

УДК 576.367:591.433: 57.044

© Федченко С.Н., Климовичина Е.М., Галузина Л.О., 2011

КЛЕТОЧНОЕ ОБНОВЛЕНИЕ И АПОПТОЗ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ЖЕЛУДКА КРЫС В ОЦЕНКЕ ДИНАМИКИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ТОЛУОЛОМ

Федченко С.Н., Климовичина Е.М., Галузина Л.О.

ДЗ Луганский государственный медицинский университет

Введение. В многолетних исследованиях получены данные о неблагоприятном влиянии хронических ингаляций толуолом на организм человека и животных [4, 5]. В связи с широким применением компонентов эпоксидных смол в промышленном производстве [6, 7, 8], особый интерес представляет изучение морфологических изменений слизистой оболочки желудка (СОЖ) при хронической ингаляции толуолом. По проблеме за последние годы выявлено, что механизму возникновения гастропатий при интоксикации толуолом, уделяется незаслуженно мало внимания. Подвергаясь воздействию неблагоприятных факторов, эпителий желудка обладает системой протективных механизмов, в основе которых лежат процессы клеточного обновления и апоптоза.

Цель работы изучить влияние токсического ингаляционного воздействия толуола на клеточное обновление и апоптоз эпителиоцитов желудка крыс; провести анализ роли показателей пролиферации и апоптоза эпителиоцитов СОЖ в развитии гастропатий при хронической ингаляции толуолом. Связь с научной темой: "Структурный гомеостаз тканей травного тракта, видільної системи та інтегруючих систем організму (ендокринної, нервової та імунної), його регуляція та корекція змін, що виникають, в умовах дії екологічно небезпечних чинників (№ державної реєстрації 0109U004543).

Материал и методы. Исследование проведено на 48 крысах линии Вистар с исходной массой 150-180г. Животные содержались в индивидуальных клетках в условиях 14 - часового светового цикла при температуре 20-22С на стандартном рационе вивария. Животные в специальных заправочных камерах подвергались воздействию паров толуола на заданном уровне в течение 4 ч в день по 5 дней в неделю на протяжении 60 дней. Концентрацию ксенобиотика поддерживали на уровне предельно допустимой концентрации (ПДК) установленной для воздуха рабочей зоны предприятий 10 ПДК: 50 и 500мг/м³.

Все животные были разделены на 4 группы (по 6 в каждой). Исследуемые группы распределялись в зависимости от сроков наблюдения после завершения воздействия парами толуола и контроля эксперимента. Животных умерщвляли эфирным наркозом на 1-е (1 серия), 7-е сутки (2 серия); на 30-е (3 серия) и 60-е сутки (4 серия) после 60 дневной заправки толуолом. К каждой из опытных групп было взято по 6 контрольных животных, содержащихся в аналогичных условиях вивария. После вскрытия желудка промывали и под лупой определяли количество и размеры эрозий и язв.

По завершении эксперимента для гистологического исследования брали фрагмент стенки фундального отдела желудка. Материал фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине

(рН 7,2 – 7,4) в течение 12 - 24 часов, заливали в парафин по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и осуществляли морфометрическое исследование.

Анализ пролиферативной активности клеток основывался на иммунофлюоресцентном определении ядерного антигена делящихся клеток. Полученные депарафинированные препараты фиксировали ледяным метанолом в течение 15 минут. В качестве первичных антител использовали антитела к Ki67 антигену (Sigma), которые наносили на препараты и инкубировали 30 минут при 4°С. Затем препараты отмывали физиологическим раствором (PBS), забуференным фосфатно-солевым буфером (PBS), и для выявления связанных первичных антител вносили вторичные FITC – конъюгированные антитела к мышинным иммуноглобулинам (Sigma) на 30 минут при 4°С. На промытые и высушенные препараты наносили 50% глицерин, приготовленный на 3,7% растворе параформальдегида. Микроскопию проводили с помощью люминисцентного микроскопа MC300 (Micros Austria) при 400-кратном и 1000 – кратном увеличении, для съемок использовали видеокамеру CAM400 (Micros Austria) с использованием программного обеспечения Bio Vision version 2.0.

