

мали місце достовірні дистрофічні зміни клітин та чіткі явища атрофії каналцевого епітелію. В перитубулярних гемокапілярах виявили ознаки склерозування стінки судин та еритростази. У тварин дослідної групи знайдено деяке розширення інтерстицію з ознаками периваскулярного набряку, а також помірна лімфогістіоцитарна інфільтрація стромы, на фоні яких визначено невеликі осередки атрофії каналцевого епітелію та поодинокі ділянки склерозу інтерстицію. Більшість ниркових каналців була з дистрофічними змінами епітеліальних клітин.

Ключові слова: нирка, аутоімунний гломерулонефрит, щури, кріоконсервована плацента.

Стаття надійшла 25.12.18 р.

инфильтрации на фоне которых имели место достоверные дистрофические изменения клеток и четкие явления атрофии каналцевого эпителия. В перитубулярных гемокапиллярах обнаружены признаки склерозирования стенки сосудов и эритростазы. У животных опытной группы найдено некоторое расширение интерстиция с признаками периваскулярного отека, а также умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы, на фоне которых определены небольшие очаги атрофии каналцевого эпителия и единичные участки склероза интерстиция. Большинство почечных каналцев было с дистрофическими изменениями эпителиальных клеток.

Ключевые слова: почка, аутоиммунный гломерулонефрит, крысы, крíoоконсервированная плацента.

Рецензент Шепітько В.І.

DOI 10.26724/2079-8334-2019-1-67-155

УДК 616.441-091.8:576.385-076-06:616-006]-092.2

Н.С. Лісничук, Ю.В. Сорока, І.Я. Андрійчук, З.М. Небесна, К.С. Волков,
М.Я. Стравська, С.І. Яворська, І.В. Дарморис
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського
МОЗ України», Центральна науково-дослідна лабораторія, Тернопіль

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА BCL-2 В ТКАНИНІ СЕЛЕЗІНКИ БЛІХ ЩУРІВ В УМОВАХ ІНДУКОВАНОГО ОНКОГЕНЕЗУ

E-mail: irof_tsmu@i.ua

За умов ДМГ-індукованого канцерогенезу встановлено істотне посилення експресії гена Bcl-2 у тканині селезінки піддослідних тварин. В динаміці експерименту (30 тижнів спостереження) значно зростала кількість клітин, експресуючих ген Bcl-2, на межі червоної пульпи/ періартеріальної лімфоїдної муфти та маргінальної зони, а також в самій червоній пульпі, зберігаючи інтенсивність вираженості реакції (+ + +). Помірно виражена позитивна реакція (+ + -) виявлена в поодиноких клітинах, розкиданих по периферії всього гермінативного центру білої пульпи.

Ключові слова: імуногістохімія, селезінка, ген bcl-2, індукований онкогенез.

Робота є фрагментом НДР «Морфологічний стан селезінки та фактори імунологічної реактивності в умовах експериментального канцерогенезу» 2016-2018 рр. № державної реєстрації 011U003350.

Середньостатистична доросла людина створює і паралельно знищує біля 60 мільярдів клітин на день за рахунок народження нових клітин, утворених поділом, і за рахунок старих клітин, елімінованих, головним чином, за рахунок апоптозу. Ці взаємовизначаючі процеси створюють у нормальних умовах функціонування організму певний баланс.

Можливість контролювати кількість клітин в так званих «точках входу і виходу» дозволяє організму гнучко реагувати на стрес, травми та фізіологічні сигнали. Однак це також створює відповідальність стосовно неоплазії, оскільки гени, які зазвичай пригнічують або викликають фізіологічну смерть клітин, часто стають дисрегуляторними при ракових захворюваннях, а дефектні механізми клітинної загибелі на сучасному етапі названі однією із шести основних ознак раку [6].

Білки родини Bcl-2 відіграють центральну роль в регуляції клітинної смерті та мають здатність регулювати різні її типи, включаючи апоптоз, некроз та аутофагію, тому вони діють як вузлові точки при зближенні декількох шляхів клітинної загибелі, що має широке відношення до онкології. Зміни у їх експресії та функції сприяють патогенезу та прогресуванню ракових захворювань у людини, що відкриває нові можливості для створення медикаментозних препаратів, здатних пригнічувати онкогенез.

