодуляторных свойств СК и взаимосвязи супрессии Т-лимфоцитарного звена с нефропатологией нами было проведено данное исследование с учётом возрастного аспекта.

Методы и организация исследования. Для эксперимента использованы белые беспородные крысы массой тела 195-210 г., составившие две контрольные группы, по 12 крыс в каждой, и две опытные группы по 19 животных. Одна из двух контрольных и опытных групп состояла из молодых, 6-месячных крыс, вторая – из старых, 24-месячных. Иммуносупрессирующий эффект достигался с помощью Циклоспорина (препарат Сандиммун-Неорал, Novartis, Швейцария), который вводили крысам опытной группы в дозе 20 мг/кг массы тела 25 дней. Все животные перед началом исследования содержались на карантине для физиологической адаптации к условиям вивария и исключения больных особей. В работе мы руководствовались «Положением о содержании и использовании лабораторных животных в ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России» и

рекомендациями Commission of the European Communities, 86/609/EEC. Микропрепараты ткани и артерий (ПА) почки гистохимическим способом окрашивали гематоксилин-эозином, затем – Суданом чёрным и исследовали с помощью флуоресцентного тринокулярного микроскопа с CMOS-камерой (Meiji Mechno MT6300, Япония). Судан чёрный Б применяли для визуализации липофусцина. Белки системы комплемента C3, C4 и иммуноглобулины (Ig) A, M, G определяли в плазме, а интерлейкин-6 – в гомогенате ткани почек с помощью ИФА-наборов (Cloud-Clone Corp., США). Плазму крови у крыс забирали из нижней полой вены под общим наркозом (тиопентал натрия). Статистические вычисления проведены с использованием критерия Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения. При проверке значимости различий в независимых группах применён критерий Манна-Уитни, зависимых – Вилкоксона. Обрабатывали вычисления с помощью статистического пакета Excel и программного обеспечения Statistica, версия 12.0. Критический уровень статистической значимости составлял $p=0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Гистохимическое окрашивание препаратов животных опытных групп выявило скопление клеток с включениями тёмно-коричневого цвета – липофусцином в эпителии канальцев, как коркового, так и мозгового вещества почек, у молодых крыс наблюдались единичные гранулы пигмента (рис. 1).

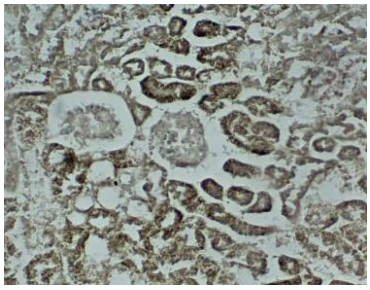


Рис. 1. Почечная паренхима. Окраска – Судан чёрный Б. Увеличение 200х. Интенсивное окрашивание эпителия канальцев как результат высокого содержания липофусцина

У старых животных значительное количество гранул визуализировалось в ткани почек, преимущественно – в мезангиальных и клетках канальцев нефронов. В гистопрепаратах почечной артерии концентрация клеток с содержанием липофусцина в опытной группе молодых крыс преобладала в гладкомышечном слое, а у старых – в эндотелиальном (рис. 2).

Влияние препарата на вазоконстрикцию афферентных артериол. Очаговые сосудистые повреждения микроциркуляторного пула. Наблюдалась мезангиальная клеточная пролиферация (рис. 3).