Количество Ki-67(NKi-67) - иммунопозитивных ядер клеток автоматически подсчитывалось в препаратах при 400-кратном увеличении микроскопа. Определяли ИП (ядерная метка Ki-67) в 5 случайно выбранных полях зрения (≥ 500 клеток) как долю (в процентах) положительно окрашенных ядер эпителиоцитов слизистой оболочки желудка в трех зонах: I – покровно-ямочный эпителий; II – перешеечная зона (истмический отдел, пролиферативный компартмент); III – основание желез (средняя и нижняя треть желез до базальных отделов). Для определения гистологического компартмента как имеющего экспрессию того или иного маркера минимально необходимым считалось наличие 5% позитивно меченых клеток.

$$\text{ИП} = \frac{\text{Количество пролиферирующих клеток}}{\text{Общее количество клеток}} \times 100$$

Оценка морфологических изменений клеток при апоптозе производилась методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Хехст 33342. Метод позволяет выявлять ранние изменения проницаемости плазматической мембраны и хроматина, предшествующие межнуклеосомной фрагментации ДНК. Депарафинированные срезы инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре с Hoechst 33342 (1мкг/мл). Клетки отмывали от красителя и фиксировали в 50% глицерине, приготовленном на 3,7% растворе параформальдегида. Морфологическую оценку проводили с помощью люминисцентного микро-

скопа МС300 (Micros Austria) при 400-кратном увеличении, общее количество клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии, для съемки использовали видеокамеру САМ400 (Micros Austria) с использованием программного обеспечения Bio Vision version 2.0. Иммуногистохимическое определение пролиферативного индекса является на сегодняшний день наиболее оптимальным способом, удачно сочетающим высокую информативность и минимальные экономические затраты, поскольку маркеры выявляют не только клетки собственно в митозе, но и клетки, находящиеся в процессе подготовки к делению и таким образом свидетельствуют о пролиферативном потенциале клетки (1, 3, 4).

Для количественной оценки содержания апоптических клеток использовали апоптический индекс (АИ), который рассчитывают по формуле $AI = \frac{\text{количество апоптических клеток}}{\text{общее количество}} \times 100$

Введен показатель отношения пролиферативной активности эпителиоцитов СОЖ к их апоптотическому потенциалу NKi-67/И АИ, характеризующий состояние клеточного гомеостаза, где N – количество ядер на 1 мм² площади среза. Подсчет индексов проводили в 10 полях зрения по трем срезам исследуемого препарата. Тестовая площадь для определения индексов включала не менее 2000 клеточных ядер. Морфометрические данные экспортировались в программу Excel для дальнейшей статистической обработки и хранения, достоверной считалась вероятная погрешность менее 5% ($p < 0,05$). Расчеты проводили на компьютере AMD Athlon XP 2500+ (barton core) 240 Gb HDD, 1 Gb Rom, OS Windows XP. Математическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы "EXCEL" для WINDOWS на персональном компьютере "Pentium".

Результаты исследования и их обсуждение.

В условиях хронической интоксикации толуолом происходит существенная перестройка основных структурных компартментов СОЖ, среди которых наибольшую функциональную значимость имеют эпителиальные элементы. Подвергаясь воздействию неблагоприятных факторов (ингаляция толуолом) эпителий желудка обладает системой протективных механизмов, в основе которых лежат процессы пролиферации и апоптоза. У животных всех групп отмечены в той или иной степени выраженности дистрофические и атрофические изменения

Таблица 1. Динамика уровня клеточного обновления и апоптоза в слизистой оболочке фундального отдела желудка крыс, переживших ингаляцию толуолом %

Исследуемая группа	ИП Ki-67 (%)	ИА I apopt (%)
Контроль (n=6)	3,23±1,09	5,13±1,18
1-е сутки (n=6)	2,21±0,98*	7,12±3,18*
7-е сутки (n=6)	2,43±1,05*	9,08±2,84*
Контроль (n=6)	2,98±0,92	5,74±1,73
30-е сутки (n=6)	5,62±0,63*	6,17±2,08
Контроль (n=6)	3,08±0,57	4,86±1,17
60-е сутки (n=6)	5,8±0,78*	5,88±1,38

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Очевидно гиперпролиферативный статус, наблюдаемый в 3 и 4 экспериментальных сериях, является закономерной реакцией в ответ на высокий темп толуол-индуцированного апоптоза. При высокой экспрессии маркеров пролиферации отмечается выраженная инфильтрация слизистой оболочки желудка лимфоцитами, что отражает их

СОЖ. Поверхностный эпителий уплощен, разрыхлен, на отдельных участках отслаивается от базальной мембраны. Макроскопическое изучение желудка крыс на 1-е и 7-е сутки исследования выявило язвенные дефекты и эрозии слизистой.