Експериментальна терапія, націлена на мРНК або білки родини Bcl-2, на даний час проходить клінічні випробування, що суттєво підвищує імовірність того, що найближчим часом може з'явитися новий клас протипухлинних препаратів [7, 8].

Bcl-2 був першим виявленим геном, який запобігає клітинній смерті, що має важливий вплив на біологію пухлини. Було ідентифіковано декілька членів родини білків Bcl-2 людини, здатних регулювати апоптоз, включаючи 3 антиапоптотичних, три структурно подібних проапоптотичних білки та декілька структурно різноманітних проапоптотичних взаємодіючих білки, що діють або як агоністи, або як антагоністи. Ці білки, в свою чергу, регулюються за рахунок великої кількості посттрансляційних модифікацій та взаємодій з іншими білками.

Існують чисельні підтвердження того, що регуляція генів, кодуєчих або антиапоптотичні, або проапоптотичні білки родини Bcl-2, змінюється при ракових захворюваннях. Окрім зміни структури гена Bcl-2 або кількості його копій, багато додаткових механізмів сприяють підвищенню експресії гена, яка, за оцінками, має місце майже у половині всіх ракових захворювань людини [4]. Було продемонстровано, що надлишкова експресія Bcl-2 та пов'язаних з ним антиапоптотичних білків інгібує загибель клітин, викликаних різноманітними біологічними стимулами, включаючи втрату фактора росту, гіпоксію та окисний стрес.

Здатність антиапоптотичних білків родини Bcl-2 пригнічувати клітинну смерть, викликану цитотоксичними протипухлинними препаратами, робить ці білки особливо цікавими у якості потенційної мішені для діагностики раку. Незалежно від первинного механізму дії, по суті, всіх традиційних протипухлинних препаратів (розривається одна чи дві нитки ДНК, буде чи ні деполімеризація або агрегація мікротрубочок), незалежно від активації глюкокортикоїдного рецептора або інгібування рецепторів андрогена і естрогена, найважливіша роль у знищенні ракових клітин належить Bcl-2 / Вах-залежним механізмам [3].

Таким чином, Bcl-2 працює в дистальній точці консервативного шляху клітинної смерті, який використовується більшістю протипухлинних препаратів, будучи формою внутрішньої хеморезистентності, яка відрізняється від раніше виявлених механізмів. Тому визначення ступеню експресії цілої низки білків родини Bcl-2 має важливе прогностичне значення для багатьох видів раку, при лікуванні яких застосовуються хімотерапевтичні препарати [9].

Метою роботи було визначення ступеню експресії гена Bcl-2 в тканині селезінки білих щурів в умовах розвитку аденокарциноми товстої кишки, індукованої тривалим (30 тижнів) введенням диметилгідразину дигідрохлориду.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження виконано на 168 статевозрілих безпородних білих щурах-самцях з масою тіла ($175,0 \pm 4,2$) г, які утримувались у стандартних умовах віварію. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами здійснювали із дотриманням правил «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей», а також згідно «Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» [2, 5].

Піддослідні тварини були розділені на такі групи: контрольна група тварин – 84 особини; дослідна група тварин із змодельованим аденокарциноматозом товстої кишки – 84 особини. Через кожних 30 днів експерименту з контрольної і дослідної групи було виведено по 12 тварин.

Канцерогенез моделювали шляхом введення 1,2-диметилгідразину дигідрохлориду (ДМГ) (фірми Sigma-aldrich chemie, Японія), попередньо розведеного ізотонічним розчином натрію хлориду. Канцероген вводили підшкірно в міжлопаткову ділянку в дозі 7,2 мг/кг 1 раз на тиждень впродовж 30 тижнів, чітко по масі тварини з розрахунку 0,1 мл розчину ДМГ на 10 грам маси тіла [1]. Контролем для групи тварин з введенням ДМГ були щури, яким в аналогічну ділянку тіла щотижня підшкірно вводили фізіологічний розчин у розрахунку 0,1 мл на 10 грам маси тіла.

Для фарбування методом імуногістохімії шматочки селезінки фіксували у 10% нейтральному забуференому розчині формаліну (рН 7,2-7,4), при цьому тривалість експозиції не перевищувала 1 добу. Наступним етапом була дегідратація шматочків у спиртах зростаючої концентрації в автоматі для гістологічної обробки тканин АТ-4, заливка в парафінові блоки, виготовлення гістологічних зрізів товщиною 3-4 мкм. Зрізи наносили на предметні скельця, на які була попередньо нанесена адгезивна рідина (poly-L-Lysine), далі зрізи депарафінувались відповідно з прийнятими стандартами. Наступним етапом є нанесення на гістологічні зрізи пероксидазного блоку (Peroxidase Block) на 5 хвилин.

