

П. А. Перевощиков

**ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МИКРОТРУБОЧЕК В ЭПИТЕЛИИ
ТОЛСТОЙ КИШКИ 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 данной работе представлены результаты сравнительного анализа биопсийного материала полученного от 39 пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника, 18 человек без признаков колита. Посредством анализа иммунофлуоресцентно окрашенных препаратов проводилось измерение экспрессии модификаций тубулинов в эпителиальных клетках в норме и при воспалении.*

Ключевые слова: микротрубочки, тубулин, язвенный колит, Крона.

Resume. In this study we presented results of comparative analysis of biopsy material acquired from 39 patients with inflammatory bowel disease and 18 persons without colitis signs. The measurement of expression in cells normal and inflamed tissue was performed by analysis of immunofluorescence slides.

Keywords: microtubules, tubulin ulcerative colitis, Crohn's.

Актуальность. Микротрубочки являются одной из главных составляющих цитоскелета. Посредством участия в формировании таких структур как интерфазная сеть, митотическое веретено, реснички, жгутики, межклеточные контакты, микротрубочки реализуют столь важные клеточные процессы как внутриклеточный транспорт, деление, поляризация эпителиальной клетки [2,3]. Микротрубочки образованы $\alpha\beta$ -тубулиновыми димерами, которые в свою очередь представлены целым спектром изотипов и модификаций [2]. Существуют литературные данные, что в ходе патологических процессов может наблюдаться ремоделирование структуры микротрубочек за счет изменения содержания в них тех или иных модификаций [1,4]. Логичным является предположение, что подобные перестройки тем или иным образом затрагивают вышеназванные функции клетки, что может иметь большое значение в патогенезе некоторых заболеваний. В этом исследовании мы нацелились на изучение возможной роли изменений состава микротрубочек в клетках эпителия в патогенезе хронических воспалительных заболеваний кишечника (ХВЗК) представленных двумя нозологическими формами: болезнью Крона (БК) и язвенным колитом (ЯК)

Цель: охарактеризовать изменения экспрессии β III-, ацетилированного и тирозинированного тубулина в слизистой оболочке толстой кишки при хронических воспалительных заболеваниях кишечника.

Задачи:

1. Определить наличие изменений экспрессии ацетилированного (Ацет-тубулин), тирозинированного (Туг-тубулин) и β -III тубулина при ХВЗК
2. Выявить зависимость изменений экспрессии от активности воспаления
3. Установить наличие различий экспрессии изучаемых белков при различных нозологических формах воспалительных колитов.

Материал и методы. В основу исследования легло изучение биопсийного материала: 157 биопсийных фрагментов слизистой оболочки, полученные от 39 пациентов с ХВЗК (12 с БК, 27 с ЯК); 74 биопсийных фрагмента было получено от 18 человек без воспалительного поражения толстого кишечника - этот материал был использован для формирования группы сравнения. Средний возраст в исследуемых группах составлял $38,9 \pm 4,2$ и $51,3 \pm 11,4$ соответственно.

После фиксации биопсийного материала в формалине и заключения в парафин были приготовлены гистологические срезы толщиной 4 мкм. После этого срезы окрашивались стандартным способом гематоксилином и эозином. Параллельно

готовились препараты с окраской по методу двойной иммунофлуоресценции. Гистологические срезы депарафинировались в ксилоле и регидратировались в этиловом спирте, после чего проводилась демаскировка антигенов в нагреваемой барокамере Pascal (DAKO) в течение 2,5 мин в буфере с pH 9,0 (для ацетилизованного тубулина) или pH 6,0 (для β_{III} -тубулина и тирозинированного тубулина). С целью блокирования в тканях сайтов неспецифического связывания антител препараты обрабатывались 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в течение 30 мин. Затем срезы инкубировались с коктейлем первичных антител в течение ночи при температуре 4°C. Используемые антитела представлены в таблице 1. При окраске серий препаратов использовались следующие комбинации антител: β_{III} -тубулин+WSS, Acet-тубулин+AE1/AE3, Тир-тубулин+AE1/AE3. После двукратного отмывания в Tris-буфере (pH 7,6) на срезы наносился коктейль вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами Alexa Fluor с различной длиной волны поглощения, все в разведении 1:200, Invitrogen (таблица 2). Затем срезы отмывались в Tris-буфере и заключались в среду SlowFade. Для окрашивания ядер дополнительно использовался DAPI (Invitrogen).

