

П. А. Перевоицков, М. А. Станилевич
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ АЦЕТИЛИРОВАННОГО
И ТИРОЗИНИРОВАННОГО ТУБУЛИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

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

Кафедра патологической анатомии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. В работе представлены результаты сравнения экспрессии тирозинированного и ацетилированного тубулина в эпителии слизистой оболочки норме и при воспалении. Использовано 133 биопсийных фрагмента, полученных от 26 пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника и 8 лиц группы сравнения. Экспрессия анализировалась методом компьютерного анализа иммунофлуоресцентных препаратов (ImageJ).

Ключевые слова: ацетилированный тубулин, тирозинированный тубулин, воспаление.

Resume. In this work we present results of comparison of tyrosinated and acetylated tubulin expression in normal and inflamed epithelium of mucosa. We used 133 biopsy fragments acquired from 26 patients with inflammatory bowel diseases and 8 persons of control group. Expression was analysed by computer image analysis of immunofluorescence-stained slides (ImageJ).

Keywords: acetylated tubulin, tyrosinated tubulin, inflammation.

Актуальность. Лечение пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника (ХВЗК) целиком основывается на постановке правильного диагноза, определении степени активности и распространенности воспалительного процесса. Одним из основных методов диагностики данных заболеваний является гистологическое исследование. Оно имеет большое значение для дифференциальной диагностики между болезнью Крона (БК), Язвенным колитом и другими состояниями, а также для определения степени активности воспаления. Диагностический арсенал патологоанатома невелик: в настоящее время исследование ограничивается регистрацией патоморфологических изменений в срезах слизистой оболочки. При этом многие морфологические признаки БК и ЯК сходны. Введение в практику гистохимических маркеров может расширить диагностические возможности гистологического исследования. Мы считаем, что роль таких потенциальных маркеров могут сыграть составляющие микротрубочек – тубулины. Существуют указания на изменение состава микротрубочек в клетке в условиях патологического процесса. Так прогрессия опухоли, сопровождается изменением экспрессии тирозинированного тубулина (Туг-тубулин) в клетках [1]. Эпителиальные клетки в условиях повреждения содержат существенно меньше ацетилированного тубулина (Acet-tubulin) [2]. Нами была выдвинута теория, что похожие перестройки могут наблюдаться и при хроническом воспалении.

Цель: характеристика изменений экспрессии Acet-тубулина и Туг-тубулина в эпителии толстого кишечника при ХВЗК

Материал и методы. В данной работе было использовано 133 биопсийных фрагмента слизистой оболочки толстого кишечника. Данные фрагменты были получены в ходе колоноскопии от 26 пациентов с ХВЗК (группа ХВЗК) - 18 с ЯК и 8 с БК; а также от 8 лиц с другими расстройствами, послужившими поводом для

Сборник научных трудов студентов и молодых учёных

проведения колоноскопии: 4 с синдромом раздраженного кишечника, 3 с анемией неясной этиологии, 1 с лихорадкой неясного генеза – группа сравнения.

После фиксирования в формалине и заключения в парафин из биопсийных фрагментов были приготовлены гистологические срезы толщиной 4 мкм. Далее производилось окрашивание гематоксилином и эозином по стандартной схеме. Параллельно готовились и монтировались срезы для окраски по методу двойной иммунофлуоресценции – с антителами к цитокеатину и ацетилированному, либо тиразинированному тубулину.

На первом этапе исследования препараты с окраской гематоксилином и эозином анализировались с помощью световой микроскопии. Оценивалась гистологическая активность воспаления. В качестве критериев активного воспаления использовались признаки повреждения эпителия (эрозии, язвы), а также нейтрофильная инфильтрация эпителия. Все прочие признаки воспаления (изменение характера и выраженности инфильтрата, нарушение архитектуры крипт) трактовались как признаки неактивного воспаления. На втором этапе проводилась микрофото съемка препаратов с иммунным окрашиванием. Для этой цели использовался микроскоп с флуоресцентной осью Leica DM5000, оснащенный цифровой камерой Leica DFC420c. Съемка проводилась на увеличении $\times 200$ по 1-2 непересекающимся полям зрения на каждый гистологический срез.