Для визначення гену Bcl-2, як одного з основних інгібіторів апоптозу, який відповідає за збереження стабільності клітин в популяціях, використовували набір реактивів фірми Platinum ELISA (Австрія).

Результати дослідження та їх обговорення. Одним з основних інгібіторів апоптозу є ген Bcl-2, що кодує інтегральний білок мембран мітохондрій та відповідає за збереження стабільної кількості клітин органа.

Стан селезінки, як найбільшого імунокомпетентного органа, на сьогодні не досліджений на предмет вираженості експресії гена Bcl-2 ні в нормі, ні за умов розвитку патологічного процесу, особливо онкогенезу. На наш погляд, доцільним було встановлення динаміки вираженості експресії гена Bcl-2 у практично здорових тварин та у тварин, які зазнали тривалого впливу канцерогену ДМГ. Для ідентифікації популяцій лімфоїдних клітин, визначення проліферативної активності клітин та Bcl-2-позитивних клітин використовували імуногістохімічний метод.

У тварин контрольної групи при нанесенні на зрізи тканини селезінки антитіла Vcl-2 Oncoprotein (Clone 124) мала місце дифузна яскраво виражена позитивна цитоплазматична реакція (+ + +) в червоній пульпі і помірно виражена позитивна реакція в поодиноких клітинах гермінативного центру та чисельних клітинах маргінальної зони лімфоїдного вузлика (рис. 1).

В динаміці експерименту (10 тижнів від початку моделювання онкопроцесу), в залежності від часу експозиції онкогенного чинника, спостерігається зростання кількості клітин, експресуючих ген Vcl-2, в червоній пульпі, зберігаючи інтенсивність вираженості реакції (+ + +). В білій пульпі наявна помірно виражена позитивна реакція (+ + -) в поодиноких клітинах, розкиданих по периферії всього гермінативного центру та периартеріальної зони лімфоїдного вузлика (рис. 2).

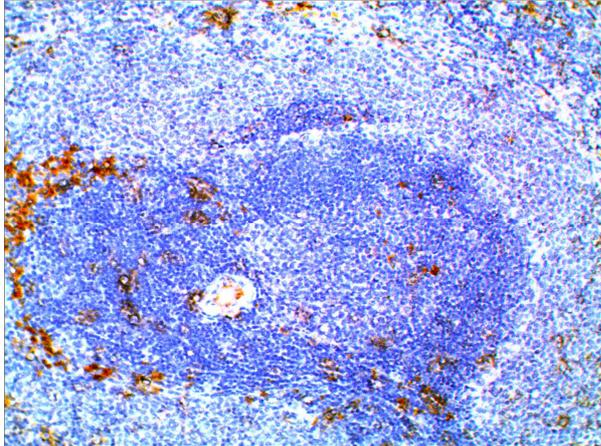


Рис. 1. Експресія Vcl-2 у тканині селезінки інтактних тварин. Помірно виражена позитивна реакція в клітинах гермінативного центру та маргінальної зони лімфоїдного вузлика. Імуногістохімічне забарвлення, система візуалізації En Vision, хромоген DAB. Дозабарвлення гематоксилином Майєра. x 400

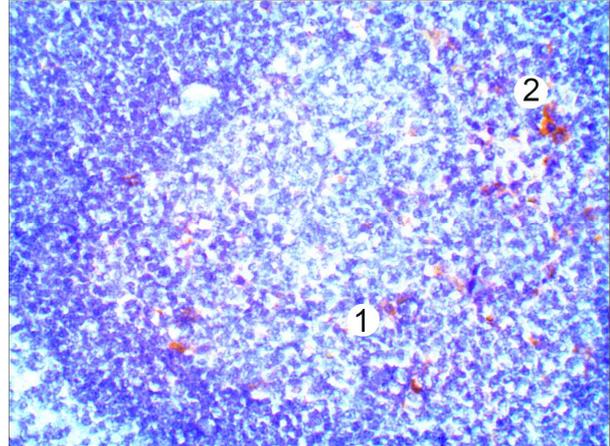


Рис. 2. Експресія Vcl-2 у селезінці щурів через 10 тижнів після початку введення ДМГ. Помірно виражена дифузна позитивна реакція в поодиноких клітинах гермінативного центру (1) та дифузно розсіяних клітинах маргінальної зони лімфоїдного вузлика (2). Імуногістохімічне забарвлення, система візуалізації EnVision, хромоген DAB. Дозабарвлення гематоксилином Майєра. x 200