Таблица 1. Используемые первичные антитела

Антитело	Изотип	Клон	Разведение	Производство
К β_{III} -тубулину	IgG ₁	5G8	1:1000	Promega
К ацетилизованному α -тубулину	IgG _{2b}	6-1B-1	1:800	Sigma
К тирозинированному α -тубулину	IgG ₃	TUB-1A2	1:800	Sigma
К цитокератину широкого спектра		WSS	1:1250	DAKO
К цитокератину	IgG ₁	AE1/AE3	1:400	DAKO

Таблица 2. Визуализация первичных антител

Первичные антитела к	Вторичные антитела	Флуорохром, длина волны, нм
β_{III} -тубулину	анти-мышинные IgG ₁	555
ацетилизованному α -тубулину	анти-мышинные IgG _{2b}	546
тирозинированному α -тубулину	анти-мышинные IgG ₃	488
цитокератину (WSS)	анти-кроличьи F(ab') ₂ -	488
цитокератину (AE1/AE3)	анти-мышинные IgG ₁	488 или 555 (для комбинации с Тир-тубулином)

На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивалась гистологическая активность воспаления. В качестве признаков активного воспаления использовались нейтрофильная инфильтрация и признаки повреждения эпителия. Изменение характера и выраженности межучного инфильтрата, а также архитектоники крипт оценивались как признаки неактивного воспаления.

Морфологическая оценка осуществлялась на микроскопе Leica DM5000B с

флуоресцентной осью. Съемка препаратов с иммунным окрашиванием производилась на увеличении $\times 200$ с использованием цифровой камеры Leica DFC420C. В каждом фрагменте проводилась съемка 1-3 неперекрывающихся полей зрения. Для обработки полученных изображений использовался пакет программ ImageJ ver.1.49r. На изображениях каналов цитокератина осуществлялось автоматическое выделение эпителиальных структур. Полученная зона выделения транслировалась на микрофотографии каналов тубулинов, где измерялась интегрированная плотность флуоресценции и площадь эпителия. Кратное двух этих величин использовалось как показатель флуоресценции образца.

$$Ex = 100 \times \frac{ПФ - K_{отр}}{K_{пол} - K_{отр}};$$

Рисунок 1 – Формула для расчета показателя экспрессии

Расчет показателя экспрессии осуществлялся путем калибровки полученных величин с учетом показателей флуоресценции положительного и отрицательного контроля в каждой серии окрашиваемых препаратов. В качестве отрицательного контроля использовались препараты из группы сравнения, при окрашивании которых отсутствовал этап конъюгации с первичным антителом к тубулину. Для положительного контроля использовались показатели флуоресценции структур, принятых за эталоны позитивного окрашивания для каждой модификации тубулина: эпителиальные структуры в одном из препаратов группы сравнения (Тур-тубулин), высокопозитивные клетки собственной пластинки нормальной слизистой оболочки (Асет-тубулин), наиболее позитивные эпителиальные структуры одного из препаратов группы ХВЗК (β_{III} -тубулин). Формула для расчета показателя экспрессии представлена на рисунке 1.

Обозначения: ПФ – показатель флуоресценции исследуемого фрагмента, $K_{отр}$ – отрицательный контроль, $K_{пол}$ – положительный контроль.

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 ацетилированного и тирозинированного α -тубулина была выявлена в эпителии как нормальной слизистой оболочки, так и при ее воспалении. При этом при ХВЗК обнаружено достоверное снижение экспрессии Асет-тубулина ($p < 0,001$) и увеличение Тур-тубулина ($p < 0,05$). В отличие от этого экспрессия β_{III} -тубулина наблюдалась только в некоторых препаратах из группы ХВЗК, что также было найдено статистически достоверным ($p < 0,01$).

В ходе дальнейшего анализа было установлено, что обнаруженные изменения зависят от нозологической формы хронического колита. Так было обнаружено, что изменение экспрессии Тур-тубулина статистически достоверно только при болезни

Крона, противоположные изменения характерны для β_{III} -тубулина – повышение его экспрессии статистически достоверно только при язвенном колите (рисунок 2). Содержание в клетках ацетилированного тубулина снижается при обоих заболеваниях, однако при язвенном колите изменения более выраженные (рисунок 3). Обозначения: ** - показатель $p < 0,01$, *** - показатель $p < 0,001$. При анализе зависимости экспрессии от активности воспаления было установлено, что изменения содержания в клетках Тир- и β_{III} -тубулина также разнонаправлены – экспрессия тирозинированного тубулин достоверно повышена в эпителии с неактивным воспалением, β_{III} -тубулин появляется в эпителии с признаками активного воспаления (рисунок 4). Уровень ацетилированного тубулина достоверно не различался в зонах с разной активностью воспаления, однако при наличии признаков деструкции эпителия (эрозии, язвы) – наблюдалось значимое снижение его экспрессии ($p < 0,01$).

