

П. А. Перевощиков, С. Н. Русак

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ α -ТУБУЛИНА И ИЗОТИПОВ β -ТУБУЛИНА ПРИ БОЛЕЗНИ КРОНА И ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Научный руководитель канд. мед. наук, доц. А. С. Портянко

Кафедра патологической анатомии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. В работе представлены результаты анализа экспрессии ацетилированного и тирозинированного α -тубулина, β_I , β_{II} , β_{III} -тубулинов в слизистой оболочке толстой кишки при болезни Крона и язвенном колите. Использован биопсийный материал 27 пациентов с язвенным колитом, 9 пациентов с болезнью Крона и 23 человек группы сравнения. Измерение экспрессии проводилось путем компьютерного анализа препаратов, окрашенным методом двойной иммунофлуоресценции.

Ключевые слова: ацетилированный, тирозинированный, β_I , β_{II} , β_{III} .

Resume. In this research, we present results of analysis of expression of acetylated, tyrosinated α -tubulin, β_I , β_{II} , β_{III} -tubulins in colonic mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Biopsy material of 27 patients with ulcerative colitis, 9 patients with Crohn's disease and 23 people of control group was used for the analysis. Expression was measured by computer image analysis of immunofluorescence-stained sections.

Keywords: acetylated, tyrosinated α -tubulin, β_I , β_{II} , β_{III} -tubulin.

Актуальность. Внедрение новых лекарственных препаратов в настоящее время во многом базируется на изучении молекулярного патогенетического каскада заболеваний. Обнаружение ключевых молекул патогенеза и изучения способов воздействия на них является основой создания лекарств таргетного воздействия.

Тубулины представляют собой семейство белковых молекул, являющихся одним из главных компонентов цитоскелета. Их отличает большое разнообразие: основные типы – α - и β -тубулин представлены большим числом изоформ и посттрансляционных модификаций. Выявлено 8 генов, кодирующих изоформы α -тубулина и 7 генов β -тубулина [1]. Основа различия биомолекул – гипервариабельный С-конец. Кроме того аминокислотная последовательность может быть изменена после трансляции путем добавления или отщепления аминокислотных остатков, реакций фосфорилирования или ацетилирования. Изучена биохимическая роль подобных модификаций, однако их функции в клетке до сих пор не расшифрованы. Достоверно известно, что в ходе дифференцировки клетки происходит ремоделирование цитоскелета, одним из компонентов которого является изменение экспрессии различных модификаций тубулина [2]. Сходные изменения были обнаружены также в опухолевых клетках.

Хронические воспалительные заболевания кишечника (ХВЗК) – группа заболеваний, включающая язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), основным проявлением которых является хроническое воспаление кишечника. Этиология этих заболеваний остается неизвестной. Схема патогенеза содержит много белых пятен. Все

это наряду со сходством морфологической, эндоскопической, а во многих случаях и клинической картин обуславливает сложность их дифференциальной диагностики. Изучение особенностей ремоделирования цитоскелета при данных заболеваниях может помочь в уточнении картины патогенеза, послужить основой создания новых диагностических методик и направлений лекарственного воздействия.

Цель: Описать изменения экспрессии ацетилированного и тирозинированного α -тубулина и β _I- β _{II}- β _{III}-изотипов в слизистой оболочке толстой кишки при болезни Крона и язвенном колите.

Задачи:

1. Изучить особенности экспрессии модификаций тубулинов при БК и ЯК в сравнении с нормой.
2. Установить зависимость обнаруженных изменений и морфологических признаков воспаления.

Материал и методы. В ходе работы было использовано 233 биопсийных фрагмента слизистой оболочки толстой кишки. Биопсийный материал был получен в ходе колоноскопии от пациентов с язвенным колитом (27 человек: 15 мужчин, 12 женщин, средний возраст $35,3 \pm 5,3$ года) и болезнью Крона (9 человек: 5 мужчин, 4 женщины, средний возраст $45,8 \pm 13,8$ года). Кроме того была сформирована группа сравнения (23 человека: 8 мужчин, 15 женщин, средний возраст $47,5 \pm 5,1$ года). Поводом для проведения колоноскопии с биопсией в группе сравнения послужили следующие симптомы: хроническая диарея – 7 случаев, абдоминальная боль – 9 случаев, анемия – 5 случаев, хронический запор – 1 случай, лихорадка – 1 случай. В ходе морфологического исследования были исключены ХВЗК и другие состояния, протекающие с поражением толстого кишечника. Были установлены следующие диагнозы: функциональные заболевания кишечника – в 19 случаях, В₁₂-дефицитная анемия – в 2 случаях, целиакия – в 1 случае, другие, не связанные с кишечником, заболевания – 1 случай.

