

В. А. Гусева, Т. Ш. Кузнецова, Б. С. Семенов

Использование маркера пролиферации Ki-67 для оценки регенерации сухожилий у кроликов в эксперименте

Аннотация.

Цель — оценка влияния тромбоцитарной аутоплазмы на заживление поврежденных сухожилий у кроликов.

Материалы и методы. Исследование о влиянии тромбоцитарной аутоплазмы на регенерацию поврежденной сухожильной ткани было проведено на кроликах.

В эксперименте кроликам наносили раны в области ахиллова сухожилия, так как это сухожилие у животных травмируется довольно часто [1]. Затем в область повреждения сухожилия подопытной группы кроликов вводили ТАП, в то время как травмированные сухожилия кроликов контрольной группы оставляли без лечения. На раны в области кожи накладывали внутрикожный шов. Через месяц у животных подопытной и контрольной групп брали образцы сухожильной ткани в местах повреждений для проведения иммуногистохимического исследования с помощью маркера Ki-67, что позволило наглядно продемонстрировать действие тромбоцитарной аутоплазмы на регенерацию поврежденных сухожилий.

Результаты. Маркер пролиферации Ki-67 позволил наглядно выявить влияние ТАП на регенерацию при повреждении сухожильной ткани у кроликов. В поврежденных сухожильных тканях у кроликов пролиферативные процессы идут активнее, чем в здоровой сухожильной ткани. Благодаря проведенным исследованиям установлено, что ТАП стимулирует пролиферативные процессы в тканях сухожилий. Индекс пролиферации выше в тканях сухожилий подопытной группы кроликов, которым вводили ТАП, чем в контрольной группе и в здоровой сухожильной ткани.

Ключевые слова: регенерация тканей, сухожилия, кролики, Ki-67, тромбоцитарная аутоплазма.

Авторы:

Гусева В. А. — кандидат ветеринарных наук; ORCID 0000-0003-1373-5762; e-mail: hauteecole90@mail.ru;

Кузнецова Т. Ш. — кандидат биологических наук; ORCID: 0000-0002-8981-0696; e-mail: kuznett@ya.ru;

Семенов Б. С. — доктор ветеринарных наук, профессор; ORCID: 0000-0003-0149-9360; e-mail: bsstepana@rambler.ru.

«Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»; 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская ул., 5.

Введение. Повреждения сухожилий конечностей у животных диагностируются довольно часто. Риск травматизации сухожилий особенно повышается с возрастом, так как снижается прочность сухожилия. Поперечное сечение сухожилия увеличивается до момента созревания скелета, в последующем модуль эластичности сухожилия наибольшего размера достигает в период зрелости и снижается к старости. Старение сопровождается уменьшением содержания коллагена, протеогликанов и водного компонента и проявляется уменьшением объема, истончением сухожилия и большей подверженности повреждениям [1-6].

Тромбоцитарная аутоплазма является стимулятором регенерации поврежденных тканей и применяется с этой целью в медицине человека, в том числе и при лечении травмированных сухожилий.

Тромбоциты крови при их введении в ткани организма стимулируют регенерацию поврежденных тканей за счёт выделения факторов роста [7]. Многие врачи, как гуманной, так и ветеринарной медицины отмечают значимые улучшения при применении ТАП, которые подтверждаются данными УЗИ. Однако в литературе встречается немного фундаментальных исследований, раскрывающих действие ТАП.

Для оценки пролиферативной активности клеток часто используется ядерный негистоновый белок Ki-67, который определяется иммуногистохимическим методом [8, 9]. Согласно литературным данным количественная оценка экспрессии Ki-67 широко применяется в гистопатологии рака у человека и животных [10, 11]. В недавних исследованиях были выяснены многие молекулярные

функции этого белка. Ki-67 играет роль как в межфазных, так и в митотических клетках, и его клеточное распределение резко меняется во время клеточного цикла. Например, во время интерфазы Ki-67 необходим для нормального клеточного распределения антигенов гетерохроматина и для ядрышковой ассоциации гетерохроматина. Во время митоза Ki-67 необходим для образования перихромосомного слоя (PCL) — рибонуклеопротеиновой оболочки, покрывающей конденсированные хромосомы. В этой структуре Ki-67 действует, чтобы предотвратить агрегацию митотических хромосом. По последним данным Ki-67 принадлежит активная роль в кластеризации хромосом во время митотического цикла, что способствует восстановлению компартментации эукариотических клеток после открытого митоза.

