

Ключевые слова: эпендимный слой, нейральные стволовые клетки, танициты, эпендимоциты, нейроонтогенез.

Key words: ependymal layer, neural stem cells, tannocytes, ependymocytes, neuroonthogenesis.

Стаття надійшла 14.03.18 р.

Рецензент Масвський О.Є.

DOI 10.26724/2079-8334-2018-3-65-196-199

УДК 616.33

О.В. Харченко, О.О. Шерстюк
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», Полтава
Полтавський національний педагогічний університет ім. В.Г. Короленка, Полтава

НАСЛІДКИ ІНФЕКЦІЇ HELICOBACTER PYLORI

E-mail: kharchenko7591@gmail.com

В роботі показані наслідки впливу інфекції *Helicobacter pylori* на слизову оболонку шлунка. Задіяні як гістологічні методики, так і молекулярно-біологічна методика (ISSR-PCR) з використанням ISSR –праймеру S-2, із структурою (AGC)6G. Проаналізовані зміни слизової оболонки шлунка при *H. pylori*-асоційованих захворюваннях: хронічній виразковій хворобі дванадцятипалої кишки, хронічній виразковій хворобі шлунка, виразковоінфільтративному раку шлунка. Гістологічно в слизовій оболонці шлунка знайдені дисплазії трьох ступенів тяжкості (Д-1; Д-2; Д-3). Генотипічно в слизовій оболонці знайдені зміни, що відповідають мікросателітним експансіям, що є свідченням передракових змін.

Ключові слова: *Helicobacter pylori*, дисплазії, мікросателітні експансії.

Робота є фрагментом НДР «Формування сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини», № державної реєстрації 0110U002649.

Ґрунтовний аналіз проблеми «*H. pylori* і рак шлунка», проведений Міжнародною агенцією з вивчення рака (IARC) ВООЗВ 1994 році відніс інфекцію *H. pylori* до канцерогенів 1 групи. Канцерогенами 1-ї групи IARC вважають фактори зовнішнього середовища, у відповідності до яких є достатньо доказів канцерогенності для людини. Ще зовсім недавно навіть думка про те, що рак шлунка може бути пов'язаний з первинною бактеріальною інфекцією могла повидітись абсурдною, але результати досліджень останніх років роблять цю концепцію правдоподібною.

Епідеміологічні дослідження показали, що рак шлунка у інфікованих *H. pylori* зустрічається в 4-6 разів частіше, ніж у неінфікованих [1]. В країнах з високим ризиком раку шлунка враження *H. pylori* шлунка з'являються вже в ранньому дитинстві, і це дає можливість вважати, що тривала інфекція може бути причиною прогресування хронічного гастриту і раку шлунка. Має надзвичайний інтерес той факт, що значне зниження захворюваності на рак корелює з інфекуванням *H. pylori*. Так, в Японії, де захворюваність на рак шлунка була однією із самих високих у світі, смертність від нього знизилась біше ніж в два рази: у чоловіків із 100 до 40/100000 та у жінок з 50 до 20/100000. Однією з причин зниження інфекованості *H. pylori* вважається збільшення вживання в останні роки населенням різних країн поліненасичених жирів і їх есенціальних жирних кислот, що інгібують ріст *H. pylori* [7].

Метою дослідження було виявити феномен мікросателітних експансій в передпухлинних процесах та раку шлунка.

Матеріал та методи дослідження. Досліджено операційний матеріал шлунків, що резецировані з приводу інфільтративно-виразкового раку шлунка (ІВРШ) – 50, хронічної виразки шлунка (ХВШ) – 50, хронічної виразки дванадцятипалої кишки (ХВДПК) – 50. Вказані хвороби були *Helicobacter pylori*-асоційовані. У хворих для вивчення частоти виявлення дисплазій досліджувалась слизова оболонка шлунка яку брали з країв виразки(пухлини), центру виразки (пухлини), навколо пухлини, з пілоричного відділу, малої кривизни та тіла шлунка. З парафінових блоків із різних топографоанатомічних відділів слизової оболонки шлунка одержали зрізи, які фарбували гематоксилін-еозином, пікрофуксином за Ван-Гізеном, за загальноприйнятими схемами та вміщували в полістерол. Вплив інфекції *Helicobacter pylori* (HP) на стан слизової оболонки шлунка вивчали на напівтонких зрізах, виготовлених з епоксидних блоків. В якості барвника використовували 0,1% розчин толуїдинового синього на фосфатному буфері з рН 7,4. Фіксатором слугував 10% розчин нейтрального формаліну або 4% холодний розчин глютаральдегіду. При дослідженні паралельно з гістологічним методом (маркер фенотипу), за допомогою якого вивчалась динаміка дисплазій (Д) слизової оболонки шлунка (СОШ), проводилось вивчення змінень ДНК(як маркер генотипу) СОШ в динаміці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [4]. В СОШ

