

УДК 576.367: 591.433: 57.044

© Федченко С.Н., Галузіна Л.О., 2011

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЕРИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС В УСЛОВИЯХ СМОДЕЛИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ ХИМИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ Федченко С.Н., Галузіна Л.О.

ДЗ «Луганский государственный медицинский университет»

Федченко С.Н., Галузіна Л.О. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза и пролиферативной активности слизистой оболочки желудка крыс в условиях смоделированной патологии химической этиологии // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 67-69.

В работе приведены методы оценки морфологических изменений при апоптозе и анализ пролиферативной активности клеток при ингаляционном влиянии парами толуола. Установлена коррелятивная связь разного направления между атрофией в СОШ с индексом пролиферации и апоптозом эпителиоцитов СОШ

Ключевые слова: слизистая оболочка желудка (СОЖ), эпителиоцит, толуол, пролиферация, апоптоз

Федченко С.М., Галузіна Л.О. Морфологічні методи верифікації і кількісної оцінки апоптозу та проліферативної активності слизової оболонки шлунка щурів в умовах змодельованої патології хімічної етіології // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 67-69

В роботі наведені методи оцінки морфологічних змін при апоптозі та аналіз проліферативної активності клітин при інгаляційному впливі парами толуолу. Встановлений корелятивний зв'язок різного напрямку між атрофією в СОШ з індексом проліферації та апоптозом епітеліоцитів СОШ

Ключові слова: слизова оболонка шлунка (СОШ), епітеліоцит, толуол, проліферація, апоптоз

Fedchenko S.N., Galuzina L.O. Morphological methods of verification and quantitative assessment of apoptosis and proliferative activity of the mucous membrane of the stomach of rats in a simulated chemical etiology pathology // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 67-69

At the research are present methods for evaluating of the morphological changes during apoptosis and analysis of cell proliferation activity during inhalation of toluene vapors. It was determined various kinds of correlative relation between atrophy of MMS and an index of cell proliferation and apoptosis.

Key words: mucous membrane of the stomach (MMS), epitheliocyte, toluene, proliferation, apoptosis

В работе приведены методы оценки морфологических изменений при апоптозе и анализ пролиферативной активности клеток при ингаляционном воздействии парами толуола. Установлена коррелятивная связь различной направленности между атрофией в СОЖ с индексом пролиферации и апоптозом эпителиоцитов.

В настоящее время важнейшее значение в прогрессировании нарушений клеточного гомеостаза эпителиоцитов желудка принадлежит Ki-67и апоптозу [1,2]. Однако характер и степень изменений их показателей на пути прогрессирования гастропатий недостаточно изучены. От характера нарушений параметров клеточного обновления (соотношения апоптоза и пролиферативной активности эпителиоцитов) зависит формирование различных заболеваний желудочно-кишечного тракта [3, 4].

Исследование молекулярных механизмов запрограммированной гибели клетки стало в последние годы одной из самых актуальных проблем медицины. Появляется все больше доказательств роли нарушений клеточного обновления в развитии и прогрессировании патологических процессов в пищеварительной системе. В то же время, отсутствуют данные о взаимосвязи возникновения гастропатий с процессами клеточного обновления в условиях смоделированной патологии химической этиологии.

Цель исследования рассмотреть роль маркеров клеточного обновления (Ki-67) и апоптоза в возникновении нарушений клеточного гомеостаза эпителиоцитов желудка, и определить прогностически значимую величину соотношения пролиферации к апоптозу эпителиоцитов желудка в плане возникновения и прогрессирования гастропатий желудка, ассоциированных с воздействием на организм паров толуола.

Связь с научной темой: “Структурный гомеостаз тканей травного тракта, выделительной системы та інтегруючих систем організму (ендокринної, нервової та імунної), його регуляція та корекція змін, що виникають, в умовах дії екологічно небезпечних чинників Держ. Рег.0109U004543

Состояние СОЖ во многом определяется пролиферативной активностью эпителиоцитов, однако, традиционный подсчет митотической активности не отражает пролиферативный потенциал, так как собственно митоз занимает несколько часов (что может визуализироваться при рутинном исследовании), а подготовка к нему – около 24 часов, в связи с чем изучение негистонового протеина Ki-67 (маркера пролиферации), экспрессирующегося во всех клетках, вышедших из G₀-фазы, представляется актуальным и позволяет определить именно “скрытый” пролиферативный потенциал СОЖ и судить о степени морфологических изменений в ответ на хроническую интоксикацию парами толуола.

Существует много способов визуализации и оценки пролиферативной активности клеток – подсчет митотического показателя при обычном гистологическом исследовании, анализ включения радионуклидов, иммуногистохимическое выявление пула пролиферирующих клеток и другие. 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 ткани [5, 6].