Также была показана повышенная экспрессия Ki-67 у крыс после активации клеток обонятельной луковицы нейропептидом TKPRPGP [12]. Очевидно, что Ki-67 является универсальным маркером регенерации и таким образом с его помощью можно оценить регенерацию повреждённых сухожилий.

В связи с вышеизложенным была определена **цель** исследования — оценить влияние тромбоцитарной аутоплазмы на заживление повреждённых сухожилий у кроликов. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: определить индекс пролиферации Ki-67 в биоптатах сухожильной ткани у подопытных кроликов и получить данные по изменению индекса пролиферации при применении ТАП.

Материалы и методы. В эксперименте использовали кроликов породы серый великан. По принципу аналогов были сформированы подопытная и контрольная группы животных. В каждой группе было по 3 кролика, все кролики были самцы, возраст 7 месяцев, некастрированные. Кроликам наносили раны в области ахиллова сухожилия. Для проведения хирургического вмешательства предварительно ставили внутривенный катетер в плечеголовную вену, осуществляли вводную внутривенную анестезию пропофолом (20 мг\мл), препарат разводили физиологическим раствором в соотношении 1:4 и вводили анестетик из расчёта 1 мл на кг массы. Далее проводили поддерживающую анестезию газом — изофлураном. Дополнительно выполняли инфильтрационную анестезию по линии разреза 2% раствором лидокаина. Осуществляли подготовку операционного поля в области голени по общепринятым правилам асептики и антисептики: удаляли шерстный покров, раствором Бетадина обрабатывали операционное поле и проводили его изоляцию хи-

рургическим бельём. Одноразовым скальпелем проводили разрез кожи, затем иссекали полоску на ахилловом сухожилии длиной 5 мм, шириной 2 мм и глубиной 2 мм в средней его части с латеральной стороны в области сухожильно-мышечного перехода, ближе к его сухожильной части.

После чего кроликам подопытной группы в области раны ахиллова сухожилия вводили ТАП в объёме 0,5 мл под дно раневой поверхности. Предварительно ТАП готовили следующим способом. Отбирали кровь из плечеголовной вены в пробирки «Плазмолифтинг» по 9 мл. Далее центрифугировали на центрифуге 80 2s в течении 5 минут со скоростью 3,5 тыс. оборотов в минуту. В процессе центрифугирования разделительный гель отделял плазму с тромбоцитами от остальных форменных элементов. Далее ТАП извлекали в шприц и вводили под дно раны сухожилия в объёме 0,5 мл. На рану области ахиллова сухожилия швы не накладывали, а рану кожи закрывали внутрικοжным швом нитью ПГА 3-0 на режущей игле. В рану сухожилия у кроликов контрольной группы ТАП не вводили, а просто зашивали кожную рану аналогичным способом, как и у подопытной группы кроликов.

Для получения более полной картины о регенерации сухожильной ткани окраске подвергали и здоровую сухожильную ткань кроликов, которую получали в процессе нанесения ран сухожилий у животных подопытной и контрольной групп.

Через 1 месяц после проведения операции брали биоптаты ахиллова сухожилия у кроликов подопытной и контрольной групп в области нанесения ран. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов [1], после чего по общепринятой методике заливали в парафин [6]. Затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, в которых иммуногистохимически (ИГХ) выявляли экспрессию маркера Ki-67.

Анализ иммуногистохимических препаратов проводился при помощи светооптического микроскопа CarlZeissPrimoStar (Германия) при увеличении 40, 100 и 400. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры AxioCamERc 5s и программного обеспечения AxioVisionRel. 4.8 (Германия).

При иммуногистохимическом исследовании использовали первичные моноклональные мышиные антитела к Ki-67 производства фирмы Abcam в рабочем разведении 1:100 по стандартному протоколу. Выявление продуктов реакции проводилось EnVision+SystemLabeledPolymer-HRPAnti-Mouse (K4001) (Dako, Дания). Выявление пероксидазной активности осуществляли с по-

мощью 3,3-диаминобензидина, препараты докрашивали толлуидиновым синим. Оценку экспрессии проводили тотально в областях с проявлением окрашивания от слабого до выраженного. При проведении иммуногистохимического исследования были поставлены реакции положительного и отрицательного контроля [2, 13].