виявляли характер диспластичних змін покровно-ямкового епітелію та на ділянках з кишковою метаплазією. Для оцінки вираження порушень мітозу використовували визначення мітотичного режиму. Індивідуальне ДНК-типуння (генотипування) зразків СОШ проводили шляхом ампліфікації ДНК(вибіркове копіювання певних ділянок ДНК) в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) (PCR) з використанням ISSR – праймеру S2, який мав структуру: (AGC)₆G. ISSR- PCR (Inter-Simple Sequence Repeat – ампліфікація послідовностей між простими повторами) відрізняється високим рівнем інформативності.

При використанні одного ISSR- праймеру в одній реакції аналізується одразу 8-20 ДНК-локусів (фіксованих локалізацій генів на ДНК). Використання двох ISSR-систем з різними праймерами дає можливість проаналізувати 16-40 локусів. Ампліфікацію проводять в 25 мкл реакційної суміші, що містить 1× реакційний буфер з трифосфатами, праймер наведеної структури, Tag-полімерази, ДНК додають в кількості 10 – 20 нг на реакцію. Температура відпалу праймера становить 57°C, синтез фрагментів ДНК проходить в 30 циклах ампліфікації на термоциклері (ампліфікаторі) в режимі: I – 95°–2хв., II – 94°–30с, 57°–2хв, 72°–2хв., III – 72°–10хв. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводять в 2%-му горизонтальному агарозному гелі з наступним їх фарбуванням протягом 10 хв в 0,5мкг/мл розчині бромистого етидію і багаторазовою промивкою в проточній воді [5]. Візуалізацію електрофореграм (одержаних нуклеотидних послідовностей в нуклеїнових кислотах) проведено на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 365 нм з наступним фотографуванням. Визначення розмірів ампліконів (скопійованих ділянок ДНК) виконано за допомогою маркеру розміру фрагментів ДНК.

Результати дослідження та їх обговорення. Гістологічний аналіз гастральної системи при хронічній виразці шлунка, хронічній виразці дванадцятипалої кишки, виразково-інфільтративному раку шлунка, а також слизової оболонки шлунка навколо пухлини та навколо виразки, підтверджує належність виражених форм хронічного атрофічного гастриту, а також інфекції *Helicobacter pylori* до стабільного фонового стану.

При захворюванні на ХВШ та ХВДПК НР знайдені в 46 (92%) і 45 (90%) спостереженнях, але в СОШ хворих на ВІРШ бактерії виявлені лише в 35 (70%) спостереженнях відносно 50 спостережень в кожній розглянутій групі. Для всіх розглянутих випадків характерно, що дисплазія епітелію виявляється в усіх відділах шлунка. Звертає на себе увагу, що в тілі шлунка хворих на ВІРШ частота дисплазії першого ступеня (Д-I) (90,9±3,7) достовірно вище в порівнянні з ХВДПК(50,0±9,3) і ХВШ(55,9±8,5) $p<0,001$. Дисплазії другого ступеня(Д-II) у цій ділянці домінує при ВІРШ(87,9±4,2%) у порівнянні з ХВДПК(23,3±7,8%) і ХВШ(38,2±8,5%) $p<0,001$. Дисплазія третього ступеня (Д-III) при ВІРШ має достовірно найбільшу частоту(54,5±6,5%) в порівнянні з ХВДПК(3,3±3,3%) $p<0,001$. У групі ХВШ в слизовій оболонці тіла шлунка Д-III не спостерігається. Розповсюдження Д в тілі шлунка при всіх ступенях її вираження низьке. Але при ВІРШ розповсюдження Д-I в СОШ тіла достовірно вище (21,5±2,2%) ніж у хворих з ХВДПК(2,9±0,9%) і ХВШ(3,1±0,6) $p<0,001$. В пілоричному відділі розповсюдження Д-I було найбільшим при ВІРШ (32,0±1,1%), потім при ХВДПК(25,2±1,6%) і ХВШ(12,2±1,1%). Д-II і Д-III також превалювали при ВІРШ. Аналогічні співвідношення цього показника і на малій кривизні. Але найбільшим показник розповсюдження Д-I зареєстрований навколо пухлини (34,9±2,2%), що достовірно вищий в порівнянні з таким навколо виразки шлунка (13,3±1,4%) $p<0,001$. Аналогічно більшими при ВІРШ є показники розповсюдження Д-II і Д-III навколо пухлини. Характерним для всіх груп дослідження є те, що в тілі шлунка показники мітотичного режиму нижчі ніж в пілоричному відділі і на малій кривизні. Звертає на себе увагу той факт, що в тілі шлунка при ВІРШ достовірно вища кількість мітозів у метафазі 44,9±2,8% в порівнянні з показниками при ХВДПК(20,0±3,1%) і ХВШ (20,6±8,3%) $p<0,001$ (Таблиця 1).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика показників мітотичного режиму при ВІРШ, ХВШ, ХВДПК