В результате проведенных экспериментальных исследований было установлено, что в СОЖ контрольных животных пролиферативная активность клеток неодинакова в зависимости как от расположения в железе, так и от сроков исследования.

Проведенные исследования показали, что при интоксикации толуолом характерны изменения пролиферативной активности и жизнеспособности эпителиоцитов СОЖ. При исследовании на 1 и 7 сутки процессы клеточного обновления демонстрируют достоверное снижение пролиферативной способности на 32% и 25% соответственно и увеличение процента гибели клеток в форме апоптоза по сравнению со значениями в контрольной группе, табл.1. Данные приведенные в таблице 1 свидетельствуют о том, что ИА увеличен на 38% до 7,12±3,18 (1 сутки); на 76% до 9,08±2,84 (7 сутки) по сравнению с таковым в нормальной слизистой оболочке. Снижение пролиферативной активности и нарастание числа апоптозов характерны только для животных у которых, отмечались эрозии СОЖ. Так, у экспериментальных животных на 30 сутки имеет место повышение почти в 2 раза индекса Ki-67+ эпителиоцитов СОЖ и составило 5,62±0,63%. Высокий уровень экспрессии Ki-67+ достоверно и существенно (на 88%) наблюдался и на 60 сутки. Если в группе контрольных животных Ki-67+ - клетки в средней и нижней трети фундальных желез располагаются разрозненно и, как правило, единичны, а преобладали в перешеечной зоне (истмический отдел, пролиферативный компартмент); то в результате хронической интоксикации толуолом (3 и 4 серии) имеется устойчивая тенденция к увеличению количества таких клеток по всей длине железы.

Полученные данные свидетельствуют, что при ингаляции толуолом и возникновении гастропатий, появляются клоны клеток с высокой пролиферативной активностью. В то же время высокий пролиферативный потенциал эпителиоцитов позволяет предполагать наличие скрытых механизмов нарушения клеточного обновления, которые на данном этапе токсического повреждения СОЖ возможно носят компенсаторный характер.

участие в регуляции клеточного обновления и оценивается как способность лимфоцитов к передаче так называемой регенераторной информации [1, 2]. Следующим морфологическим признаком является атрофия железистого эпителия СО, определяемая как морфологический эквивалент нарушенного клеточного обновления. Атрофия железисто-

го аппарата выражалась в уменьшении количества желез, уменьшении количества клеток и перераспределении соотношения специализированных клеток, составляющих железу. В слизистой оболочке желудка обнаруживали железы с изменениями структуры как главных, так и париетальных клеток. Многие париетальные клетки были деформированы, имели вакуолизированную цитоплазму и гиперхромные ядра. Количество париетальных клеток на единицу фундальных желез было на уровне контрольного значения.

С одной стороны, чрезмерный апоптоз, обнаруженный в СОЖ крыс в ранние сроки после интоксикации толуолом (1-е и 7-е сутки) при наличии эрозивных поражений может служить протективным фактором против избыточной клеточной пролиферации. Однако вследствие увеличения числа апоптозов при снижении активности пролиферативных процессов возможны атрофические изменения и хронизация эрозий СОЖ. Проведенные исследования показали, что для интоксикации толуолом характерны изменения пролиферативной активности и жизнеспособности эпителиоцитов желудка. Так, в группе экспериментальных животных (поздние сроки) имеет место повышение индекса пролиферации эпителиоцитов желудка при увеличенном числе индекса апоптозов. Уровень апоптоза на 30, 60 сутки после окончания воздей-

ствия парами толуола составил 6,17+2,08%; 5,88+1,38 соответственно. Установлено, что апоптозу подвергаются клетки генеративной зоны (стволовые), являющиеся источником генерации клеток эпителия. С помощью световой микроскопии было показано, что апоптозы располагаются в пролиферативно-активных (регенераторных) зонах, где присутствуют наименее дифференцированные для тканеспецифических функций клетки. Изменялась зона регенерации клеток: апоптозные тельца выявлялись не только в покровном и ямочно-шеечном эпителии, но и по всей длине желез.

Выявленные нарушения клеточного обновления способствуют тому, что клетки ускоренно перемещаются из генеративной зоны и, не претерпев полноценной дифференциации, оказываются в тех местах, где обычно располагаются зрелые специализированные эпителиоциты. Результатом этого может стать ослабление функциональной способности клеток. Так усиленно пролиферирующий эпителий не подвергается полному созреванию – процессы пролиферации преобладают над процессами дифференциации, что является определяющим фактором в морфогенезе гастропатий, индуцированных толуолом.