Для понимания объективности и достоверности была проведена морфометрия маркера Ki-67 во всех отобранных образцах. Морфометрические измерения проводили с помощью программного обеспечения Image J. При этом определяли индекс пролиферации в зонах регенерации сухожилий (сухожильно-мышечный переход, эпитеионий).

Индекс пролиферации Ki-67 рассчитывали по формуле:

$$\text{Индекс Ki67} = (\text{NKi67} / \text{Nя}) \times 100,$$

где NKi-67+ — количество меченых ядер, Nя — общее число ядер в поле зрения.

Полученные данные были подвергнуты статистическому анализу. Для всех данных применена описательная статистика: данные проверены на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением n представлены в итоговых таблицах. Межгрупповые различия анализировали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. Различия определены при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, Россия).

Результаты и обсуждение. Иммуногистохимическое исследование экспрессии маркера Ki-67 показало наиболее высокую пролиферативную активность в зоне сухожильно-мышечного перехода и в эпитеионии сухожилий у кроликов подопытной группы по сравнению с контрольной группой. В здоровой сухожильной ткани индекс пролиферации составил $5,8 \pm 1,6$ в области сухожильно-мышечного перехода и $3,0 \pm 0,6$ в эпитеионии.

В тканях сухожилий подопытной группы кроликов выявлены наиболее высокие значения ин-

декса пролиферации, статистически значимо превышающие таковые у животных контрольной группы и в исходных образцах здоровой ткани. Индекс пролиферации составил $45,2 \pm 1,7$ в области сухожильно-мышечного перехода и $22,5 \pm 3,5$ в эпитеионии.

Индекс пролиферации у животных контрольной группы составил $30,2 \pm 4,6$ в области сухожильно-мышечного перехода и $9,5 \pm 2,2$ в эпитеионии. Таким образом индекс пролиферации у кроликов контрольной группы выше, чем в здоровой сухожильной ткани и значительно ниже, чем в подопытной группе (табл. 1).

Также данные индекса пролиферации представлены на графике (рис. 1)

При подсчёте иммунопозитивных клеток в здоровой сухожильной ткани подопытных кроликов отмечалась наиболее низкая пролиферативная активность: среднее количество клеток в поле зрения при увеличении 400 составило $2,2 \pm 0,8$ (в области сухожильно-мышечного перехода) и $3,8 \pm 1,1$ (в эпитеионии).

Так, среднее количество иммунопозитивных клеток в поле зрения у кроликов подопытной группы составило $78,0 \pm 2,7$ (в области сухожильно-мышечного перехода) и $21,6 \pm 3,6$ (в эпитеионии).

У кроликов контрольной группы количество иммунопозитивных клеток в поле зрения у контрольных кроликов составило $46,6 \pm 9,5$ (в области сухожильно-мышечного перехода) и $11,0 \pm 1,9$ (в эпитеионии) (рис. 2).

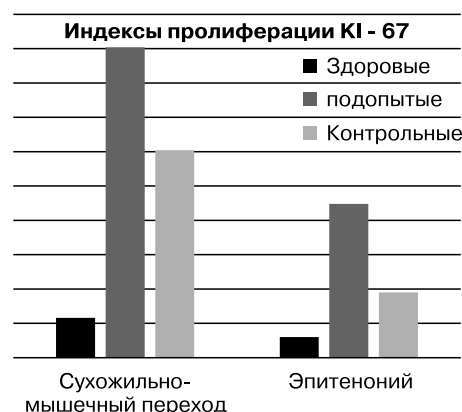


Рис. 1. Индекс пролиферативной активности ($I_{\text{Ki-67}}$)

Таблица 1. Индекс пролиферативной активности ($I_{\text{Ki-67}}$)

Показатель	Здоровая сухожильная ткань	Подопытная группа	Контрольная группа
Сухожильно-мышечный переход	$5,8 \pm 1,6^*$	$45,2 \pm 1,7^{**}$	$30,2 \pm 4,6^*$
Эпитеионий	$3,0 \pm 0,6^*$	$22,5 \pm 3,5^{**}$	$9,5 \pm 2,2^*$

Примечание: * — $p < 0,05$, статистически значимое отличие от интактного кролика, тест Тьюки,

• — $p < 0,05$, статистически значимое отличие от контрольной группы, тест Тьюки.