Відділ шлунка	ВІРШ			ХВШ			ХВДПК		
	МІ	Кількість мітозів в метафазі	Кількість Патологічних мітозів	МІ	Кількість мітозів в метафазі	Кількість Патологічних мітозів	МІ	Кількість мітозів в метафазі	Кількість Патологічних мітозів
НП(НВ)*	33,1±11,8	56,9±5,8	37,3±3,5	22,3±1,7	37,3±7,8	10,6±1,3	-	-	-
*П	27,5±5,8	51,5±3,3	35,1±2,7	20,0±2,8	46,9±2,8	15,6±1,9	16,5±4,2	37,8±7,8	10,6±1,3
*МК	25,5±3,9	51,9±2,9	25,3±3,3	19,8±2,3	44,9±2,8	13,7±1,9	16,0±2,4	38,8±3,7	9,0±1,4
*Т	15,1±1,3	44,9±2,8	5,1±1,1	14,8±1,2	20,6±8,3	4,0±1,1	7,5±1,2	20,0±3,1	4,0±1,1

Примітка: *НП – навколо пухлини; НВ – навколо виразки; П – пілоричний відділ; МК – мала кривизна; Т – тіло.

При ВІРШ показники мітотичного режиму вищі від таких при ХВШ та ХВДПК. Всі вище вказані показники є свідченням певних змін на рівні тканин і клітин, тобто фенотипічні. Гістологічний метод хоч і є базисним методом в морфологічній диференційній діагностиці дисплазій і раку шлунка, але має специфічність 90% і чутливість 90%, що свідчить про обмежену роздільну здатність[3]. У комплексі з гістологічним методом виконали метод генотипування (ДНК-типування) з метою диференційної діагностики дисплазії третього ступеня і раку шлунка[2]. Генотипування епітелію СОШ пацієнтів, хворих на хронічну виразку дванадцятипалої кишки, хронічну виразку шлунка та інфільтративно-виразковий рак шлунка, виявило різні ампліфікаційні профілі ДНК(спектри ампліконів з певною послідовністю). В межах відповідних нозологічних груп ДНК-профілі відрізнялись за якісним складом[6]. Профілі маркеру СОШ в нормі містили фрагменти розміром 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п.н. (пар нуклеотидів). При хронічній виразці дванадцятипалої кишки(ХВДПК) фенотипу слабо вираженої дисплазії (Д-I) епітелію слизової оболонки шлунка ДНК-профілі були інтенсивно подовжені і мали розмір: 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120, 110, 100, 90 п.н., що відповідало 30% (15), що є мікросателітними експансіями [9]. Інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок(мікросателітні експансії) спостерігалися і при фенотипі Д-II в 27%(13) випадків мали варіант ДНК-профілів розміром 300, 260, 240, 220, 210, 190, 180, 160, 140, 120, 100 п.н.(перший варіант), решта ж 3%(2) мала ДНК-профілі (другий варіант) 500, 480, 440, 400, 360, 300, 240, 200, 140, 110, 100 п.н. Фенотипи Д-III мали ДНК-профілі з феноменом мікросателітних експансій одного варіанту 520, 500, 480 460, 440, 420, 410, 380, 360,340,320 п.н.і складали 40%(20) від загальної кількості абс.(%) (таблиця 2).

