

Реферат

РОЛЬ NO-СИНТАЗ В МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЙ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОМЕЛАТОНИНЕМИИ

Френкель Ю.Д.

Ключевые слова: гипомелатонинемия, оксид азота, NO-синтазы, энергетический метаболизм, адениннуклеотиды, головной мозг.

В эксперименте на 25 белых крысах исследована роль функционального состояния NO-синтаз (NOS) в механизмах нарушений содержания и соотношения адениннуклеотидов в ткани головного мозга при хронической экспериментальной гипомелатонинемии, воспроизводимой путем круглосуточного освещения животных в дозе 1500 лк в течение 55 суток. Выявлено, что в этих условиях функционирования нейрональная NOS ограничивает развитие биоэнергетической недостаточности головного мозга. Основной вклад в снижение концентрации макроэргических соединений и энергетического потенциала вносит индуцибельная NOS. Применение L-аргинина ограничивает в условиях хронической экспериментальной гипомелатонинемии снижение АТФ и энергетического потенциала в ткани больших полушарий головного мозга.

Summary

ROLE OF NO-SYNTHASES IN THE MECHANISMS OF IMPAIRMENT OF BIOENERGY PROCESSES IN CEREBRAL TISSUE UNDER CHRONIC MODELED HYPOMELATONINEMIA

Frenkel Yu.D.

Key words: hypomelatoninemia, nitric oxide, NO-synthases, energy metabolism, adenine nucleotides, brain.

The experiment carried out on 25 white rats was designed to study the role of the functional state of NO-synthases (NOS) in the mechanisms of impairment of adenine nucleotides content and value in cerebral tissue under chronic modeled hypomelatoninemia. Animals were exposed to steady illumination at a dose of 1500 lux for 55 days. It has been found out in these conditions the functioning of neuronal NOS limits the development of bioenergy disturbances in the brain. Inducible NOS makes the most contribution to reducing the concentration of macroergic compounds. The use of L-arginine in chronic modeled hypomelatoninemia limits the decrease of ATP and energy resources in cerebral tissues.

УДК 616.33 – 008.3 : 616 - 071

Харченко А.В.

КОМПЛЕКСНАЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

ПНПУ имени В.Г. Короленко, г. Полтава

В участках дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка выявлена повышенная пролиферативная активность эпителия, которая подтверждена иммуногистохимически повышенной экспансией маркера Ki-67 (IM>30,0%). Показатели митотического режима эпителия слизистой оболочки желудка преобладают в участках дисплазии. Проводимая диагностика показала изменения ДНК эпителия слизистой оболочки желудка, характерные для дисплазии эпителия разной степени тяжести. В случаях с указанными дисплазиями произошли изменения в виде увеличения размеров ампликонов, характерных для каждой из групп. Указанные изменения носят характер микросателлитных экспансий. Существует сильная корреляционная связь между степенью дисплазии определяемой по фенотипическим признакам и показателями характерными для ДНК-типирования эпителия слизистой оболочки желудка. Коэффициент корреляции Пирсона r_{xy} составил соответственно 0,863 и 0,917. Общий результат свидетельствует о существовании статистически достоверной зависимости с вероятностью 0,99.

Ключевые слова: ДНК, ампликоны, фенотип.

Исследование является фрагментом научно-исследовательской работы Харьковского национального медицинского университета «Формирование современных методов хирургического лечения и профилактики осложнений заболеваний и травм органов грудной клетки и брюшной полости» (№ госрегистрации 0110U002649).

Вступление

Диагностика дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка, как предопухолевых изменений является актуальной, всё же только метода биопсии с последующим гистологическим исследованием биоптатов недостаточно для решения этой важной диагностической проблемы [2, 4]. Тяжелая дисплазия характеризуется клеточной атипией, анизокариозом, гиперхрома-

тозом ядер, резким увеличением ядерно-цитоплазматических соотношений и распространенной псевдостратификацией. Среднее содержание ДНК и число клеток в фазе синтеза ДНК резко увеличено [5].

Известно, что злокачественная трансформация имеет определённые перестройки в геноме клеток, это, в свою очередь, может быть выявлено при анализе геномной ДНК [3, 4].

Гистологический метод является обязатель-

ным методом морфологической диагностики злокачественных опухолей, но при разрешении дифференциально-диагностической проблемы между дисплазией и раком желудка его разрешающей способности недостаточно.