В здоровой сухожильной ткани подопытных кроликов отмечалась наиболее низкая пролиферативная активность: среднее количество иммунопозитивных клеток в поле зрения при увеличении 400 составило $2,2 \pm 0,8$ (в области сухожильно-мышечного перехода) и $3,8 \pm 1,1$ (в эпитеении).

Среднее количество иммунопозитивных клеток в поле зрения у кроликов подопытной группы составило $78,0 \pm 2,7$ (в области сухожильно-мышечного перехода) и $21,6 \pm 3,6$ (в эпитеении).

У кроликов контрольной группы количество иммунопозитивных клеток в поле зрения у контрольных кроликов составило $46,6 \pm 9,5$ (в обла-

сти сухожильно-мышечного перехода) и $11,0 \pm 1,9$ (в эпитеении) (рис. 2).

Заключение. Маркер пролиферации Ki-67 позволил наглядно выявить влияние ТАП на регенерацию при повреждении сухожильной ткани у кроликов. В поврежденных сухожильных тканях у кроликов пролиферативные процессы идут активнее, чем в здоровой сухожильной ткани. Благодаря проведенным исследованиям установлено, что ТАП стимулирует пролиферативные процессы в тканях сухожилий. Индекс пролиферации выше в тканях сухожилий подопытной группы кроликов, которым вводили ТАП, чем в контрольной группе и в здоровой сухожильной ткани.

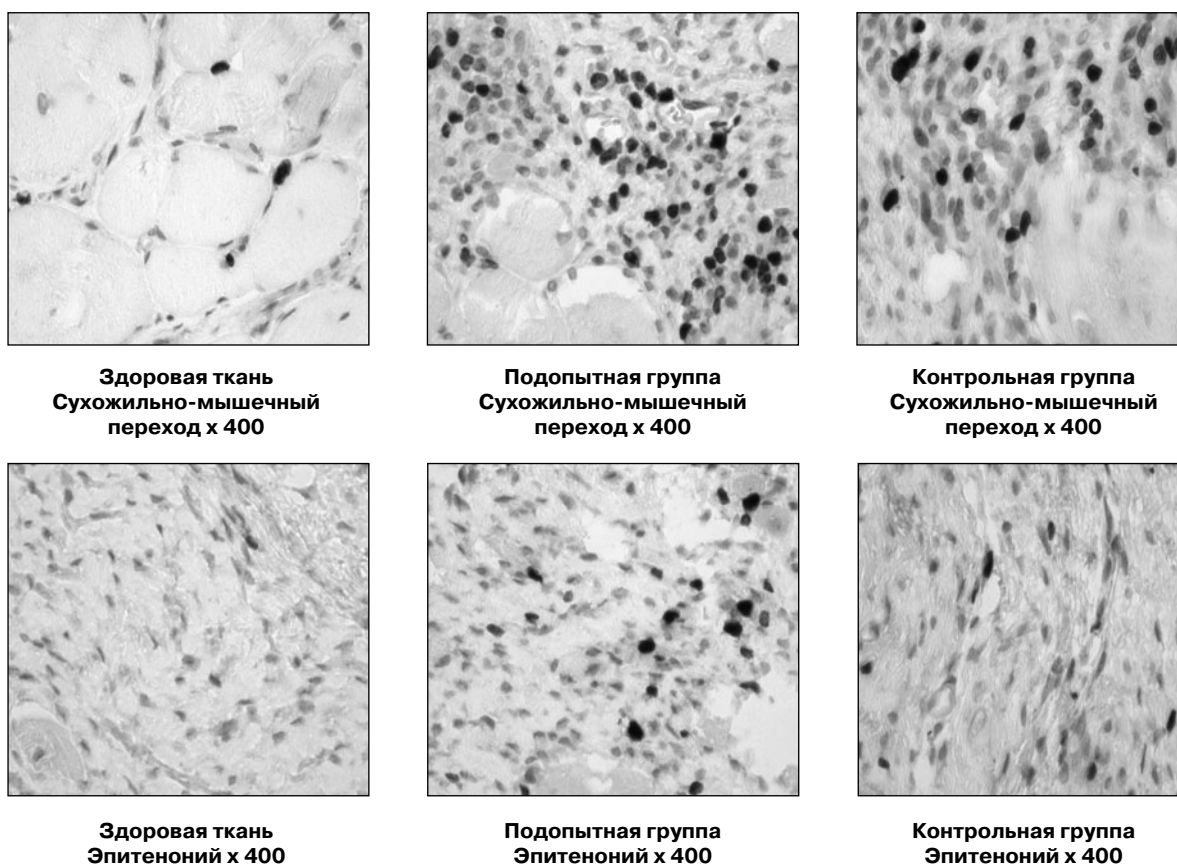


Рис. 2. Сухожилия кроликов. Экспрессия маркера Ki-67. Продукты иммуногистохимической реакции окрашены в коричневый цвет

