

Т.Ф.Боровская, Э.Х.Курпас, С.С.Тимошин, С.Л.Бачалдин, С.Н.Гориславец

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ И СТРОМЫ НА ПРИМЕРЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КРУПНОГО ХРЯЩЕВОГО БРОНХА

Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН — НИИ охраны материнства и детства

DIFFERENT METHODS FOR CELL FISSION INVESTIGATION IN EPITHELIUM AND STROMA ON THE INSTANCE OF LARGE CARTILAGINOUS BRONCHUS MUCOSA

T.F.Borovskaya, E.Kh.Kurpas, S.S.Timoshin, S.L.Bachaldin, S.N.Gorislavets

Summary

The results of cell fission research in the epithelium and the stroma of large bronchus mucosa was done in 10 healthy persons and 73 patients with acute pneumonia according to the course of the disease. Autoradiography with ^3H -thymidine and immunohistochemistry with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were used. In all cases we obtained reliably high PCNA index of positive cell nuclei in comparison with a labeling level detected by the autoradiography. At the same time the labeling level dynamics in the epithelial and stroma cells of large bronchus mucosa maintained irrespective to the method used both in the healthy and in the course of the illness.

Резюме

Проведен анализ результатов исследования процессов клеточного деления в эпителии и строме слизистой оболочки крупных бронхов у здоровых лиц (10 человек) и больных острой пневмонией в динамике болезни (73 больных) методом автордиографии с ^3H -тимидином и методом иммуногистохимии с PCNA. Во всех случаях получили достоверно высокий индекс PCNA-положительных ядер клеток в сравнении с уровнем мечения, выявляемым методом автордиографии с ^3H -тимидином. При этом закономерности изменения уровня мечения эпителиальных и стромальных клеток слизистой оболочки крупного бронха сохранялись независимо от используемого метода как в норме, так и в динамике болезни.

Регуляция процессов клеточного деления является одной из сложнейших проблем современной биологии и медицины. Клеточное размножение обеспечивает физиологическую и репаративную регенерацию, адекватный рост и развитие особи, т.е. сохранение тканевого гомеостаза [5]. Это обеспечивается тонкими механизмами регуляции, основой которых является равновесие между стимулирующими и ингибирующими факторами. Нарушение механизмов регуляции клеточного деления ведет к гиперплазии, атрофии, метаплазии, дисплазии, а также к развитию опухолей, возникновение которых связано с нарушением равновесия между пролиферацией эпителиоцитов и их гибелью, необходимого для поддержания нормальной архитектуры ткани [2].

Состояние пролиферативной активности клеточных популяций можно исследовать несколькими методами. Мы в своей работе проводили изучение процессов клеточного деления методом автордиографии с использованием предшественника ДНК ^3H -тимидина и методом иммуногистохимии с при-

менением специфических антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток (*Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), PC-10, Clon 1*).

Тимидин — нуклеозид, участвующий в образовании полинуклеотидной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), характерен только для молекулы ДНК. Поэтому меченный тритием тимидин используется исследователями почти исключительно для изучения синтеза ДНК [1].

Использование ^3H -тимидина как меченого индикатора позволяет избирательно метить лишь те клетки, которые в данный момент синтезируют ДНК, т.е. находятся в S-периоде митотического цикла.

Белок PCNA содержится в ядре клеток, он не связан с гистоном, является вспомогательным белком для ДНК-полимеразы и необходим для синтеза ДНК. PCNA — длительно живущий протеин, его период полураспада примерно 20 ч и поэтому он может накапливаться и выявляться уже в закончивших делиться клетках и давать более высокие показатели пролиферации. Используемый нами в исследованиях

клон антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток *PC-10* распознает *PCNA* в клетках, находящихся в G_1 -, G_2 -, S-, M-периодах клеточного цикла [2,3]. Кроме того, в настоящее время появились новые свидетельства, что *PCNA* участвует не только в пролиферации клеток, но и в "ремонте" ДНК после ее повреждения [4]. Поэтому данный антиген можно считать условно специфичным к клеточному циклу, так как ремонт ДНК может осуществляться и в фазе покоя (G_0) [7].