Далее проводился компьютерный анализ полученных изображений с помощью программы ImageJ 1.47t. Алгоритм анализа включал автоматическое выделение эпителиальных структур по каналам цитокератина, перенос зоны выделения на каналы тубулинов и производилось измерение интегрированной плотности окрашивания и площади эпителия. Кратное этих двух значений использовалось для вычисления экспрессии. Для калибровки полученных значений использовались положительный и отрицательный контроли. Отрицательный контроль – препараты без окраски с антителами к тубулинам. Положительный контроль – выбранные эталоны экспрессии для каждого тубулина.

Статистический анализ производился с использованием пакета Statistica 10 (StatSoft, Inc.) Для анализа данных использовали тест Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования экспрессия Туг-тубулина и Асет-тубулина была выявлена во всех исследуемых микропрепаратах. Однако были выявлены различия уровней экспрессии в группах контроля и ХВЗК.

Так, экспрессия Асет-тубулина в группе ХВЗК была достоверно ниже, чем в группе контроля, $p=0,00$ (таблица 1). Уровень экспрессии при активном и неактивном воспалении различался. В участках слизистой оболочки с признаками активного воспаления был достоверно снижен, $p=0,00$. В зонах неактивного воспаления значение экспрессии не отличалось от контрольного, $p=0,13$. При сравнении экспрессии Асет-тубулина в группах БК и ЯК установлено, что во второй группе экспрессия ниже, $p=0,00$. Самые низкие значения экспрессии были выявлены при активном ЯК, $p=0,00$. При неактивной болезни Крона отмечены самые высокие

значения из группы ХВЗК и экспрессия Асет-тубулина в данной группе достоверно не отличалась от нормы, $p=0,94$.

Экспрессия Туг-тубулина была достоверно повышена в группе ХВЗК, $p=0,00$ (таблица 1). Обнаружено статистически достоверное различие экспрессии в участках слизистой оболочки с разной активностью воспаления: при неактивном воспалении уровень экспрессии выше $p=0,03$. Установлено, что найденные различия являются практически полностью специфичными для болезни Крона, $p=0,00$. При язвенном колите в целом достоверных отличий от нормы не было выявлено, $p=0,16$. Статистически значимое повышение экспрессии Туг-тубулина было выявлено только при неактивном язвенном колите $p=0,03$.

Таблица 1. Экспрессия Асет- и Туг-тубулина в исследуемых группах

	Ацетилированный тубулин			Тирозинированный тубулин		
	Среднее значение	Доверительный интервал		Среднее значение	Доверительный интервал	
		-95%	+95%		-95%	+95%
Группа сравнения	35,4	32,1	38,7	48,3	42,3	54,3
ХВЗК	25,4	23,6	27,1	63,0	58,1	68,0
активное воспаление	18,0	16,5	19,6	60,7	54,7	66,8
неактивное воспаление	24,9	21,4	28,4	68,9	60,5	77,4
БК	31,0	28,1	33,9	75,4	67,4	83,4
активное воспаление	21,0	18,2	23,8	73,3	62,5	84,0
неактивное воспаление	27,0	22,6	31,5	78,7	66,0	91,5
ЯК	22,7	20,7	24,6	57,4	51,5	63,4
активное воспаление	16,9	15,0	18,7	56,3	49,2	63,4
неактивное воспаление	23,3	18,0	28,5	61,3	50,2	72,4

Заключение. Описанные в работе изменения экспрессии являются важной находкой, которая может послужить основой для разработки диагностических маркеров, прогнозирования течения заболевания, а также, возможно, создания новых методов лечения. Однако для определения клинической значимости полученных результатов требуется проведение дальнейших исследований.

Информация о внедрении результатов исследования. По результатам настоящего исследования опубликовано 3 статьи в сборниках материалов, 5 тезисов докладов, 1 статью в журнале, получено 2 актов внедрения в образовательный процесс кафедры патологической анатомии БГМУ.

P. A. Perevoschikov, M. A. Stanilevich

CHANGES IN THE COMPOSITION OF MICROTUBULES IN COLONIC MUCOSA IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Tutor associate professor A. S. Portyanko

Department of Pathology,

Belarusian State Medical University, Minsk

Литература

«Студенты и молодые учёные Белорусского государственного медицинского университета –
медицинской науке и здравоохранению Республики Беларусь»

1. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis / *Kato, C., Miyazaki, K., [et al.]* // *Int J Cancer.* – 2004. 112: 365–75.

2. Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury / *Musah, S., Chen, J. [et al.]* // *Respir Res.* - 2012. 13:107.