Биопсийный материал забирался в соответствии с диагностическими требованиями – не менее 2 фрагментов из каждого сегмента толстой кишки. Материал из каждого сегмента помещался в отдельный флакон. Фрагменты ткани фиксировались в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 48 ч, после чего проводились по батарее спиртов восходящей концентрации и заключались в парафин. В исследование были включены биоптаты из 2 наиболее измененных участков кишечника, мелкие малоинформативные биоптаты исключались.

Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Препараты анализировались на предмет наличия воспаления и другой структурной патологии: эрозий, интраэпителиальной нейтрофильной инфильтрации, уменьшения содержания крипт.

Для анализа экспрессии тирозинированного (Tyr), ацетилированного (Acet), β _I- β _{III}-тубулинов использовалось окрашивание по методу иммуофлуоресценции в соответствии с разработанным протоколом [4].

В качестве первичных были использованы мышинные антитела к модификациям тубулинов. Также использовались мышинные антитела к цитокератину и кроличьи антитела к цитокератину широкого спектра. При окраске серий препаратов использовались следующие комбинации антител: β _I-тубулин+WSS, β _{III}-тубулин+WSS, Асет-тубулин+АЕ1/АЕ3, Туг-тубулин+АЕ1/АЕ3. Для визуализации применялись вторичные гусиные антитела, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor[®] (Molecular Probes, Invitrogen, США) в разведении 1:200. Используемые комбинации антител представлены в таблице 1.

Таблица 1. Первичные и вторичные антитела

Первичные антитела	Изотип	Клон	Разведение	Вторичные антитела	Флуорохром, длина волны, нм
К Туг-тубулину (Sigma)	IgG3	TUB-1 A2	1:800	анти- IgG3	488
К Асет-тубулину (Sigma)	IgG2b	6-1B-1	1:800	анти-IgG2b	546
К β _I -тубулину (Sigma)	IgG ₁	SAP.4G5	1:1200	анти- IgG1	555
К β _{III} -тубулину (Promega)	IgG1	5G8	1:1000	анти-IgG1	555
К цитокератину широкого спектра (DAKO)		WSS	1:1250	анти-F(ab') ₂	488
К цитокератину (DAKO)	IgG1	AE1/AE3	1:400	анти-IgG1	488 и 555

Для оценки экспрессии β _{II}- тубулина, гистологические срезы окрашивались по методике иммуногистохимии. Использовались моноклональные мышинные антитела к β _{II}-тубулину (клон JDR3B8, изотип IgG_{2b}, разведение 1:40, BioGenex, США). Оценивалось наличие, либо отсутствие позитивного окрашивания эпителия.

Для оценки и съемки препаратов использовался микроскоп Leica DM5000B, оснащенный флуоресцентной осью и цифровой фотокамерой Leica DFC420C. Использовалось увеличение $\times 200$. На каждом тканевом фрагменте производилась съемка 1-2 неперекрывающихся поля зрения. Выбор поля зрения производился на канале цитокератина - для исключения систематической ошибки выбора, связанной с влиянием видимой позитивной искомой реакции на решение исследователя.

Анализ полученных изображений производился с использованием программного пакета eCognition Developer v.9 (Trimble, Германия). Компьютерный анализ включал этапы: выделение ядер на канале DAPI, выделение эпителиальных регионов на канале цитокератина, классификация эпителиальных структур и стромы. Полученная зона выделения накладывалась на изображения, полученные на канале тубулина и производилось измерение интенсивности флуоресценции.

Средняя интенсивность свечения региона (I_{per}) определялась как отношение

суммарной интенсивности пикселей региона к его площади. Для стандартизации полученных значений был использован внешний позитивный контроль ($I_{к+}$). В качестве $I_{к+}$ использовались структуры слизистой оболочки с высокой интенсивностью флуоресценции анализируемых тубулинов: эпителий крипт одного из препаратов группы сравнения ($T_{ур}$, β_{II}), клетки стромы препарата группы сравнения ($A_{сет}$), эпителиальные регионы с позитивной реакцией на β_{III} -тубулин в одном из препаратов группы ХВЗК. Также измерялось свечение эпителия в отрицательном контрольном препарате ($I_{эп.к-}$).

Нормализованный уровень экспрессии (НУЭ) вычислялся по формуле:

$$НУЭ = \frac{I_{рег} - I_{эп.к}}{I_{к+} - I_{стр.к-}} \times 100$$

Статистический анализ производился с использованием пакета RStudio, v. 0.98.1103 (RStudio, Inc., США).