В доступной нам литературе мы не встретили данных о показателях клеточного деления эпителиальных и стромальных клеток слизистой оболочки крупного бронха (СОКБ) при острой пневмонии, а также о характере пролиферативной активности клеток СОКБ, выявленном методом иммуногистохимии с *PCNA*.

Поэтому целью нашего исследования явилась сравнительная оценка результатов, полученных при изучении процессов клеточного деления в эпителии и строме методом автордиографии с 3H -тимидином и методом иммуногистохимии с *PCNA* в норме и динамике острой пневмонии.

В наших исследованиях группу контроля (10 человек) составили лица, поступившие в стационар по поводу инородного тела бронха. При гистологическом исследовании биоптатов, полученных от этих лиц, и при проведении морфометрии некоторых показателей (высота покровного эпителия $59,15 \pm 0,65$ мкм, толщина базальной мембраны и соединительнотканых структур, неразделимых при световой микроскопии, $9,45 \pm 0,32$ мкм, число бокаловидных клеток $3,65 \pm 0,24\%$ и МЭЛ $2,97 \pm 0,38\%$, а также количественного состава клеточных инфильтратов) мы получили результаты, аналогичные понятию "норма" в соответствии с данными литературы [8,9].

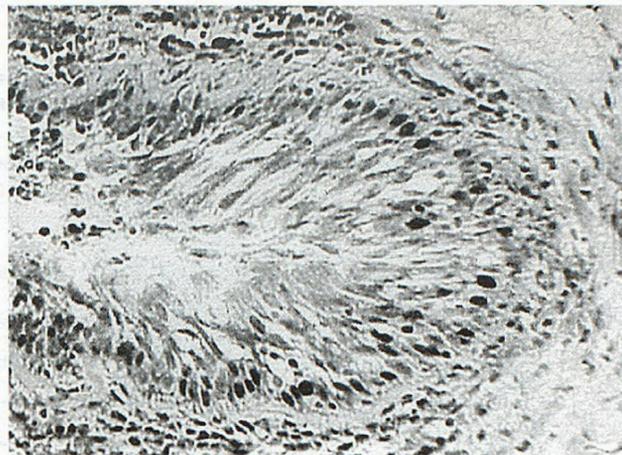


Рис.1. Больной Л., 18 лет, инородное тело нижнедолевого бронха правого легкого. Стенка хрящевого бронха: сохраненный эпителий, умеренная лимфоплазмозитарная инфильтрация собственной пластинки. Клетки эпителия и стромы, выявленные методом иммуногистохимии с использованием МКА к антигену ядер пролиферирующих клеток (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, Clon 1 — *PCNA*). Окраска альциановым синим, азур-эозином. x 500.

В связи с этим мы расценили полученные показатели пролиферации эпителия и стромы СОКБ этой группы лиц как нормальные.

В табл.1 представлены показатели пролиферативной активности эпителиального пласта и стромы СОКБ в контрольной группе, исследованные методом автордиографии с 3H -тимидином и методом иммуногистохимии с *PCNA* (рис.1).

При исследовании пролиферативной активности эпителия и стромы СОКБ было выявлено (см. табл.1), что индекс *PCNA* позитивных ядер был в 3,7 и 3,3 раза выше ($p < 0,001$ и $p < 0,02$ соответственно) индекса меченых ядер (ИМЯ) эпителия и стромы, полученных при использовании метода автордиографии с 3H -тимидином.

Как было сказано выше, при изучении процессов пролиферации методом автордиографии с 3H -тимидином, ИМЯ характеризует количество клеток, вступивших в S-период, а при использовании метода иммуногистохимии с *PCNA*, находящихся в G_0 -, G_1 -, G_2 -, S- и M-периодах клеточного цикла.

Но метод автордиографии с 3H -тимидином позволяет определять не только ИМЯ, но и интенсивности метки (ИМ) — показатель, который характеризует скорость синтеза ДНК и выявляется опосредованно через число зерен серебра над ядром. Метод же иммуногистохимии не позволяет выявлять этот показатель.