PCR является универсальной техникой, которую активно используют с середины 80-х годов. Среди многочисленных маркеров, основанных на использовании PCR, особое место занимают те, которые являются фрагментами ДНК, размещёнными между локусами инвертных повторов ДНК: ISSR (Inter simple sequence repeats). Использование этих маркеров предшествует открытию того факта, что эукариотные геномы в среднем на 30-90% представлены высоко полиморфными повторяющимися последовательностями. Повторяющаяся ДНК выполняет своеобразную функцию по абсорбции мутаций в геноме[6].

Относительная насыщенность геномов теми или иными микросателлитными последовательностями является результатом действия многих факторов, среди которых одним из основных является уровень стабильности микросателлитной ДНК. Интенсивное удлинение микросателлитных последовательностей за счёт репликационных ошибок имеет название микросателлитной экспансии[7].

Большенство микросателлитных мутаций связаны с инсерциями или делециями некоторых повторов, которые совершаются во время репликации. Такое нарушение стабильности микросателлитов чаще всего происходит благодаря образованию петель на ДНК во время репликации («slippage») [8].

Характер и закономерности распределения в геноме микросателлитов имеет особый интерес благодаря той роли, которую они играют в развитии онкологических заболеваний [7, 10].

Целью нашего исследования является обнаружение диспластических изменений в слизистой оболочке желудка при помощи иммуногистохимического и молекулярно-биологического метода у пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки.

Материалы и методы исследования

В работу положено результаты исследований 50 наблюдений слизистой оболочки желудков, которые резецированы по поводу хронической язвы двенадцатиперстной кишки. Фиксатором служил 10% раствор нейтрального формалина. Объём фиксирующей жидкости в 30 раз превышал объём материала. После промывки под проточной водой в течении 12 часов препараты слизистой оболочки желудка заливали в парафин по общепринятым схемам. Срезы получали из парафиновых блоков на микротоме МПС-2.

Иммуногистохимическое выявление пролиферации эпителия слизистой оболочки желудка проводили при помощи маркера Ki-67 на депарафинированных срезах толщиной 4-5 мм., с предварительной демаскировкой антигена в ци-

тратном буфере (рН 6,0) в микроволновой печи в течении 10 мин. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к Ki-67 (клон MIB-1). Инкубацию с первичными антителами проводили в течении 18 часов. Идентификация реакции проводилась при помощи хромогена 3,3'-диаминобензидин тетрахлорида (DAB, Dako Cytomation). Срезы контрастировали при помощи гематоксилина-эозина.

Для молекулярно-биологического исследования брали образцы слизистой оболочки желудка с признаками дисплазии разной степени, в которых изучали изменения ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (PCR) [8; 9].

Индивидуальное ДНК-типирование (генотипирование) образцов слизистой оболочки желудка проводили путём амплификации ДНК в PCR с использованием ISSR – праймера S2, который имел структуру: (AGC)₆G [8].

Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала 1× реактивный буфер с трифосфатами, праймер приведённой структуры, Taq-полимеразу («Тапотили», ВНИИ генетики, Россия), ДНК добавляли в количестве 10 – 20 нг на реакцию. Температура оджига праймера составляла 57°C, синтез фрагментов ДНК проходил в 30 циклах амплификации на термоциклере (амплификаторе) «Терцик» ТП4-ПЦР 01 («ДНК – технология», Россия) в режиме: I – 95°–2мин., II – 94°–30мин, 57°–2мин, 72°–2мин, III – 72°–10мин. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 2%-м горизонтальном агарозном геле (Вагофор, Латвия) в 1× TBE-буфере с последующим их окрашиванием в течении 10 мин в 0,5мкг/мл растворе бромистого этидия и многократной промывкой в проточной воде. Визуализацию электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 365 нм с последующим фотографированием. Определение размеров ампликонов выполняли при помощи маркера молекулярной массы 1000bp DNA-Ladder, pUC 19 DNA/ Msp I («Fermentas», Литва) [1].

Результаты исследования и их обсуждение

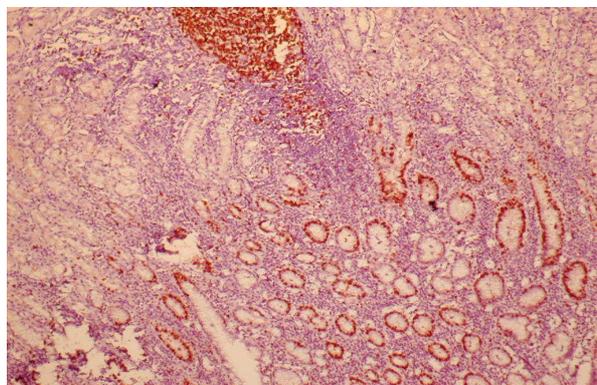


Рис. 1 Высокая пролиферативная активность покрывно-язвенного эпителия в участке слабой дисплазии его, а также в центре лимфоидного фолликула и распространённых в строме клеток воспалительного инфильтрата. Маркер Ki-67. Увеличение 100.