Перспективы дальнейших исследований предполагают изучение ДНК-фрагментации для подтверждения апоптоза в эпителиоцитах СОЖ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Аруин Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения // *Клин. мед.* – 2000. – Т. 78, № 1. – С. 5–10.
2. Аруин Л.И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л.И. Аруин, Л.Л. Капуллер, В.А. Исаков. – М.: Трида-Х, 1998. – 496 с.
3. Белушкина Н.Н. Молекулярные основы патологии апоптоза / Н.Н. Белушкина, С.Е. Северин. // *Арх. пат.* – 2001. – № 1. – С. 51–60.
4. Омарова А.С. Стрессиндуцированные сдвиги в гемо- и лимфоциркуляции крысы их коррекция пикногенолом / А.С. Омарова, Б.Н. Алибаева // *Успехи современного естествознания.* -2010.-№5.-с. 59-62.
5. Baydas G. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis / G. Baydas, R.J. Reiter, V.S. Nedzvetkii et al. // *Toxicol. Lett.* - 2003. - V. 137, № 3. - P. 169–174.
6. Halm U. Apoptosis and cell proliferation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus / U. Halm, A. Tannapfel, B. Breitung et al. // *Hepato-gastroenterology.* - 2000. - Vol. 47, N 34. - P. 962-966.
7. Matheson J.M. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma / J.M. Matheson, V.J. Johnson, V. Vallyathan, M.I. Luster // *Toxicol. Sci.* 2005. - V. 84, № 1. - P. 88–98.
8. Nakai N. Oxidative DNA damage induced by toluene is involved in its male reproductive toxicity / N. Nakai, M. Murata, M. Nagahama et al. // *Free Radic Res.* 2003. - V. 37, № 1. - P. 69–76.

Федченко С.Н., Климочкина Е.М., Галузина Л.О. Клеточное обновление и апоптоз эпителиоцитов желудка крыс в оценке динамики гастродуоденальных поражений при интоксикации толуолом // *Український медичний альманах.* – 2011. – Том 14, № 2. – С. 215-217.

Оценка морфологических изменений клеток при апоптозе производилась методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Хехст 33342. Анализ пролиферативной активности клеток основывался на иммунофлуоресцентном определении ядерного антигена делящихся клеток Ki-67 (NKi-67). Проведенные исследования показали, что при интоксикации толуолом характерны изменения пролиферативной активности и жизнеспособности эпителиоцитов СОЖ

Ключевые слова: пролиферативная активность эпителиоцитов СОЖ интоксикация толуолом

Федченко С.М., Клімочкіна О.М., Галузіна Л.О. Клітинне оновлення та апоптоз епітеліоцитів шлунку щурів в оцінці динаміки гастродуоденальних уражень при інтоксикації толуолом // *Український медичний альманах.* – 2011. – Том 14, № 2. – С. 215-217.

Оцінка морфологічних змін клітин при апоптозі проводилась методом флуоресцентної мікроскопії з використанням барвника Хехст 33342. Аналіз проліферативної активності клітин базувался на імунофлуоресцентному виявленні антигену Ki-67(NKi-67) клітин, що діляться. Проведені дослідження показали, що при інтоксикації толуолом характерні зміни проліферативної активності та життєздатності епітеліоцитів слизової оболонки шлунку

Ключові слова: проліферативна активність епітеліоцитів слизової оболонки шлунку, інтоксикація толуолом

Fedchenko S.N., Klimotchikina Ye.M, Galuzina L.O. Cellular Renovation and Apoptosis of Epitheliocytes of the Stomach in Rats in the Assessment of the Dynamics of Gastroduodenal Lesions Caused by Toluene Intoxication // *Український медичний альманах.* – 2011. – Том 14, № 2. – С. 215-217.

Assessment of morphological changes of the cells with apoptosis was made with the application of the method of fluorescence microscopy with the use of color Hoechst 33342. Analysis of proliferative activity of the cells was based on immunofluorescent detection of nuclear antigen Ki-67 (NKi-67) of dividing cells. The studies conducted showed that intoxication caused by toluene resulted in characteristic changes in proliferative activity and viability of epitheliocytes of the mucous membrane of the stomach (MMS)

Key words: proliferative activity of epitheliocytes of the mucous membrane of the stomach (MMS), intoxication caused by toluene

Надійшла 12.01.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін