

# ЭКСПРЕССИЯ АЦЕТИЛИРОВАННОГО ТУБУЛИНА В ЭПИТЕЛИИ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ БОЛЕЗНИ КРОНА И ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Перевощиков П.А., Станилевич М.А., Портянко А.С.

*Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра патологической анатомии, г. Минск*

**Ключевые слова:** ацетилованный тубулин, язвенный колит, Крона

**Резюме:** В исследовании отражены результаты анализа экспрессии ацетилованного тубулина в 207 биопсийных фрагментах слизистой оболочки от 12 пациентов с болезнью Крона, 29 пациентов с язвенным колитом и 13 лиц с невоспаленным кишечником. Для измерения экспрессии применялись методы иммунофлуоресценции и компьютерного анализа изображений. Полученные результаты свидетельствуют об изменении экспрессии при исследуемых заболеваниях.

**Resume:** In this research we presented results of analysis of acetylated tubulin expression in 207 mucosa biopsy fragments from 12 patients with Crohn's disease, 29 patients with ulcerative colitis and from 13 people without inflammation of bowel. To measure the expression we used methods of immunofluorescence and computer image analysis. Acquired results show that expression changes in both studied diseases.

**Актуальность.** Болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК) – это хронические аутоиммунные заболевания, характеризующиеся воспалительным поражением различных отделов желудочно-кишечного тракта. Они образуют группу хронических воспалительных заболеваний кишечника (ХВЗК). Данные заболевания характеризуются прогрессирующим ростом заболеваемости. В настоящее время около 3 миллионов человек страдают заболеваниями регистрируется ежегодно [1].

Гистопатологическое исследование занимает важное место в диагностике ХВЗК. Оно позволяет провести дифференциальную диагностику БК и ЯК, определить степень активности заболевания, что необходимо для назначения адекватного лечения. Однако, в связи с тем, что данное исследование целиком опирается на обнаружение морфологических изменений в слизистой оболочке, его диагностическая ценность мала в случаях, когда данные изменения не выражены. Кроме того, при БК и в случаях фокального воспаления при ЯК невозможно определить активность воспаления. Мы считаем, что введение достоверных гистохимических маркеров в рутинную практику может помочь в решении данных проблем.

Одним из кандидатов на роль подобного маркера является ацетилированный тубулин (Асет-тубулин) – посттрансляционная модификация  $\alpha$ -тубулина. В ряде исследований было показано, что его экспрессия в клетках может изменяться под влиянием повреждающих воздействий [2,3]. Мы предполагаем, что подобные изменения также могут иметь место в клетках слизистой оболочки при ХВЗК.

**Цель:** определить изменения экспрессии Асет-тубулина в клетках слизистой оболочки толстой кишки при болезни Крона и язвенном колите

**Задачи:**

1. Выявить различия экспрессии Асет-тубулина в норме и при ХВЗК;
2. Установить наличие связи между уровнем экспрессии Асет-тубулина и активностью воспаления в слизистой оболочке;
3. Определить наличие различий экспрессии при БК и ЯК.

**Материал и методы.**

В данном исследовании было использовано 207 биопсийных фрагментов слизистой оболочки толстой кишки. Фрагменты были получены от 41 пациента с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника – 12 с болезнью Крона, 29 с язвенным колитом (группа ХВЗК), и от 13 человек с синдромом раздраженного кишечника или другими состояниями, требовавшими проведения колоноскопии с взятием биопсий (лихорадка неясного генеза, анемия неясной этиологии). Образцы, полученные от лиц без ХВЗК, не имели морфологических признаков воспаления, поэтому использовались в качестве группы контроля.

Материал был подвергнут обработке 10% нейтральным формалином и заключен в парафин. Из биоптатов готовились срезы толщиной 4 мкм, для окрашивания которых использовался гематоксилин и эозин, а также иммунное окрашивание. В качестве иммунного окрашивания использовался метод двойной иммунофлуоресценции с антителами к цитокератину и Асет-тубулину.

Микропрепараты, полученные при окраске гематоксилином и эозином, анализировались посредством световой микроскопии. Исследовалось наличие и выражен-

ность воспаления в слизистой оболочке. Признаки нейтрофильной инфильтрации поверхностного эпителия и эпителия крипт, а также признаки повреждения эпителия (эрозии, язвы) были использованы в качестве критериев активности воспаления. Все другие воспалительные изменения (изменения плотности и характера инфильтрата собственной пластинки, изменение архитектуры крипт) трактовались как признаки неактивного воспаления. По результатам анализа препараты из группы ХВЗК были разделены на 2 подгруппы – с активным и неактивным воспалением.