У пациентов больных хронической язвой двенадцатиперстной кишки, на фоне выраженных форм хронического атрофического и атрофически-гиперпластического гастрита в слизистой оболочке желудка пилорического отдела и малой кривизны показатель митотического индекса был почти одинаковым (рис.2).

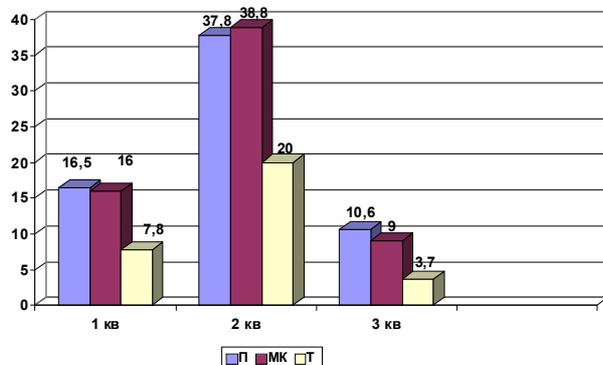


Рис.2. Митотический режим эпителия слизистой оболочки желудка у больных хронической язвой двенадцатиперстной кишки. П – пилорический отдел желудка. МК – малая кривизна. Т – тело. 1 кв – митотический индекс %. 2 кв – количество митозов (%) в метафазе. 3 кв – количество патологических митозов (%).

Показатель митотического индекса в теле желудка ($7,8 \pm 1,6\%$) был достоверно ($p < 0,01$) ниже чем в пилорическом отделе ($16,5 \pm 4,2\%$) и на малой кривизне ($16,0 \pm 2,4\%$) (рис.2).

Между показателями количества митозов в метафазе пилорического отдела ($37,8 \pm 7,8\%$) и малой кривизны ($38,8 \pm 3,7\%$) достоверной разницы не было.

В теле желудка количество митозов в метафазе ($20,0 \pm 3,1\%$) было достоверно ниже ($p < 0,01$) чем в пилорическом отделе ($37,6 \pm 7,8\%$) и на малой кривизне ($38,8 \pm 3,7\%$).

Что касается патологических митозов (рис.3.), то отмечается их достоверное снижение ($p < 0,01$) в теле желудка ($3,7 \pm 1,5\%$) в сравнении с пилорическим отделом ($10,6 \pm 1,3\%$) и малой кривизной ($9,0 \pm 1,4\%$) и не было достоверной разницы между пилорическим отделом и малой кривизной.

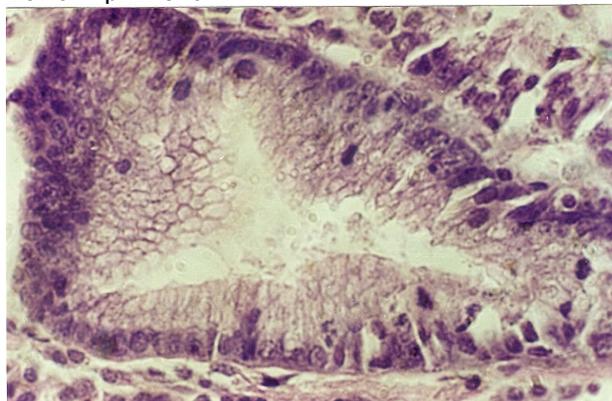


Рис.3. Патологические митозы в глубине ямок желудка. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение 600.

Высокая пролиферативная активность эпителия слизистой оболочки желудка подтверждается экспансией маркера Ki-67 с индексом метки (ИМ) $> 30,0\%$ (рис. 1).

Генотипирование эпителия слизистой оболочки желудка пациентов больных хронической язвой двенадцатиперстной кишки, обнаружило разнообразные амплификационные профили ДНК слизистой оболочки желудка.

Среди разнообразия образцов удалось сгруппировать ДНК-профили соответственно к фенотипическим признакам и выделить ПЦР-типы (рис. 4).