Интенсивность синтеза ДНК определяют 2 основных фактора: скорость репликации ДНК по длине единицы репликации (репликону) и число репликонов, участвующих в репродукции в течение изучаемого отрезка времени. Применяемый в автордиографических исследованиях критерий интенсивности синтеза ДНК, а именно среднее число зерен серебра над ядром (ИМ), полностью учитывает влияние обоих факторов [1]. На основании изменения этого по-

Таблица 1

Показатели пролиферативной активности эпителиального пласта и стромы СОКБ в контрольной группе

Показатель	Метод		p
	автордиография с 3H -тимидином ($n=12$)	иммуногистохимия с <i>PCNA</i> ($n=10$)	
ИМЯ эпителия	$2,06 \pm 0,16$	$7,58 \pm 0,26$	$< 0,001$
ИМ эпителия	$8,52 \pm 0,24$	—	—
ИМЯ стромы	$1,12 \pm 0,43$	$3,67 \pm 0,48$	$< 0,02$
ИМ стромы	$3,75 \pm 0,84$	—	—

Примечание. ИМЯ — индекс меченых ядер, ИМ — интенсивность метки — здесь и в таб.2 и 3; p — достоверность между показателями пролиферативной активности, выявленными методом автордиографии и методом иммуногистохимии.

Таблица 2

Показатели пролиферативной активности эпителия и стромы СОКБ, выявленные методом автордиографии с ^3H -тимидином у больных острой пневмонией в динамике болезни

Показатель	Острый период (n=24)	Период реконвалесценции (n=31)	Отдаленные сроки (n=12)	Контроль (n=12)	p_1	p_2	p_3
ИМЯ эпит.	5,64±0,49	3,86±0,66	3,67±0,35	2,06±0,16	<0,001	>0,05	>0,05
ИМ эпит.	21,65±2,32	9,56±1,45	16,16±1,94	8,52±0,24	<0,001	<0,005	<0,005
ИМЯ стр.	3,16±0,32	2,41±0,40	1,83±0,26	1,12±0,43	<0,001	>0,05	>0,05
ИМ стр.	12,49±1,95	5,01±0,75	7,19±1,09	3,75±0,84	<0,001	<0,05	<0,05

Примечание. p_1 — достоверность различий между показателями в остром периоде болезни и группы контроля, полученные методом автордиографии; p_2 — достоверность различий между показателями в периоде реконвалесценции и группы контроля, полученные методом автордиографии; p_3 — достоверность различий между показателями группы больных в отдаленные сроки и группы контроля, полученные методом автордиографии.

казателя обычно судят о замедлении или ускорении прохождения клетками S-периода, что и указывает на преимущество метода автордиографии.

Согласно данным литературы, при патологических состояниях уровень пролиферативной активности клеток СОКБ изменяется [10,11]. Поэтому мы провели исследование особенностей регенерации клеток эпителия СОКБ у больных острой пневмонией в динамике болезни, используя при этом оба метода.

Под наблюдением находились 73 больных острой пневмонией в возрасте от 17 до 24 лет (средний возраст составил $19\pm 0,11$ года). В остром периоде болезни (до начала лечения) нами было обследовано 24 больных, в периоде реконвалесценции (20-е сутки от начала лечения) — 31 и в отдаленные сроки после перенесенного заболевания (60–90 дней после окончания лечения) — 18 человек.

В табл.2 представлены показатели пролиферативной активности эпителия и стромы СОКБ у больных острой пневмонией в динамике болезни в сравнении с группой контроля, полученные методом автордиографии с ^3H -тимидином.

В остром периоде болезни (см. табл.2) мы наблюдали достоверное увеличение показателей пролифе-

ративной активности клеток эпителиального пласта и стромы. В периоде реконвалесценции показатели пролиферативной активности клеток снижались, но были выше показателей в контрольной группе. При этом достоверные отличия от показателей группы контроля имели только ИМ эпителия и клеток стромы. В отдаленные сроки после перенесенного заболевания при изучении активности процесса пролиферации нами была выявлена дальнейшая тенденция к снижению ИМЯ в эпителии и клетках стромы СОКБ в сравнении с показателями контрольной группы. Но ИМ эпителия и клеток стромы имела тенденцию к повышению в сравнении с периодом реконвалесценции и достоверное увеличение в сравнении с показателем контрольной группы.