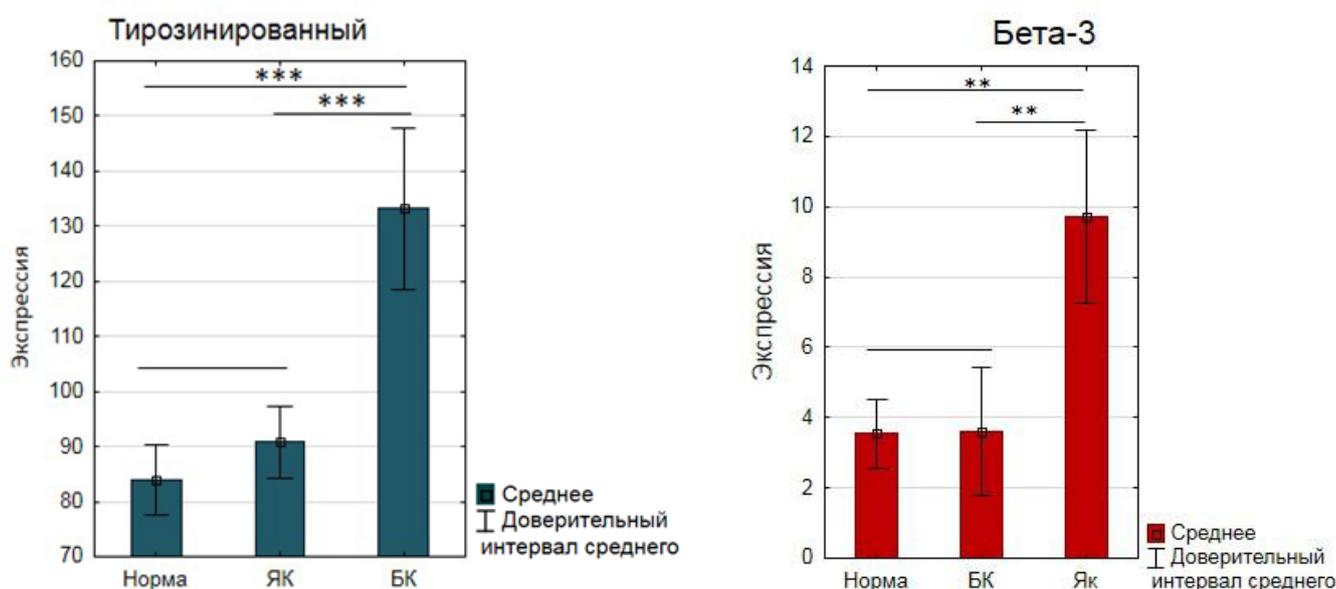
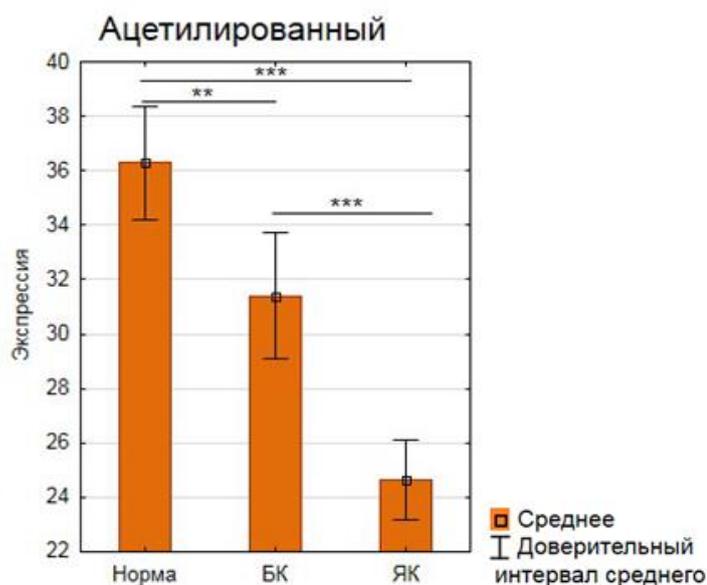