Через 20 тижнів від початку введення канцерогена у тканині селезінки піддослідних тварин значно зростає кількість клітин, експресуючих ген Vcl-2, на межі периартеріальних зон з маргінальними зонами лімфоїдних вузликів білої пульпи та в самій червоній пульпі, зберігаючи інтенсивність вираженості реакції. В гермінативному центрі лімфоїдного вузлика помірно виражена позитивна реакція, цитоплазматичний тип експресії (+ + -) спостерігається в поодиноких клітинах, розкиданих по його периферії, та яскраво виражена позитивна реакція, цитоплазматичний тип експресії (+ + -) багаточисельних дифузно розсіяних та мікрогрупах клітин на межі периартеріальної зони з маргінальною зоною лімфоїдних вузликів білої пульпи (рис. 3).

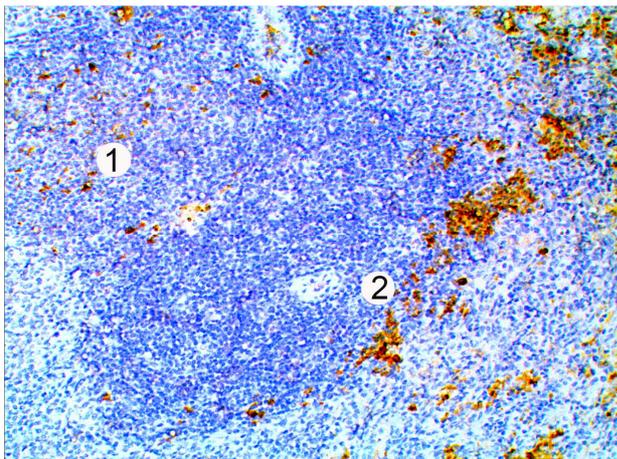


Рис. 3. Експресія Vcl-2 клітинами селезінки щурів через 20 тижнів введення ДМГ. Помірно виражена позитивна реакція в дифузно розташованих клітинах гермінативного центру (1) та багаточисельних дифузно розсіяних клітинах та мікрогрупах клітин на межі периартеріальної зони з маргінальною зоною лімфоїдного вузлика. Імуногістохімічне забарвлення, система візуалізації EnVision, хромоген DAB. Дозабарвлення гематоксилином Майєра. x 200

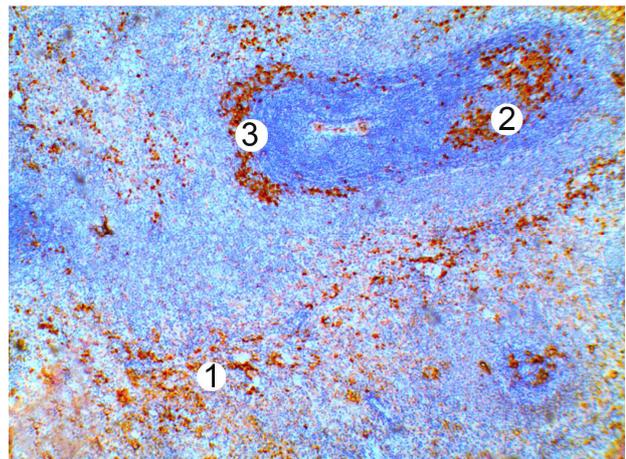


Рис. 4. Експресія Vcl-2 клітинами селезінки щурів через 30 тижнів введення канцерогена. Дифузна яскраво виражена позитивна реакція в червоній пульпі (1), яскраво виражена позитивна реакція в багаточисельних клітинах гермінативного центру (2) та маргінальної зони (3) лімфоїдного вузлика білої пульпи. Імуногістохімічне забарвлення, система візуалізації EnVision, хромоген DAB. Дозабарвлення гематоксилином Майєра. x 80

Через 30 тижнів від початку моделювання аденокарциноми товстої кишки у селезінці піддослідних тварин імуногістохімічно виявляється яскраво виражена позитивна реакція, цитоплазматичний тип експресії (+ + +) клітин в червоній пульпі, яка межує з білою, а також яскраво виражена позитивна реакція, цитоплазматичний тип експресії (+ + +) в клітинах гермінативних центрів та маргінальних зон лімфоїдних вузликів білої пульпи (рис. 4).