Следовательно, уровень пролиферативной активности эпителия (ИМЯ, ИМ) имеет максимально высокие показатели в остром периоде болезни в сравнении с контролем и сопоставляемыми группами. В периоде реконвалесценции и в отдаленные сроки после перенесенной пневмонии наблюдается уменьшение уровня пролиферативной активности (ИМЯ) эпителия и стромы, но ИМ как в периоде реконвалесценции, так и в отдаленные сроки имеет досто-

Таблица 3

Показатели пролиферативной активности эпителия пласта и стромы СОКБ, выявленные методом иммуногистохимии с PCNA у больных острой пневмонией в динамике болезни

Показатель	Острый период (n=15)	Период реконвалесценции (n=25)	Отдаленные сроки (n=8)	Контроль (n=10)	p_1	p_2	p_3
ИМЯ эпит.	15,70±1,34	9,14±1,24	10,46±1,32	7,58±0,34	<0,001	>0,05	<0,05
ИМЯ стр.	12,12±1,18	7,93±0,72	5,56±0,83	3,67±0,88	<0,001	<0,002	>0,05

Примечание. p_1 — достоверность различий между показателями в остром периоде болезни и группы контроля, полученные методом иммуногистохимии; p_2 — достоверность различий между показателями в периоде реконвалесценции и группы контроля, полученные методом иммуногистохимии; p_3 — достоверность различий между показателями группы больных в отдаленные сроки и группы контроля, полученные методом иммуногистохимии.

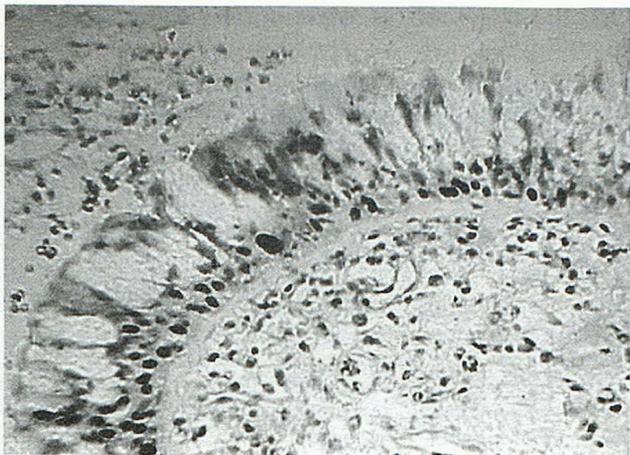


Рис.2. Больной К., 19 лет. Очаговая пневмония нижней доли левого легкого, острый период болезни. Стенка хрящевого бронха: сохраннный эпителий, увеличение числа бокаловидных клеток, умеренная лимфо-плазмоцитарная инфильтрация собственной пластинки. Увеличение индекса PCNA-положительных ядер. Клетки эпителия и стромы, выявленные методом иммуногистохимии с использованием МКА к антигену ядер пролиферирующих клеток (*Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clon 1 — PCNA*). Окраска альциановым синим, азур-эозином. x 500.

верно более высокие показатели в сравнении с контрольными цифрами.

В табл.3 также представлены показатели пролиферативной активности эпителия и стромы СОКБ у больных острой пневмонией в динамике болезни, но получены они при использовании метода иммуногистохимии с PCNA.