Профили маркера слизистой оболочки желудка в норме содержали фрагменты размером 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п.н.(пар нуклеотидов) и были идентичны в пределах своей группы, однако существенно отличались от ДНК-профилей других исследуемых групп. ДНК-профили размером 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120, 110, 100, 90 п.н. соответствовали фенотипу дисплазии первой степени (Д-I). А фенотипы дисплазии второй степени (Д-II) в 90% случаев имели вариант ДНК-профилей размером 300, 260, 240, 220, 210, 190, 180, 160, 140, 120, 100 п.н.(первый вариант), остальные же имели ДНК-профили (второй вариант) 500, 480, 440, 400, 360, 300, 240, 200, 140, 110, 100 п.н.(рис. 5), фенотипы дисплазии третьей степени (Д-III) имели ДНК-профили только одного варианта размером 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 380, 360, 340, 320 п.н.(рис.6).

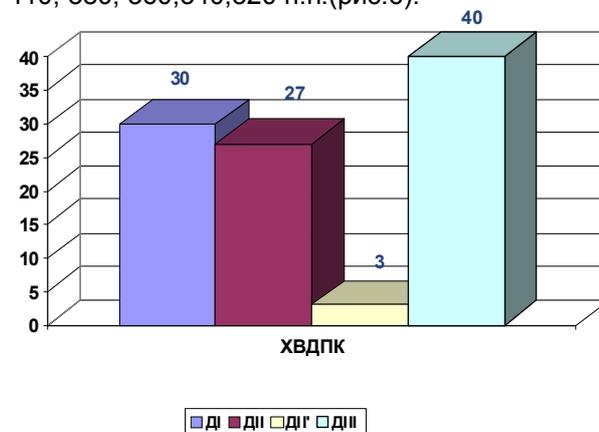


Рис. 4. Распределение ДНК-профилей слизистой оболочки желудка у больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки.

ДНК-профили слизистой оболочки желудка, которые соответствовали фенотипу Д-I имели определённое сходство ($63,6\%$) с маркером нормы.

Фенотипу Д-II соответствовали два варианта ДНК-профилей с присутствием ампликонов размером в пределах 500 п.н. и без них. Последние имели значительное подобие на уровне $36,4\%$ с ДНК-профилями слизистой оболочки желудка типа Д-III. Это свидетельствует, что ДНК-профили Д-II изменяются и имеют переходные формы к ПЦР типу Д-III.

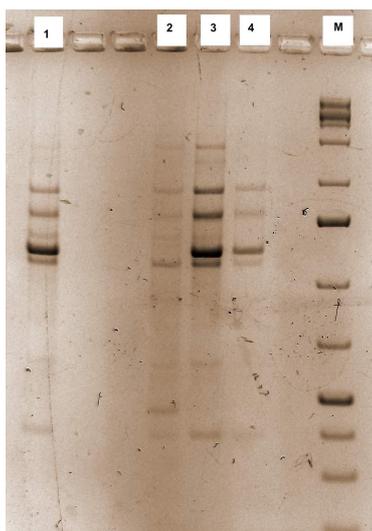


Рис. 5 Электрофореграммы продуктов амплификата образцов ДНК слизистой оболочки желудка Д-II:

1, 4 – амплификационные профили Д-II первого варианта;
2,3 – амплификационные профили Д-II второго варианта;
М – маркер размера фрагментов ДНК.

ДНК профили слизистой оболочки желудка с Д-III содержали ампликоны размером 520 п.н. и имели генетическое отличие от других групп наблюдения, но были подобны в пределах своей группы. ДНК-профили по результатам проведения типирования методом ISSR-PCR в каждом случае выявляются по максимальному проявлению дисплазии. Если фенотипически в слизистой оболочке выявлена одновременно дисплазия от Д-I до Д-III, то результат генотипирования будет отвечать максимальному показателю Д-III с ДНК-профилями, которые имеют ампликоны размером 520 п.н. Амплификационные профили

Д-II имеют два варианта, однако второй вариант имеет определенное сходство с профилем Д-III.

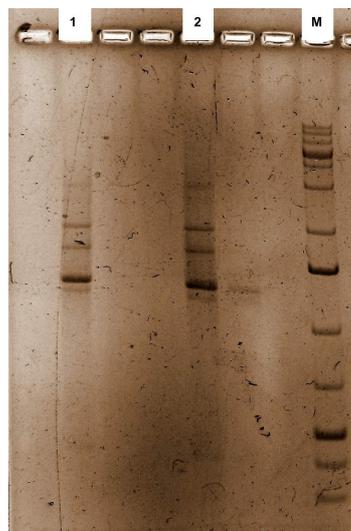


Рис. 6. Электрофореграммы продуктов амплификата образцов ДНК слизистой оболочки желудка:

1,2 – профили Д-III; М – маркер размера фрагментов ДНК.