Таблиця 2

Порівняльна характеристика результатів генотипування (ДНК-типування) зразків слизової оболонки шлунка пацієнтів з ХВДПК та ХВШ

Вираженість дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка	ХВДПК	ХВШ
Д-I	30%(15)	20%(10)
Д-II I-варіант	27%(13)	12%(6)
Д-II II-варіант	3%(2)	14%(7)
Д-III I-варіант	40%(20)	50%(25)
Д-III II-варіант		4%(2)
Всього	100% (50)	100%(50)

При хронічній виразці шлунка(ХВШ) в ДНК-профілях при Д-I виявлені також мікросателітні експансії, які мали розмір – 220, 210, 200, 190, 160, 120, 110, 90, 80, 70, 60 п.н. При Д-II ДНК-профілі мали мікросателітні експансії двох варіантів, перший розміром– 320, 300, 240, 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120 п.н. і другий розміром – 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 400, 360, 300, 220 п.н. ДНК-профілі, що відповідали фенотипу Д-III мали мікросателітні експансії двох варіантів: перший розміром – 600, 580, 540, 520, 500, 480, 460, 420, 410, 340 320 п.н. і другий – 620, 610, 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440 п.н. абс. (%) (див.таблиця 2).

Висновок

Аналіз НР-асоційованих хвороб шлунка за допомогою гістологічного методу встановив наявність дисплазій слизової оболонки шлунка, які фенотипічно при ХВДПК, ХВШ і ВІРШ мають схожий вигляд, але показники мітотичного режиму епітелію СОШ при ВІРШ превалюють над такими при ХВДПК та ХВШ. Результати генотипування епітелію СОШ за реакцією ISSR-PCR пацієнтів з НР-асоційованими хворобами шлунка (ХВДПК, ХВШ і ВІРШ) показали, що диспластичні зміни при них дещо відрізняються відповідно із їхніми ДНК. Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів, хворих на інфільтративно-виразковий рак шлунка, виявило досить стабільні ДНК-профілі розміром від 520 до 620 п.н., що мали характер мікросателітних експансій в усіх спостереженнях, та були відмінні від профілю норми.

Перспективи подальших досліджень: в подальшому феномен планується дослідити на практиці з метою діагностики неопластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка.

Список літератури

1. Aruin LI, Kononov AV, Mozgovoy SI. Mezhdunarodnaya klassifikatsiya khronicheskogo gastrita: chto sleduyet prinyat i chto vyzuyayet somneniya. Arkh. pat. 2009; 4: 11 – 18. [in Russian]
2. Karseladze AI. Nekotoryye osnovopolagayushchiye ponyatiya onkomorfologii v svete dostizheniy sovremennoy molekulyarnoy biologii. Arkh. pat. 2009; 5: 17– 21. [in Russian]
3. Kononov AV, Mozgovoy SI, Markelova MV, Shimanskaya AG. Morfogenez atrofii slizistoy obolochki zheludka kak osnova fenotipa khronicheskogo gastrita. Arkh. pat. 2011; 3: 26 – 31. [in Russian]
4. Markovskiy VD, Kharchenko OV. Kompleksna patomorfologichna dyferentsiyna diahnozyka peredpukhlynykh protsesiv i raku shlunka. Patolohiya. 2012; 3: 15 – 18. [in Ukrainian]

5. Kharchenko OV. Dynamika proyaviv fenotypu dysplaziy epiteliyu slyzovoyi obolonky shlunka u vidpovidnosti z yikh henotypom na materialy vuvchennya svitlovoiy mikroskopiyi ta DNK-typuvannya za metodom ISSR-PCR. Visnyk morfologiyi (Reports of Morphology). 2009; 15(2): 396 – 402. [in Ukrainian]
6. Kharchenko OV. Mikrosatelitni ekspansiyi – molekulyarno-biologichnyi fenomen diahnostryky peredpukhlynykh i pukhlynykh protsesiv. Svit medytsyny ta biolohiyi. 2015; 2(49): 196 – 200. [in Ukrainian]
7. Haruma K., Okamoto S., Kawaguchi H. Reduced incidence of Helicobacter pylori infection in young Japanese persons between the 1970s and 1990s. – J.Clin.Gastroenterol. – 1997. – V. 25 – P. 583 – 6.

Реферати

ПОСЛЕДСТВИЯ ИНФЕКЦИИ HELICOBACTER PYLORI

Харченко А.В., Шерстюк О.А.