Литература

1. Иванов А. В. Современные представления о механизмах репаративной регенерации ахиллова сухожилия после его разрыва / А. В. Иванов, Д. В. Козлов // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2015. — Т. 14. — № 4. — С. 74–79.
2. Гуцин Я. А. Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных / Я. А. Гуцин, А. А. Мужикян // Международный вестник ветеринарии. — 2014. — № 3. — С. 88–95.
3. Иванов А. В. Анализ морфофункциональных особенностей различных зон сухожильного комплекса фибробластическую фазу репаративной регенерации / А. В. Иванов // Вестник новых медицинских технологий. — 2018. — № 3. — С. 166–170.

4. Roshini S. T. Autologous platelet rich plasma for regeneration of tendon injuries in horses / S. Tina Roshini, A. Arunprasad, B. Justin William, K. Jeyaraja and K. Priyadharshini // Indian J. Anim. Res. doi: 10.18805/ijar.B-3653.
5. Прощаев К. И. Клиническая геронтология / К. И. Прощаев, А. Н. Ильницкий, С. Г. Горелик // Геронтология. — 2013. — № 4.
6. Пастух В. В. Профилактика посттравматического спаечного процесса вокруг сухожилий. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. — 2015.
7. Семенов Б. С., Гусева В. А., Рыбин Е. В., Кузнецова Т. Ш., Гладких Е. С. Применение тромбоцитарной аутоплазмы при лечении сухожильно-связочного аппарата лошадей. — Учебное пособие. — 2018.
8. Иванов А. А. Индекс Ki-67 и тип экспрессии HSP70 в формировании прогностических групп пациентов с папиллярным раком щитовидной железы / А. А. Иванов, А. М. Авдалян, Е. Л. Лушникова // Российский онкологический журнал. — 2018. — № 2(23). — С. 90–94.
9. Лазукин А. В. Фактор пролиферации как показатель прогноза при раке молочной железы / А. В. Лазукин // Российский биотерапевтический журнал. — 2014. — № 3. — С. 78–82.
10. Калантарли С. С. К вопросу об определении Ki-67 в биологических тканях, залитых в парафин / С. С. Калантарли, Д. Е. Мацко // Вестник СПбГУ. — Сер 11. — Вып 1. — С-182–186.
11. Дергунова Ю. А. Сравнение иммуногистохимического и ПЦР метода определения уровня экспрессии Ki-67 в ткани рака молочной железы / Ю. А. Дергунова, В. В. Кометова, В. К. Боженко, С. Г. Варданян // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. — 2018. — № 3. — С. 52–68.
12. Winner B. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb / B. Winner, C.M. Cooper-Kuhn, R. Aigner et al. // Eur. J. Neurosci. — 2002. — Vol. 16(9). — P. 1681–1689.
13. Мужикян А. А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных / А. А. Мужикян, М. Н. Макарова, Я. А. Гущин // Международный вестник ветеринарии. — 2014. — № 2. — С. 103–109.

Guseva V., Kuznetsova T., Semenov B.

Using the KI-67 proliferation marker to evaluate tendon regeneration in rabbits in an experiment

Abstract.

The goal is to assess the influence of platelet autoplasm on healing damaged tendons in rabbits.

Materials and methods. *The study on the effect of platelet autoplasm on the regeneration of damaged tendon fabric was carried out on rabbits.*

In the experiment, rabbits were applied in the field of Achille tendons, since this tendon in animals is injured quite often [1]. Then in the area of damage to the tendon, the experimental group of rabbits was administered tap, while the injured tendons of rabbits of the control group were left without treatment. An intradermal seam was imposed on wounds in the field of leather. A month later, animals of experimental and control groups took samples of tendon fabric in places of damage to immunohistochemical research using the Ki-67 marker, which made it possible to visually demonstrate the action of platelet autoplasm for the regeneration of damaged tendons.