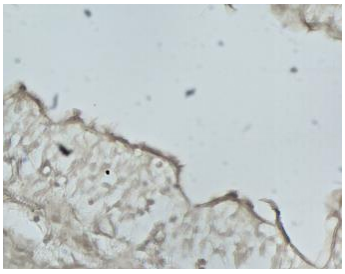


Рис. 2. Участок стенки почечной артерии. Увеличение 400х. Окраска – Судан чёрный Б. Интенсификация окраски в эндотелиальном слое

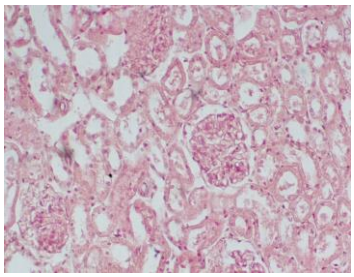


Рис. 3. Почечная паренхима. Окраска – гематоксилин-эозин. Увеличение 200х. Избыточная пролиферация мезангия клубочков

Почечная интерстициальная ткань и мелкие сосуды подверглись изменениям в результате острого нефротоксического эффекта. На фоне нормального и плотного расположения канальцев в толще коркового вещества у опытных крыс наблюдалось распространение фиброза и клеточного инфильтрата между канальцами. В гломерулярном сосудистом полюсе были обнаружены повреждения в афферентных и эфферентных артериолах, менее выраженные у крыс молодого возраста опытной группы. Большинство эпителиальных клеток в канальцах были сохранены, имелись лишь разрушения их апикальных участков.

Липофусцин и цитокин Il-6 являются компонентами сенесцентного фенотипа, распространяющегося СК. В гомогенате ПА опытных групп крыс содержание провоспалительного цитокина Il-6 было выше, чем у контрольных. Причём у старых – на 32% ($p \leq 0,001$), у молодых – на 21% ($p \leq 0,05$). Данные гуморальных факторов системы иммунитета, полученные в оптических плотностях, пересчитаны в соответствующие концентрации веществ (мг/дл). Среди иммуноглобулинов стасистически значимо изменился уровень классов M и G в группах опытных животных. У молодых – в большей степени IgM – на 17% ($p \leq 0,05$), а у старых – IgG – на 22% ($p \leq 0,01$) по сравнению с контролем. Данный факт говорит об активации адаптивного гуморального звена иммунитета.

Содержание С4-компонента комплемента увеличилось в группе молодых на 19% ($p \leq 0,05$) и на 17% ($p \leq 0,01$) – в группе старых животных по сравнению с контролем. Весьма значимо возрос уровень С3-компонента у опытных особей, причём у крыс старческого возраста – на 56% ($p \leq 0,001$), а у молодых – на 41% ($p \leq 0,001$) по сравнению с контрольными.

Все пути активации системы комплемента: и классический, и альтернативный, и лектиновый объединяются на уровне С3-компонента, приводя к генерации мембранатакующего комплекса через общий для всех них терминальный путь активации. Альтернативный путь начинается с компонента С3. И один, и другой белок является фактором острой фазы воспаления, активирующим иммунную реакцию. Значительной динамикой в эксперименте отличился С3-компонент комплемента. Можно сказать, что циклоспориновый этиологический фактор способствует формированию СК и сопровождается нарушением гомеостаза организма лабораторных крыс. Пребывая в статусе профессиональных маскировщиков и изменяя морфофункциональный статус клеток вокруг себя, СК, тем не менее, активируют иммунокомпетентные клетки, ответственные за иммуноглобулиновый и цитокиновый статус. Распространение негативного сенесцентного фенотипа происходит при обязательном взаимодействии с интегральной системой комплемента, активация которого особенно активно происходит по альтернативному пути.

Заключение. У лабораторных крыс выявлена ассоциация между иммуносупрессией Т-клеточного звена иммунитета и формированием СК. Определены