Анализ пролиферативной активности клеток основывался на иммунофлюоресцентном определении ядерного антигена делящихся клеток [5]. Полученные депарафинированные препараты фиксировали ледяным метанолом в течение 15 минут. С целью верификации пролиферирующего клеточного ядерного антигена использовали моноклональные антитела, в качестве первичных антител использовали антитела к Ki67 антигену (Sigma), которые наносили на препараты и инкубировали 30 минут при 4°C. Морфологическую оценку проводили с помощью люминисцентного микроскопа MC300 (Micros Austria) при 400-кратном увеличении, общее количество клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии, для съемок использовали видеокамеру SAM400 (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 СОЖ.

Оценка морфологических изменений при апоптозе. Для выявления клеток с конденсированным или фрагментированным ядром был использован флюоресцентный ядерный краситель Hoechst 33342. Метод позволяет выявлять ранние изменения проницаемости плазматической мембраны и хроматина, предшествующие межнуклеосомной фрагментации ДНК [6, 7].

Особенно удобным для этой цели считается метод флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Хехст 33342, связывающегося с ДНК. Вследствие изменений проницаемости плазматической мембраны апоптотические клетки накапливают краситель Хехст 33342 значительно быстрее, чем интактные [6, 7]. Метод позволяет выявлять ранние изменения проницаемости плазматической мембраны и хроматина, предшествующие межнуклеосомной фрагментации ДНК. После фиксации материала, депарафинированные срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Гибель клеток в форме апоптоза определяли по индексу апоптоза (IАПТ) по формуле: $IАПТ (\%) = N$ (число апоптотических ядер, окрашенных красителем Хехст 33342) / N (общее число ядер) $\times 100$.

Введен показатель отношения пролиферативной активности эпителиоцитов СОЖ к их апоптотическому потенциалу $NKi-67/IАПТ$, характеризующий состояние клеточного гомеостаза.

Математическая обработка результатов исследования проводилась с помощью статистического пакета программ "EXCEL" на персональном компьютере IBM "Pentium"-4. При обработке материала определялись средние значения, ошибка, доверительный интервал. При сравнении средних показателей между различными группами использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования. Проведенные исследования показали, что при интоксикации толуолом характерны изменения пролиферативной активности и жизнеспособности эпителиоцитов СОЖ. Следует отметить, что в условиях смоделированной патологии химической этиологии отмечается

гетерогенность эпителиоцитов по степени выраженности дезорганизации нарушения структурной целостности. Снижение пролиферативной активности и нарастание числа апоптозов характерны только для животных у которых, отмечались эрозии СОЖ. Проведенные ранее исследования морфологического состояния желудка крыс, подвергшихся воздействию парами толуола, показали, что эпителиоциты претерпевают целый комплекс патологических ультраструктурных изменений, при этом степень деструкции СОЖ снижается пропорционально времени, прошедшего после прекращения ингаляции толуолом [8]. Наиболее значительные ультраструктурные изменения эпителиоцитов выявлены в ранние сроки исследования. При ингаляции толуолом изменялась структура ядерного хроматина большинства эпителиоцитов. Одним из таких морфологических признаков апоптоза является изменение ядерной морфологии, проявляющееся в конденсации и фрагментации ядерного хроматина. На первых этапах происходит образование конденсированных участков хроматина в перинуклеарной области (в виде серпа или лошадиной подковы). По мере развития этого процесса возможно появление областей конденсированного хроматина в центральной области ядра. Участков конденсации может быть несколько, затем происходит образование так называемых «апоптотических тел» (изолированные ядерные фрагменты вместе с содержимым цитоплазмы, включающие интактные органеллы и окруженные фрагментами плазматической мембраны). С помощью световой микроскопии было показано, что апоптозы располагаются в пролиферативно-активных (регенераторных) зонах, где присутствуют наименее дифференцированные для тканеспецифических функций клетки: увеличивается количество клеток с повышенной флуоресценцией хроматина, что свидетельствует о его конденсации. Конденсация хроматина – это промежуточный этап апоптоза, который в случае, если наблюдается значительное количество разрывов в ДНК, сопровождается фрагментацией ДНК и появлением апоптотических телец. Можно предположить, что основной мишенью действия толуола являются незащищенные линкерные участки ДНК и места локализации генов, которые активно транскрибируются. 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.

С одной стороны, чрезмерный апоптоз при интоксикации парами толуола может служить протективным фактором против избыточной клеточной пролиферации. Однако, вследствие увеличения числа апоптозов при снижении активности пролиферативных процессов отмечаются атрофические изменения и эрозии СОЖ. При исследовании на 1-е и 7-е 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. 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. Апоптоз, помимо поверхностного эпителия, встречается в генеративной зоне, что учитывая локализацию камбиальных клеток, может рассматриваться как фактор риска развития толуол-индуцированных гастропатий.