С целью определения определенной зависимости между показателями ДНК-типирования образцов слизистой оболочки по методу ISSR-PCR и степенью выраженности дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки по фенотипическим признакам, а также между степенью выраженности последней и показателями митотического режима, а также маркера Ki-67 проведен корреляционный анализ. (таб.).

Таблица

Результаты корреляционного анализа между показателями дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка по фенотипическим признакам и показателями по результатам генотипирования у больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки.

	Степень дисплазии- ДНК-тип min	Степень дисплазии - ДНК-тип max
Коэффициент корреляции Пирсона r_{xy}	0,863	0,917
Теснота связи	сильная	очень сильная
Коэффициент детерминации $D=r_{xy}^2$	0,744	0,842
Критическое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,95	0,2732	0,2732
Критическое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,99	0,3511	0,3511
Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,95	$r_{xy} > r_{cr}$	$r_{xy} > r_{cr}$
Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,99	$r_{xy} > r_{cr}$	$r_{xy} > r_{cr}$
Коэффициент ковариации	78,673	100,898
Общий результат	статистически достоверная зависимость с вероятностью 0,99	статистически достоверная зависимость с вероятностью 0,99

Между степенью дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка по фенотипическим признакам и показателями ДНК-типирования образцов слизистой оболочки желудка коэффициент корреляции Пирсона r_{xy} составляет соответственно 0,863 и 0,917, что означает сильную и очень сильную по тесноте связь между показателями. Коэффициент детерминации $D=r_{xy}^2$ составил 0,744 и 0,842 соответственно. Критичес-

кое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,95 было 0,2732. Критическое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,99 было 0,3511. Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,95 соответствовало $r_{xy} > r_{cr}$. Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,99 соответствовало $r_{xy} > r_{cr}$. Коэффициент ко-

варіації был 78,673 і 100,898 відповідно, що дає можливість зробити висновок статистично достовірної залежності між вказаними показателями з ймовірністю 0,99 (табл.).

Висновки

В ділянках дисплазії епітелію слизової оболонки виявляється підвищена проліферативна активність епітелію, що підтверджено імуногістохімічно підвищеною експансією маркера Ki-67 (IM>30,0%). Показатели митотического режиму епітелію слизової оболонки жовудка преобладають в ділянках дисплазії.

Дисплазії епітелію слизової оболонки жовудка у хроніческій язві дванадцятиперстної кишки по результатам генотипування епітелію слизової оболонки жовудка при допомозі реакції ISSR-PCR мають характерні зміни, які знаходяться в відповідній залежності з їх ДНК-профілями.

Ампліфикаційний ДНК-профіль норми має спектр ампліконов розміром в межах від 190 – 60 п.н., дисплазія (Д-I) слабо виражена має ампліфикаційний ДНК-профіль со спектром ампліконов розміром від 220 до 60 п.н., дисплазія (Д-II) помірно виражена в 90% має ампліфикаційні ДНК-профілі со спектром ампліконов розміром 300 – 100 п.н. (I – варіант) і в 10% ДНК-профілі 500 – 100 п.н. (II – варіант), що свідчить про генетическую неоднорідність дисплазій другої степені. Дисплазія Д-III має один варіант ампліфикаційного ДНК-профіля со спектром ампліконов 520 – 320 п.н. Реакція ISSR-PCR виявляє удлиннение мікросателітних послідовностей ДНК.

По результатам генотипування епітелію слизової оболонки жовудка ми спостерігаємо мікросателітні експансії. Удлиннение мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок називається мікросателітними експансіями.

Существує сильна зв'язь між степеню дисплазії епітелію слизової оболонки жовудка по фенотипіческім ознакам і показателями ДНК-типирования образцов слизової оболонки жовудка, коефіцієнт кореля-

ції Пірсона r_{xy} склав відповідно 0,863 і 0,917. Общій результат свідчить про існування статистично достовірної залежності з ймовірністю 0,99.

ISSR-PCR є інформативним методом для виявлення змін генетической структури епітелію слизової оболонки жовудка. Враховуючи доступність, відносительную простоту і можливість візуального читання результатів без використання спеціальної апаратури, з успіхом применен при изучении ДНК-типирования епітелію слизової оболонки жовудка с фенотипами дисплазій епітелію і дозволяє виявити зміни, які в них происходять.