возрастные особенности морфофункциональных изменений на уровне почечной ткани, почечных артерий и плазмы крови крыс. В частности, накопление СК в сосудистом русле и мезангиальных клетках клубочков выражено в большей степени у старых крыс, ввиду ориентированности на клеточный адаптационный иммунитет в большей степени, чем у молодых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lombardo, R. Nocturia: The Complex Role of the Heart, Kidneys, and Bladder / R. Lombardo, A. Tubaro, F. Burkhard // Eur Urol Focus. – 2020. – № 6(3). – pp. 534-536.
2. Goyal, P. Cardiac Ultrasound for the Nephrologist: Know Thy Heart to Know Thy Kidneys / P. Goyal, J. Minardi, A. Sakhuja // Adv Chronic Kidney Dis. – 2021. – № 28(3). – pp. 208-217.
3. Endothelial Dysfunction Accelerates Impairment of Mitochondrial Function in Ageing Kidneys via Inflammasome Activation / Wada Y., Umeno R., Nagasu H. [et al] //Int J Mol Sci. – 2021. – № 22(17). – P. 9269.
4. Zannad, F. Cardiorenal Syndrome Revisited / F. Zannad, P. Rossignol // Circulation. – 2018. – № 138(9). – pp. 929-944.
5. Состояние системы гемостаза у крыс после хронической интоксикации сероводородсодержащим газом / Н.Н. Тризно, Е.В. Голубкина, М.Н. Тризно, О.С. Дюкарева // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 4. – С. 75. [In English] Trizno N.N., Golubkina E.V., Trizno M.N., Dyukareva O.S. The hemostasis system condition in rats after chronic intoxication of hydrogen sulphide-containing gases. *Modern problems of science and education*, 2017, no. 4, p. 75
6. Li, X. Amino Acid Metabolism in the Kidneys: Nutritional and Physiological Significance / X. Li, S. Zheng, G. Wu // Adv Exp Med Biol. – 2020. – Vol. 1265. – pp .71-95.
7. Влияние процессов пероксидации в тромбоцитах на систему гемостаза при воздействии сероводородсодержащего газа / Голубкина Е. В., Дюкарева О. С., Тризно Н. Н. [и др.] // Журнал медико-биологических исследований. – 2019. – Т. 7. – № 1. – С. 40-48. [In English] Golubkina E.V., Dyukareva O.S., Trizno N.N., Udochkina L.A., Trizno M.N. The effects of peroxidation processes in platelets on haemostasis under exposure to hydrogen sulfide-containing gas. *Journal of Medical and Biological Research*, 2019, vol. 7, no.1. pp. 40-48.
8. Histopathology of the Liver, Kidney, and Spleen of Mice Exposed to Gold Nanoparticles / K. Ibrahim, M. Al-Mutary, A. Bakhiet, H. Khan // Molecules. – 2018. – № 23(8). – P. 1848.
9. High salt-induced weakness of anti-oxidative function of natriuretic peptide receptor-C and podocyte damage in the kidneys of Dahl rats / Zhu X. L., Zhang T., Xu Z. Q. [et al] // Chin Med J (Engl). – 2020. – № 133(10). – pp. 1182-1191.
10.Age-dependent transcriptional alterations in cardiac endothelial cells / Emechebe U., Nelson J. W., Alkayed N. J. [et al]// Physiol Genomics. – 2021. – № 53(7). – pp. 295-308
11.Cooper, D. K. C. The first clinical trial-Kidney or heart? / D. K. C. Cooper, D. C. Cleveland // Xenotransplantation. – 2021. – № 28 (1). – P. 12644.
12.Association of Ancillary Pathology Findings in Non-neoplastic Renal Parenchyma and Renal Outcomes of Robotic-Assisted Partial Nephrectomy / Geldmaker L. E., Kahn A. E., Parikh K. A. [et al] // Front Surg. – Apr 16, 2021. – № 8. – pp. 652-524.
13.Age–related changes in DNA methylation affect renal histology and post-transplant fibrosis / Heylen L., Thienpont B., Busschaert P. [et al]// Kidney Int. – 2019. – № 96(5). – pp. 1195-1204
14.Reference ranges for ultrasonographic renal dimensions as functions of age and body indices: A retrospective observational study in Taiwan / Su H. A., Hsieh H. Y., Lee C. T. [et al] // PLoS One. – 2019. – № 11. – P. 224785.
15.The bystander effect contributes to the accumulation of senescent cells in vivo / da Silva P. F. L., Ogrodnik M., Kucheryavenko O. [et al] // Aging Cell. – 2019. – Vol. 1. – № 18. – P. e12848.
16.Quantitative identification of senescent cells in aging and disease / Biran A., Zada L., Abou Karam P. [et al] // Aging Cell. – 2017. – № 16 (4). – pp. 661-671.
17.Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury / Calcinotto A., Kohli J., Zagato E. [et al] // Physiol Rev. – 2019. – № 99(2). – pp. 1047-1078.
18.von Kobbe C. Targeting senescent cells: approaches, opportunities, challenges / C. von Kobbe // Aging (Albany NY). – 2019. – № 11(24). – pp. 12844-12861.
19.Голубкина Е.В. Нарушения иммунного гомеостаза в возрастном аспекте / Е. В. Голубкина, М. Н. Тризно // Цитокины и воспаление. – 2019. – Т.18. – № 1-4. – С. 22-27. [In English] Golubkina E.V., Trizno M.N. Disorders of immune