Микропрепараты с окраской по методу иммунофлуоресценции были использованы для проведения микрофотосъемки. Съемка проводилась с помощью микроскопа Leica DM5000B с флуоресцентной осью цифровой и камерой Leica DFC420C на увеличении  $\times 20$  по 1-2 непересекающимся полям зрения на каждый гистологический срез. Полученные изображения были подвергнуты компьютерному анализу с помощью программы ImageJ 1.47t. Алгоритм анализа включал: автоматическое выделение эпителиальных регионов на канале цитокератина, перенос границ выделения на канал Acet-тубулина и измерение среднего значения серого (СЗС) – количественное выражение флуоресценции.

Для стандартизации всех полученных величин и исключения фактора выцветания флуоресцентного красителя, мы посчитали необходимым ввести отрицательный и положительный контроль анализа. В качестве отрицательного контроля было использовано СЗС микропрепаратов, при окраске которых не использовались антитела к Acet-тубулину. В качестве положительного контроля было использовано СЗС веретенновидных клеток собственной пластинки. Мы предполагаем, что они имеют сходное с фибробластами происхождение. Нами было установлено, что данные клетки обладают более высокими значениями флуоресценции, чем колоноциты, что дает возможность использовать их как эталон экспрессии Acet-тубулина. Измерение контролей производилось на срезах нормальной слизистой оболочки.

Итоговое значение экспрессии измерялось по следующей формуле:

$$Ex = 100 \times \frac{СЗС - СЗСотр}{СЗСпол - СЗСотр}$$

Где,  $Ex$  – экспрессия, СЗС – среднее значение серого исследуемого случая, СЗСотр – отрицательный контроль, СЗСпол – положительный контроль.

Для статистического анализа полученных данных использовался пакет программ Statistica v.10 и Microsoft Excel 2010.

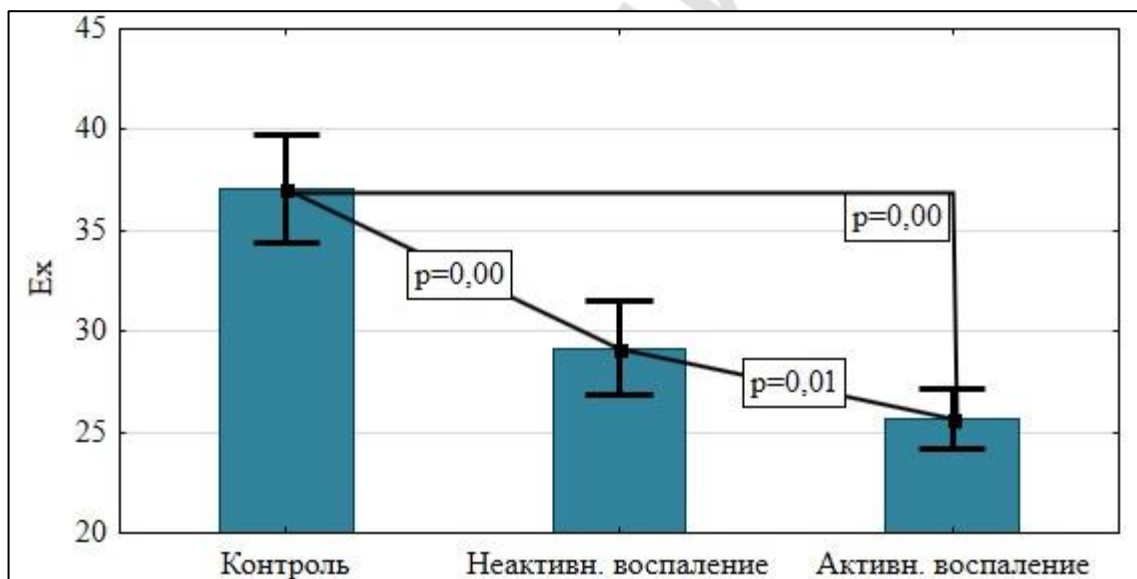
#### **Результаты и их обсуждение.**

Экспрессия Acet-тубулина была обнаружена в эпителии слизистой во всех исследуемых случаях. Установлено различие в уровнях экспрессии в группах ХВЗК и контроля: в группе контроля (нормальная слизистая оболочка) экспрессия достоверно выше,  $p=0,00$  (Табл. 1).