Висновки

1. Встановлено посилення рівня експресії гена bcl-2 клітинами структурних компонентів селезінки в залежності від часу експозиції онкогенного чинника та змін морфологічної організації досліджуваного органа. розвиток синдрому хронічної неопластичної ендотоксемії, виражені судинні розлади у тканині селезінки, дегенерація і деструкція лімфоїдної тканини супроводжуються зростанням кількості клітин, експресуючих ген bcl-2, в червоній пульпі та поширенням зон підвищеної експресії у білу пульпу.

2. Динаміка імуногістохімічних змін у тканині селезінки білих щурів за умов індукованого онкогенезу вказує на суттєве порушення фізіологічного функціонування досліджуваного органа, що може істотно вплинути як на розвиток неопластичного процесу, так і на результати цитостатичної корекції.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні стану селезінки білих щурів в умовах індукованого онкогенезу та за умов застосування препаратів корекції.

Список літератури

1. Deryagina VP, Ruzhova NI, Razin AN. Eksperimentalnoe izuchenie deystviya Lentinus Edodes (Shiitake) na rost opukhohli u myshey na modelyakh transplantatsionnogo i khimicheskogo kantserogeneza. Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal. 2009; 1: 33–38. [in Russian]
2. Kozhemiakin YuM, Khromiov OS, Filonenko MA. [ta in.] Naukovo-praktychni rekomendatsii z utrymanna laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy. Kyiv: Avicenna, 2002. 156 s. [in Ukrainian]
3. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? Trends Cell Biol. 2008; 18: 157–164.
4. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV. [et al.] miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Nat Acad Sci USA. 2005; 102: 13944–13949.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986. 56 p.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100: 57–70.
7. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell. 2008; 132: 27–42.
8. Reed JC. U777iBcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. Blood. 2008; 111: 3322–3330.
9. Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T. [et al.] Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. Hum Pathol. 2008; 39: 1042–1049.

Реферати

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА BCL-2 В ТКАНИ СЕЛЕЗЕНКИ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО ОНКОГЕНЕЗА

Лисничук Н.Е., Сорока Ю.В., Андричук И.Я.,
Небесная З. М., Волков К.С., Стравская М.Я.,
Яворская С.И., Дарморис И.В.

В условиях ДМГ-индуцированного канцерогенеза установлено существенное усиление экспрессии гена Bcl-2 в ткани селезенки подопытных животных. В динамике эксперимента (30 недель наблюдения) значительно возрастало количество клеток, активно экспрессирующих ген Bcl-2, на границе красной пульпы/периартериальной лимфоидной муфты и маргинальной зоны, а также в самой красной пульпе, сохраняя интенсивность выраженности реакции (+ + +). Умеренно выраженная положительная реакция (+ + -) установлена в единичных клетках, рассеянных по периферии всего герминативного центра белой пульпы.

Ключевые слова: иммуногистохимия, селезенка, ген bcl-2, индуцированный онкогенез.

Стаття надійшла 6.09.18 р.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE BCL-2 GENE EXPRESSION IN THE WHITE RATS' SPLEEN TISSUE IN CONDITIONS OF INDUCED ONCOGENESIS

Lisnychuk N.Ye, Soroka Yu.V., Andriichuk I.Ya,
Nebesna Z.M., Volkov K.S., Stravska M. Ya,
Yavorska S.I., Darmorys I.V.

Under the conditions of DMG-induced carcinogenesis, significant enhancement of expression of the Bcl-2 gene in the spleen tissue of the experimental animals was established. In the dynamics of the experiment (30 weeks of observation), the number of cells expressing the Bcl-2 gene, at the edge of the red pulp / periarteriolar lymphoid sheath and marginal zone, as well as in the red pulp, while maintaining the intensity of the reaction (+ + +), significantly increased. Moderately pronounced positive reaction (+ - -) was detected in single cells, scattered around the periphery of the entire germinal center of white pulp.

Key words: immunohistochemistry, spleen, Bcl-2, induced oncogenesis

Рецензент Єрошенко Г.А.