Результаты. Экспрессия $T_{ур}$ -, $A_{сет}$ - и β_{II} -тубулина была обнаружена во всех исследованных случаях. β_{III} -тубулин в норме в эпителиальных клетках слизистой оболочки не выявлялся, напротив в части препаратов ХВЗК была обнаружена его гиперэкспрессия. β_{II} -тубулин в эпителии не выявлялся.

Было обнаружено, что содержание $T_{ур}$ -, $A_{сет}$ - и β_{II} -тубулина в поверхностном эпителии и эпителии крипт достоверно различается. Кроме того при БК и ЯК были выявлены достоверные изменения экспрессии исследуемых тубулинов в сравнении с нормой (Таблица 2).

Таблица 2. Значения экспрессии модификаций α - и β -тубулина в исследуемых группах. Жирным шрифтом обозначены значения, достоверно отличающиеся от контрольных.

	Группа	Эпителий крипт			Поверхностный эпителий		
		Среднее	Доверительный интервал		Среднее	Доверительный интервал	
			-95%	+95%		-95%	+95%
Acet	БК	37,5	32,3	42,6	26,3	21,9	30,7
	ЯК	28,5	25,4	31,3	20,0	17,6	22,3
	Контроль	44,7	40,7	48,6	32,0	28,6	35,4
T _{ур}	БК	88,5	71,3	105,7	62,7	51,9	73,6
	ЯК	77,6	69,6	85,6	56,6	50,3	62,9
	Контроль	67,6	60,7	74,6	51,7	46,3	57,0
β_{II}	БК	92,2	75,9	118,6	48,3	36,1	60,5
	ЯК	70,5	61,8	79,2	38,3	32,2	44,3
	Контроль	83,8	74,8	92,9	38,4	32,4	44,4

β_{III}	БК	4,0	1,7	6,2	3,4	1,3	5,5
	ЯК	6,0	3,6	8,5	5,8	1,9	9,6
	Контроль	1,7	0,5	2,9	0,6	-0,6	1,8

Содержание Асет-тубулина в эпителии было достоверно снижено при БК и ЯК в сравнении с нормой. При ЯК экспрессия тубулина была достоверно ниже, чем при БК. Кроме того обнаружена ассоциация данных изменений и эрозий эпителия.

При БК наблюдалась также гиперэкспрессия Туг-тубулина, в то время как при ЯК такие изменения были редки и не было выявлено достоверных отличий от нормы.

Анализ экспрессии β_I -тубулина в группе БК было выявил увеличение экспрессии содержания данного белка в поверхностном эпителии. В группе ЯК отмечено снижение уровня данного тубулина в эпителии крипт.

Наиболее выраженные изменения были обнаружены для β_{III} -тубулина. Обнаруженное ранее различие между нормальной и воспаленной слизистой оболочкой было подтверждено в ходе статистического анализа в группе ЯК. Появление его в клетках было ассоциировано с наличием эрозий, уплощением эпителия и уменьшением содержания крипт – то есть с признаками высокой активности воспаления. Несмотря на наличие сходных изменений в части препаратов БК, статистически значимых отличий от нормы не было выявлено.

Выводы:

1 Хроническое воспаление кишечника при болезни Крона и язвенном колите сопровождается перестройкой состава микротрубочек.

2 Для болезни Крона характерно: уменьшение экспрессии ацетилированного тубулина, увеличение содержания тирозинированного тубулина в эпителии крипт и β_I -тубулина в поверхностном эпителии. При язвенном колите отмечена гипоекспрессия ацетилированного тубулина и гиперэкспрессия β_{III} тубулина во всех структурах эпителия, уменьшение содержания β_I -тубулина в эпителии крипт.

P. A. Perevoschikov, S. N. Rusak

CHARACTERISTICS OF EXPRESSION OF α -TUBULIN POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND β -TUBULIN ISOTYPES IN CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS

*Tutor Associate professor A. S. Portyanko,
Department of Pathology,
Belarusian State Medical University, Minsk*

Литература

1. Fojo, T. The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology/ T. Fojo. - Hu-

70-я Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных
"Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2016"

mana Press, 2008. – 628 pp.

2. Zink, S. Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells / S. Zink [et al.] // Journal of Cell Science – 2012. – 125. – P. 5998–6008.

3. Carles, G. Differentiation of human colon cancer cells changes the expression of β -tubulin isotypes and MAPs / G. Carles [et al.] // British Journal of Cancer -1999. - 80(8). P. 1162–1168.

4. Портянко, А.С.. Экспрессия ацетилированного альфа-тубулина при хронических воспалительных заболеваниях и аденокарциноме толстой кишки. / А.С. Портянко [и др.] // Лечебное дело. – 2016. - 48(2). – С. 39-46.