homeostasis in the age aspect. *Cytokines and Inflammation*, 2019, vol. 18, no. 1-4, pp. 22-27.
20.Nagashima R. The Roles of Kidney–Resident ILC2 in Renal Inflammation and Fibrosis // R. Nagashima, M. Iyoda // Front Immunol. – 2021. – № 12 – P. 688647.
21.Москалёв А. А. Молекулярные биомаркёры старения для превентивной медицины / А. А. Москалёв // Вестник восстановительной медицины. – 2017. – № 1. – С. 18-29. [In English] Moskalyov A.A. Molecular biomarkers of aging for preventive medicine. *Bulletin of Rehabilitation Medicine*, 2017, no.1, pp. 18-29.
22.Comparative Histological Subtyping of Immune Cell Infiltrates in MPO-ANCA and PR3-ANCA Glomerulonephritis / Hakroush S., Tampe D., Ströbel P. [et al] // Front Immunol. – 2021. – № 12. – P. 737708
23.Lipofuscin causes atypical necroptosis through lysosomal membrane permeabilization / Pan C., Banerjee K., Lehmann G. L. [et al] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2021. – № 118(47). – P. 2100122118.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:
Екатерина Валерьевна Тризно – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры Патологической физиологии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, e-mail: neiron-2010@mail.ru.
Диана Рафаиловна Давыдова – ассистент кафедры Патологической физиологии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, e-mail: diana.davydova84@mail.ru.
Матвей Николаевич Тризно – кандидат медицинских наук, доцент кафедры Нормальной и патологической анатомии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, e-mail: pakotm@yandex.ru.
Игорь Анатольевич Беднов – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры Патологической физиологии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, e-mail: bednovia@yandex.ru.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Ekaterina Valer'evna Trizno – Associate Professor, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of Pathological Physiology, Astrakhan State Medical University, 414000, Bakinskaia st., 121, Astrakhan, e-mail: neiron-2010@mail.ru.
Diana Rafailovna Davydova – Assistant at the Department of Pathological Physiology, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: diana.davydova84@mail.ru.
Matvej Nikolaevich Trizno – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of Pathological Physiology, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: pakotm@yandex.ru.
Igor' Anatol'evich Bednov – Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer at the Department of Pathological Physiology, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: bednovia@yandex.ru.

Для цитирования: Выявление сенесцентных клеток в почках крыс при иммунопрессивном воздействии / Е.В. Тризно, Д.Р. Давыдова, М.Н. Тризно, И.А. Беднов // Современные вопросы биомедицины. – 2022. – Т.6. – № 3. DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_03_27

For citation: Trizno E.V., Davydova D.R., Trizno M.N., Bednov I.A. Detection of senescent cells in rat kidneys with immunosuppressive effects. *Modern Issues of Biomedicine*, 2022, vol. 6, no. 3. DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_03_27