В остром периоде болезни (см. табл.3) у больных острой пневмонией (рис.2) индекс PCNA-положительных клеток, как в эпителии, так и в строме СОКБ, максимально высокий в сравнении с сопоставимыми группами и достоверно выше показателей в кон-

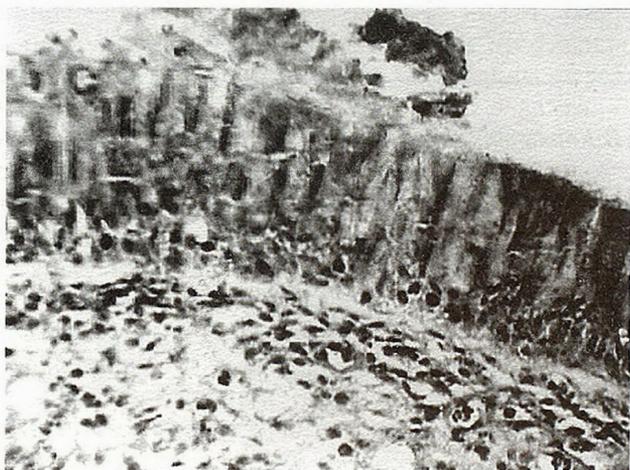


Рис.3. Больной К., 19 лет. Очаговая пневмония нижней доли левого легкого, период ранней реконвалесценции. Стенка хрящевого бронха: сохраннный эпителий, увеличение числа бокаловидных клеток, усиление лимфоплазмоцитарной инфильтрации собственной пластинки. Снижение индекса PCNA-положительных ядер. Клетки эпителия и стромы, выявленные методом иммуногистохимии с использованием МКА к антигену ядер пролиферирующих клеток (*Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clon 1 — PCNA*). Окраска альциановым синим, азур-эозином. x 500.

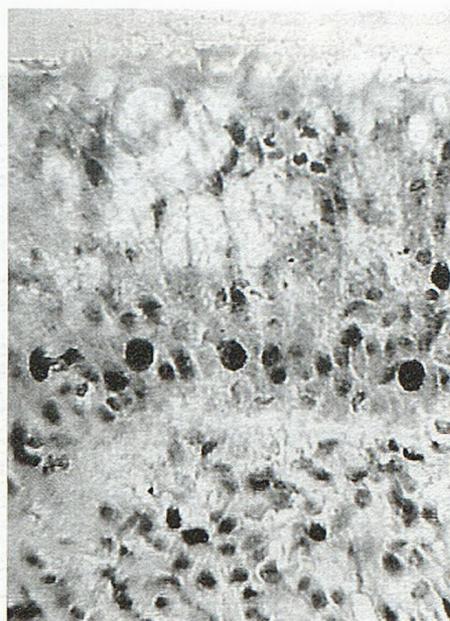


Рис.4. Больной Ш., 21 год. Очаговая пневмония нижней доли правого легкого, отдаленный период после перенесенной болезни. Стенка хрящевого бронха: сохраннный эпителий, увеличенное число бокаловидных клеток, интенсивная лимфоплазмоцитарная инфильтрация. Увеличение индекса PCNA-положительных ядер. Клетки эпителия и стромы, выявленные методом иммуногистохимии с использованием МКА к антигену ядер пролиферирующих клеток (*Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clon 1 — PCNA*). Окраска альциановым синим, азур-эозином. x 500.

трольной группе. В периоде реконвалесценции (рис.3) и в отдаленные сроки после перенесенного заболевания (рис.4) данный индекс эпителия и стромы снизился, но не достиг уровня контроля.

Определяя индекс мечения эпителия и стромы (рис.5) различными методами, мы выявили, что у больных острой пневмонией в остром периоде болезни в СОКБ индекс PCNA-положительных ядер эпителиоцитов в 3 раза, а ядер клеток стромы в 4 раза выше, чем при определении ИМЯ методом авторадииографии с ^3H -тимидином. Такая же закономерность наблюдалась и в периоде реконвалесценции, и в отдаленные сроки после перенесенной острой пневмонии, и в группе контроля. Более высокие цифры индекса PCNA-положительных ядер клеток СОКБ подтверждают данные литературы, что с помощью PCNA выявляются клетки, находящиеся не только в S-периоде клеточного цикла.