В работе показаны последствия влияния инфекции Helicobacter pylori на слизистую оболочку желудка. Применены как гистологические методики, так и молекулярно-биологическая методика (ISSR-PCR) с использованием ISSR –праймера S-2, со структурой (AGC)6G. Проанализированы изменения слизистой оболочки желудка при H. pylori-ассоциированных заболеваниях: хронической язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, хронической язвенной болезни желудка, язвенно инфильтративном раке желудка. Гистологически в слизистой оболочке желудка обнаружены дисплазии трёх степеней тяжести (D-I; D-II; D-III). Генотипически в слизистой оболочке обнаружены изменения соответствующие микросателлитным экспансиям, которые являются свидетельством предраковых изменений.

Ключевые слова: Helicobacter pylori, дисплазии, микросателлитные экспансии.

Стаття надійшла 16.03.18 р.

CONSEQUENCES OF HELICOBACTER PYLORI INFECTION

Kharchenko A.V., Sherstyuk O.A.

The consequences of influence of infection of Helicobacter are in-process shown pylori on the mucous membrane of stomach. Both histological methodologies and molecular-biological methodology (ISSR-PCR) are applied with ISSR-primer S-2, with the structure (AGC) 6G. The changes of mucous membrane of stomach are analysed at H. pylori- the associated diseases: chronic ulcerous illness of duodenum, chronic ulcerous illness of stomach, ulcerous infiltration cancer of stomach. Histological in the mucous membrane of stomach found out dysplasias of three degrees of weight (D-I; D-II; D-III). Genotype in a mucous membrane found out changes corresponding to microsatellite expansions that are the certificate of pre-cancer changes.

Key words: Helicobacter pylori, dysplasia, microsatellite expansions.

Рецензент Шепітько В.І.

DOI 10.26724/2079-8334-2018-3-65-199-204

UDC 611.631.013-053.34

¹T.V. Khmara, ¹M.O. Ryznychuk, ¹L.A. Sarafyniuk, ¹M.I. Kryvchanska, ¹L.I. Biriuk
¹HSEE "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi
²Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University, Vinnitsa

THE PECULIARITIES OF THE PRENATAL MORPHOGENESIS OF THE EPIDIDYMIS

E-mail: khmara.tv.6@gmail.com

Epididymis serves a critical function in the process of sperm cells maturation, since it provides with a unique liquid microbiomedium that allows maturation and survival of the spermatozoa. Therefore, the aim of our study is to clarify the patterns of the morphogenesis of the epididymis during the perinatal period of human ontogenesis. 27 series of the serial histological sections of the human embryos and prefetuses (4.0-80.0 mm of parietal-coccygeal length (PCL)) and 56 specimens of human fetuses (81.0-375.0 mm PCL) have been studied, using the methods of microscopy, macroscopy, graphic and plastic reconstruction and morphometry. It has been found that the anlage of the epididymal tubules occurs in the prefetuses 14,0-16,0 mm of PCL, and the formation of the epididymal segments (caput, corpus and cauda), as well as establishment of the correlation between the tubules of the testicle and epididymis is observed in prefetuses 18,0-65,0 mm of PCL. At the early fetal period the asymmetry of the shape and size of the right and left epididymises is observed; it is preserved during the entire fetal period and is accompanied by the process of their accelerated and slowed development. At the end of the fetal period of the ontogenesis the structure and shape of the epididymal tubular system is close to the definite state.

Keywords: epididymis, mesonephros, mesonephric duct, prenatal morphogenesis, human.

The study is a fragment of the research project "The features of morphogenesis and topography of the systems and organs in the human pre-and postnatal ontogenesis" (state registration No.0115U002769).

Knowing the nature and clarifying the time of specific transformations, which in general ensures the systemic genesis of the fetus, is extremely important in embryology. Numerous abnormalities that occur in the clinical practice can be mainly explained only on the basis of clarification of the origin and interaction of the organs and structures that eventually acquired their typical shape, and having studied the features of their topography and deeply realized relevant embryonic phenomena [1]. The epididymis serves a critical function in the process of sperm cells maturation, since it provides with a unique liquid microbiomedium that allows maturation and survival of the spermatozoa [2].

To perform its function the epididymis must undergo a complex path of the prenatal morphogenesis. The publications [4-6] report about intrauterine secretory activity of the human