Перспективи дальнейших исследований

В дальнейшем маркер ISSR-PCR планується досліджувати на практиці з метою діагностики неопластических змін епітелію слизової оболонки жовудка у хроніческій язві з іншими захворюваннями жовудка.

Література

1. Абрамов Д.Д. Точность метода полимеразной цепной реакции «в реальном времени» / Д.Д.Абрамов, Д.Ю.Трофимов, Д.В.Рибриков // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. Т.42. С.485 – 488.
2. Аруин Л.И. Новая Международная классификация дисплазий слизистой оболочки желудка / Л.И. Аруин // Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колонопроктол. – 2002. - №3. – С.15 – 17.
3. Канцерогенез / Под ред Д.Г.Заридзе. – Москва: Медицина, 2004. – 576 с.
4. Карселадзе А.И. Некоторые основополагающие понятия онкоморфологии в свете достижений современной молекулярной биологии / А.И. Карселадзе // Арх. пат. – 2009. – Вып.5. – С.17–21.
5. Серов В.В. Ранний рак желудка: морфология, гисто- и морфогенез / В.В.Серов, В.Б.Золотаревский, А.В. Берестова // Арх. патол.- 1990.- №5. – С. 70 – 74.
6. Baldi P. Sequence analysis by additive scales: DNA structure for sequences and repeats lengths / P. Baldi, P.F. Baisnee // Bioinformatics. – 2000. – V. 16. – P. 865 – 889.
7. Freimer N.B. Microsatellites: evolution and mutational process / N.B. Freimer, M. Slatkin // Ciba Found Symp. – 1996. – №197. – P. 51 – 67.
8. Mullis K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction / K.B.Mullis, F.Faloona // Meth. Enzymol. – 1987. – №155. – С.335 – 350.
9. Tsanev R. Molecular mechanisms of cancer cells survival / R.Tsanev // J.BUON. – 2005. – №10. P.309 – 318.
10. Wooster R. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers / R.Wooster, A.M.Cleton-Jansen, N.Collins, J.Mangion, R.S.Cornelis, C.S.Cooper, B.A.Gusterson, B.A.Ponder, A.von Deimling, O.D.Wiestler // Nat Genet. – 1999. – №6. – P.152 – 156.

Резюме

КОМПЛЕКСНА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА І МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ПЕРЕДПУХЛІННИХ ПРОЦЕСІВ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА

Харченко А.В.

Ключові слова: ДНК, амплікони, фенотип.

В осередках дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка виявлена підвищена проліферативна активність, яка підтверджена імуногістохімічно підвищеною експансією маркеру Ki-67 (IM>30,0%). Показники митотического режиму епітелію слизової оболонки шлунка переважають в осередках дисплазії.

Діагностика, яка проводилась, показала зміни ДНК епітелію слизової оболонки шлунка, характерні для дисплазії епітелію різного ступеня тяжкості. У випадках з вказаними дисплазіями відбулися зміни у вигляді збільшення розмірів ампліконів, характерних для кожної з груп. Вказані зміни мають характер мікросателітних експансій. Існує сильний кореляційний зв'язок між ступенем дисплазії, що визначається за фенотипіческім ознаками і показниками характерними для ДНК-типирования епітелію слизової оболонки шлунка. Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} склав відповідно 0,863 і 0,917. Загальний результат свідчить про існування статистично достовірної залежності з вірогідністю 0,99.

Summary.

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL DIAGNOSIS OF PRETUMOROUS PROCESSES OF GASTRIC MUCOSA

Kharchenko A.V.

Key words: DNA, amplicones, phenotype.

In the foci of epithelial dysplasia of gastric mucosa there has been revealed increased proliferative activity, which is confirmed by the increased immunohistochemical expansion of the Ki-67 marker (MI> 30.0%). The parameters of mitotic mode of gastric epithelial mucosa cells predominate in dysplasia.

Diagnostic procedures have shown DNA changes in gastric epithelium which are typical for epithelial dysplasia of varying severity. In the cases of dysplasia mentioned above the changes are manifested by the increased in size amplicones specific to each of the group. Above mentioned changes are mainly presented by the microsatellite expansion nature. There is a strong correlation between the severity of dysplasia that is determined by phenotypic characteristics and parameters specific to DNA typing of epithelial gastric mucosa. Pearson correlation coefficient r_{xy} was 0.863 and 0.917 respectively. The overall result indicates the existence of statistically significant dependence of 0.99 likelihood.