**Таблица 1** - Значения экспрессии Acet-тубулина в исследуемых группах

Группа	Среднее экспрессии	95% ДИ	25% квартиль	75% квартиль
Контроль	37,1	34,4 -	29,0	44,8

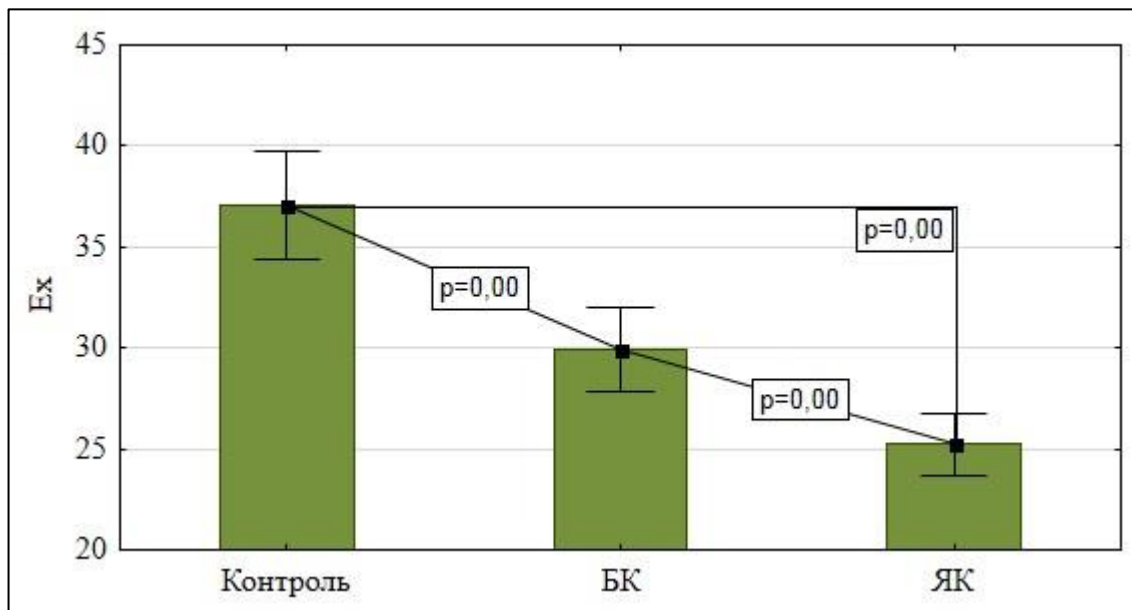
		39,7			
ХВЗК	26,7	27,9	25,4 -	19,3	33,3
Неактивное воспаление	25,9	28,3	23,5 -	19,4	32,4
Активное воспаление	23,7	25,4	22,1 -	14,2	33,0
БК	29,9	32,0	27,7 -	21,9	36,6
БК неактивное воспаление	25,6	28,1	23,0 -	20,0	31,2
БК активное воспаление	28,7	32,6	24,9 -	16,6	41,5
ЯК	25,2	26,7	23,7 -	16,7	32,13
ЯК неактивное воспаление	26,2	30,0	22,4 -	15,5	33,7
ЯК активное воспаление	22,0	23,8	20,2 -	13,5	31,6