Рисунок 2 – Экспрессия Тир-тубулина и β_{III} -тубулина при болезни Крона и язвенном



КОЛИТЕ

Рисунок 3 – Экспрессия Ацет-тубулина при болезни Крона и язвенном колите

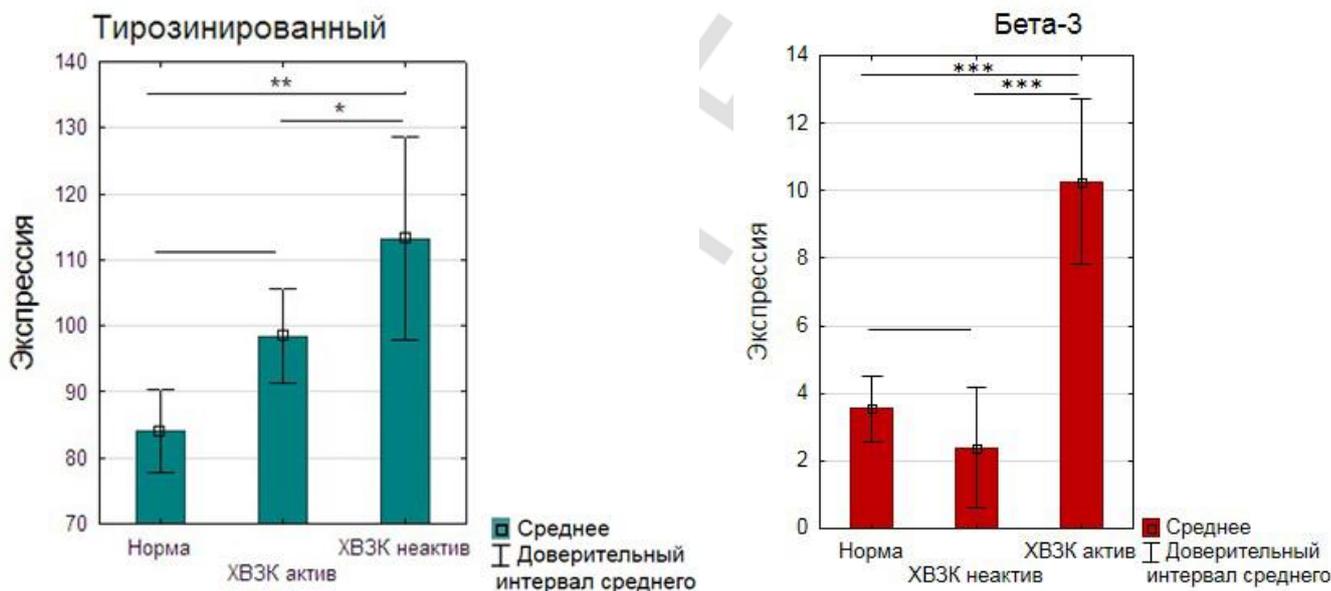


Рисунок 4 – Экспрессия Туг-тубулина и β III-тубулина в зависимости от активности воспаления

Выводы:

1 В слизистой оболочке толстого кишечника при хроническом воспалении наблюдается снижение экспрессии ацетилированного тубулина, повышение экспрессии тирозинированного тубулина и появление β III-тубулина.

2 При болезни Крона наиболее выражено изменение экспрессии тирозинированного тубулина. Для язвенного колита более характерно изменение уровня β III- и ацетилированного тубулина.

3 В зонах активного воспаления изменяется содержание β III- и ацетилированного тубулина, в участках с неактивным воспалением увеличивается экспрессия тирозинированного тубулина, в меньшей степени изменяется экспрессия ацетилированной модификации.

P. A. Perevoschikov

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

1. Differentiation of human colon cancer cells changes the expression of beta-tubulin isotypes and MAPs [Text]* / G. Carles, D. Braguer, C. Dumontet, et al.// Brest Journal Cancer. – 1999. 80: 1162-8.

69-я научно практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины и фармации-2015»

2. Fojo, T. The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology/ T. Fojo. - Humana Press, 2008. – 628 pp
3. Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells [Text]* / S. Zink, L. Grosse, A. Freikamp, et al.// Journal of Cell Science. – 2012. 125: 5998-6008.
4. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis [Text]* / A. Mialhe, L. Lafanechere, I. Treilleux, et al.// Cancer Research. – 2001. 61: 5024-5027.