Results. *The Ki-67 proliferation marker made it possible to clearly reveal the effect of tap on regeneration during damage to the tendon fabric in rabbits. In damaged tendon tissues in rabbits, proliferative processes go more active than in a healthy tendon. Thanks to the studies carried out, it was established that TAP stimulates proliferative processes in tendon tissues. The proliferation index is higher in the tendon tissues of the experimental group of rabbits, which was administered by TAP than in the control group and in a healthy tendon fabric.*

Key words: tissue regeneration, tendons, rabbits, Ki-67, platelet autoplasm

Authors:

Guseva V. — PhD (Vet. Sci.); ORCID 0000-0003-1373-5762; e-mail: hauteecole90@mail.ru;

Kuznetsova T. — PhD (Biol. Sci.); ORCID: 0000-0002-8981-0696; e-mail: kuznett@ya.ru;

Semenov B. — Dr. Habil. (Vet. Sci.); Professor; ORCID: 0000-0003-0149-9360; e-mail: bsstepana@rambler.ru

«Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine»; 196084, Russia, St. Petersburg, Chernigovskaya st., 5.

References

1. Ivanov A.V. Modern ideas about the mechanisms of reparative regeneration Achilles tendon after its gap / A. V. Ivanov, D. V. Kozlov // Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. — 2015. — Vol. 14. — № 4. — P. 74–79.
2. Gushchin Ya. A. The effect of fixing liquids on the microscopic structure of small laboratory animals / Ya. A. Gushchin, A. A. Majikyan // International Veterinary Bulletin. — 2014. — № 3. — P. 88–95.
3. Ivanov A.V. Analysis of the morphofunctional features of various zones of the tendon complex Fibroblastic phase of reparative regeneration / A. V. Ivanov // Bulletin of new medical technologies. — 2018. — № 3. — P. 166–170.
4. Roshini S. T. Autologous Platelet Rich Plasma for Regeneration of Tendon Injuries in Horses / S. Tina Roshini, A. Arnprasad, B. Justin William, K. Jeyaraja and K. Priyadharshini // Indian J. Anim. RES. doi: 10.18805 / IJAR.B-3653.
5. Tracks K. I. Clinical gerontology / K. I. Trackov, A. N. Ilinsky, S. G. Gorline // Gerontology. — 2013. — № 4.
6. Pastuh V.V. Prevention of post-traumatic adhesion process around tendons. Dissertation thesis on the degree of candidate of medical sciences. — 2015.
7. Semenov B. S., Guseva V. A., Rybin E. V., Kuznetsova T. Sh., Smooth E. S. The use of platelet autoplasm in the treatment of horses tendon. — Tutorial. — 2018.
8. Ivanov A. A. Index Ki-67 and the type of HSP70 expression in the formation of prognostic groups of patients with papillary cancer of the thyroid gland / A. A. Ivanov, A. M. Avdalan, E. L. Lushnikova // Russian oncological magazine. — 2018. — № 2(23). — P. 90–94.
9. Lazukin A. V. Factor of proliferation as an indicator of a forecast for breast cancer / A. V. Lazukin // Russian biotherapeutic magazine. — 2014. — № 3. — P. 78–82.
10. Calantarley S. S. to the question of determining Ki-67 in biological tissues filled into paraffin / S. S. Calantarly, D. E. Matsko // Bulletin SPbSU. — Issue 1. — P. 182–186.
11. Dergunova Yu. A. Comparison of immunohistochemical and PCR method for determining the level of expression of Ki-67 in breast cancer tissue / Yu. A. Dergunova, V. V. Ketova, V. K. Bozhenko, S. G. Vardanyan // Bulletin Russian scientific center X-rayoiodiology. — 2018. — № 3. — P. 52–68.
12. Winner B. Long-Term Survival and Cell Death of Newly Generated Neurons In The Adult Rat Olfactory Bulb / B. Winner, C. M. Cooper-Kuhn, R. Aigner Et Al. // EUR. J. Neurosci. — 2002. — Vol. 16(9). — P. 1681-1689.
13. Mayikyan A. A. Features of histological treatment of organs and tissues of laboratory animals / A. A. Majikyan, M. N. Makarova, Ya. A. Gushchin // International Veterinary Bulletin. — 2014. — № 2. — P. 103–109.