*Рис. 1*– Зависимость экспрессии от активности воспаления

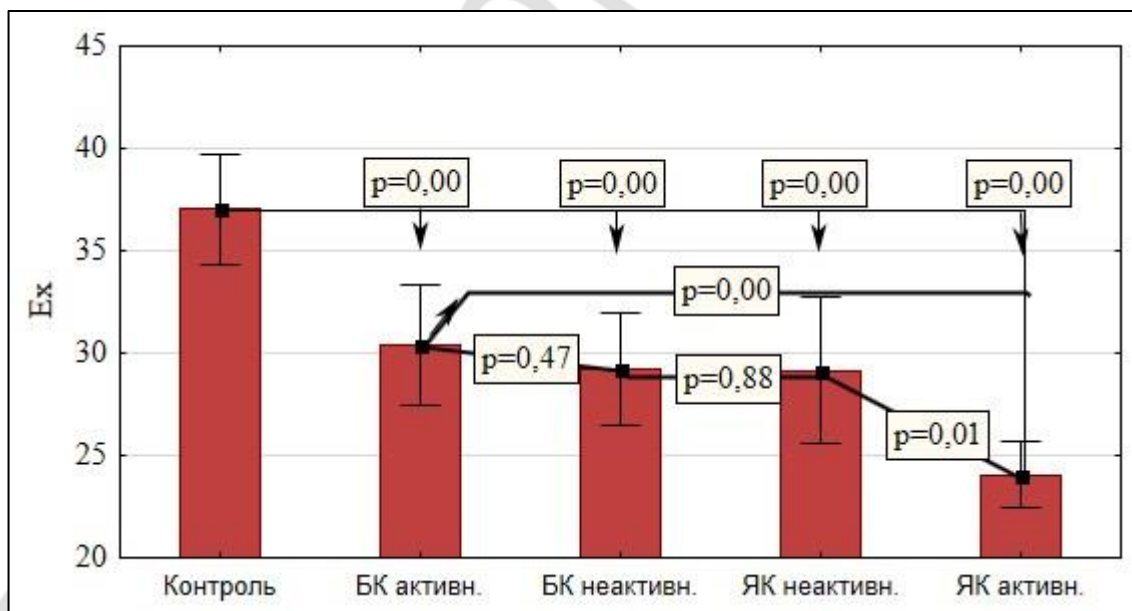
Кроме того, установлено наличие связи между экспрессией и активностью воспаления: участки слизистой оболочки с активным воспалением характеризовались более низкими значениями экспрессии (Табл. 1, рис. 1).

Имеется зависимость вышеуказанных изменений от характера нозологии: экспрессия Асет-губулина достоверно ниже при язвенном колите в сравнении с болезнью Крона (Табл. 1, рис. 2).



**Рис. 2**– Различия экспрессии при болезни Крона и язвенном колите

При более детальном статистическом анализе нам удалось установить, что данные различия связаны с тем, что при болезни Крона экспрессия не зависит от активности воспаления, напротив, при язвенном колите имеется достоверная обратная зависимость (Табл. 1, рис. 3).



**Рис. 3** - Зависимость экспрессии от активности воспаления при болезни Крона и язвенном колите

В связи с тем, что исследование подобного рода проводится впервые и тем, что многие аспекты патогенеза БК и ЯК остаются неизвестными, сложно судить о причине возникших изменений. Мы предполагаем, что основным фактором, приводящим к падению уровня экспрессии Асеп-тубулина при ХВЗК, является поврежде-

ние клеток, индуцируемое воспалением. Данная теория подтверждается тем, что при ЯК в участках активного воспаления слизистой (с признаками повреждения эпителия) значения экспрессии были самыми низкими. При БК такой зависимости нет, что представляет несомненный интерес, так как может послужить отправной точкой для изучения новых звеньев патогенеза данного заболевания и, возможно, послужит одним из пунктов дифференциальной диагностики БК и ЯК в будущем.

Кроме того, полученные нами результаты соответствуют данным научной литературы. Так в эпителии дыхательных путей крыс при прямом химическом повреждении также было обнаружено уменьшение экспрессии Асет-тубулина [2].

Роль подобных изменений также неизвестна: падение экспрессии может защитной реакцией на воздействие повреждающего агента, или напротив патологическим изменением. Так или иначе, Асет-тубулин является потенциальной мишенью для лекарственного взаимодействия.

Четкое различие экспрессии в участках неактивного и активного воспаления при язвенном колите может быть использовано для более точного определения активности воспаления, и, возможно, прогнозирования течения заболевания.

Таким образом, результаты данной работы имеют принципиальную важность для научной медицины, однако для выяснения клинической значимости обнаруженных изменений требуется проведение дополнительных исследований.

#### **Выводы:**

1. Установлено, что экспрессия Асет-тубулина при ХВЗК ниже по сравнению с нормой;
2. При язвенном колите обнаружена зависимость данных изменений от активности воспаления – для активного воспаления характерны более низкие значения экспрессии.
3. При болезни Крона уровень экспрессии не активностью воспаления.

#### **Литература**

1. Burisch, J., Jess T., Martinato M., Lakatos, P. The burden of inflammatory bowel disease in Europe // *Journal of Crohn's and Colitis*. - 2013. - №7. - P. 322–337.
2. Musah, S., Chen, J., Hoyle, G. Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury // *Respiratory Research*. – 2012. - №13. – P.107-119.
3. Shepard, B., Tuma, P. Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton // *World Journal of Gastroenterology*. - 2010. - №11. - P. 1358-1365.