В ходе статистической обработки результатов полученных данных были установлены коррелятивные связи различной направленности между атрофией в СОЖ и индексом пролиферации и апоптозом. Установлена тесная обратная корреляционная связь между снижением толщины СОЖ, увеличенными показателями апоптоза ($r = -0.94$) и положительная связь со снижением пролиферативного индекса ($r = 0.95$), что дает возможность думать об участии этих компонентов в формировании гастропатий, ассоциированных с воздействием на организм паров толуола.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.А., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Трида-Х, 1998. - 496 с.
2. Эрадикационная терапия и процессы пролиферации и апоптоза в желудке больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки /соавт.: Осадчук А.М., Кветной И.М. /Клин. мед. - 2009. - № 5. - С.43-47.
3. Влияние антигеликобактерной терапии с дибикором на показатели клеточного гомеостаза (Ki-67,

Bcl-2 и апоптоз) эпителиоцитов желудка при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки /соавт.: Осадчук А.М., Дятченко В.П., Кветной И.М. / Рос. журн. гастроэнтерол, гепатол., колопроктол. - 2008. - №3. -С.55-61.

4. Jones N.L. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *H.pylori* infection // Amer.J.Pathol. 1997. -Vol.151. - P.1695-1803.
5. Kerr J.F.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie // Br. J. Cancer. - 1972. Vol. 26, N2. - P. 239-257.
6. Apoptosis in rat spontaneous chronic pancreatitis: role of the Fas and Fas ligand system / S.B. Su, Y. Motoo, M.J. Xie, N. Sawabu // Dig. Dis. Sci. 2001. -Vol.46, N1. - P. 166-175.
7. Arends M.J., Wyllie A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology // Int. Rev. Exp. Pathol.- 1991. Vol.32. - P. 223-254.
8. Федченко С.Н. Морфофункциональные изменения желудка крыс под воздействием толуола / С.Н. Федченко, Л.О. Галузина // Матеріали наук. Конгр. "IV Міжнародні Пироговські читання", присв. 200-річ. з дня народ. М.І. Пирогова. В з'їзд анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України, Вінниця, 2-5 червня 2010. – Вінниця, 2010. – С.119-120.

Надійшла 14.09.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін

УДК 591.87:591.147

© Федченко С.Н., Кондаурова А.Ю., 2011

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ КЛІТИН ДИФУЗНОЇ ЕНДОКРИННОЇ СИСТЕМИ ЖЕЛУДКА В НОРМІ І ПРИ ПАТОЛОГІЇ Федченко С.Н., Кондаурова А.Ю.

ДЗ Луганський державний медичний університет

Федченко С.Н., Кондаурова А.Ю. Структурно-функціональна організація клітин дифузної ендокринної системи желудка в нормі і при патології // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 69-70.

В роботі виконано дослідження морфологічних змін ЕС клітин слизової оболонки желудка крыс при совместном введенні золедронової кислоти і гідрокортизона. Установлено, що відповідна реакція ЕС кліток на введення комбінації препаратів залежить від строків експерименту.

Ключові слова. слизова оболонка желудка, ЕС клітка, золедроновая кислота, гідрокортизон

Федченко С.М., Кондаурова Г.Ю. Структурно-функціональна організація клітин дифузної ендокринної системи шлунка в нормі та при патології // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 69-70.

У роботі виконано дослідження морфологічних змін ЕС клітин слизової оболонки шлунка щурів при сумісному введенні золедронової кислоти та гідрокортизону. Встановлено, що відповідна реакція ЕС клітин на введення комбінації препаратів залежить від строку експерименту.

Ключові слова. слизова оболонка шлунка, ЕС клітина, золедроновая кислота, гідрокортизон.

Fedchenko S.N., Kondaurova A.Yu. Structural and functional organization gastric APUD system in normal and pathological condition // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 69-70.

Morphological changes of EC cells of rats of gastric mucous after combined introduction of zoledronic acid and hydrocortisone were studied. It was established that morphological changes of EC cells independent on experiment terms.

Key words: Gastric mucous, EC cells, zoledronic acid, hydrocortisone.

В настоящее время известно несколько десятков типов клеток APUD-системы, продуцирующих более 60 регуляторных пептидов и биогенных аминов. Большая часть этих клеток располагается в пищеварительной системе и достаточно хорошо изучена. Известно, что продуцируемые эндокриноцитами гормоны принимают непосредственное участие в процессах цито-, гисто- и органогенеза, регулируют

пролиферацию и дифференцировку клеток различных органов, изменяют многие звенья патогенеза заболеваний в эмбриональном и постэмбриональном периодах [1, 2]. Важно подчеркнуть, что некоторые пептидные гормоны и биогенные амины прямо или косвенно оказывают пролиферативное (гастрин, гистамин) или антипролиферативное (цитостатическое) (серотонин, мелатонин) действие [3,4,5,6].