Следовательно, при исследовании пролиферативной активности эпителия и стромы СОКБ в норме и в динамике острой пневмонии методами авторадииографии с ^3H -тимидином и иммуногистохимии с PCNA мы получили достоверно высокий индекс PCNA-положительных ядер в сравнении с уровнем мечения, выявляемым методом авторадииографии с ^3H -тимидином. При этом закономерности изменения уровня мечения эпителиальных и стромальных клеток слизистой оболочки крупного бронха сохранялись независимо от используемого метода.

Таким образом, для изучения процессов клеточного деления метод иммуногистохимии с применением

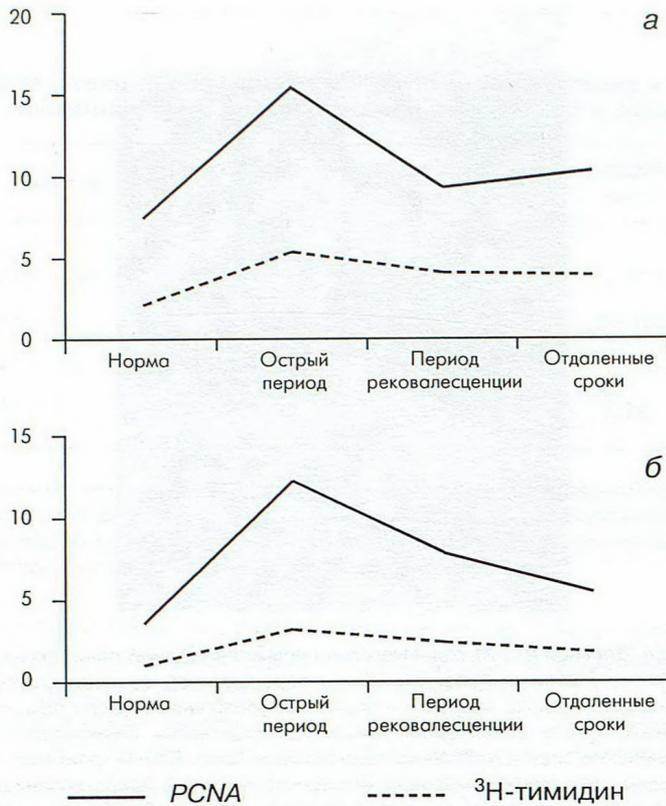


Рис.5. Сравнительная характеристика индекса мечения ядер эпителия (а) и стромы (б) слизистой оболочки крупных бронхов, выявляемого методом автордиографии с ³Н-тимидином и методом иммуногистохимии с PCNA.

антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток может быть использован совместно с методом

автордиографии с ³Н-тимидином для получения более полной характеристики процессов пролиферации эпителия и клеточного инфильтрата СОКБ в норме и при патологических состояниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Изд-во "Три-ада-Х"; 1998.
2. Епифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. Радиоавтография. М.: Высшая школа; 1977.
3. Непомнящих Г.И., Ефремов В.Н., Непомнящих Л.М., Туманов В.П. Электронно-радиоавтографическое исследование стенки крупных бронхов при хронических воспалительных процессах в легких. Бюл. exper. биол. 1985; 12: 744-748.
4. Непомнящих Г.И., Левицкий В.А., Непомнящих Л.М. и др. Феномен нестабильности бронхиального эпителия при хронической патологии легких. Там же 2000; 129 (4): 470-474.
5. Петрова С.В., Райхлина Н.Т. (ред.) Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 2-е изд. Казань; 2000.
6. Саркисов Д.С., Аруин Л.И. Обновление структур организма. В кн.: Саркисов Д.С. (ред.) Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. М.: Медицина; 1987. 49-57.
7. Целуйко С.С., Доровских В.А., Красавина Н.П. Морфофункциональная характеристика соединительной ткани органов дыхания при общем охлаждении организма. Благовещенск: Изд-во "Полисфера", 2000.
8. Целуйко С.С., Прокопенко А.В. Системный анализ компенсаторно-приспособительных реакций в легких. Благовещенск; 2001.
9. McCormick D., Hall P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. Histopathology 1992; 21: 591-594.
10. Spychal R.T., Marrero J.M., Saverymutto S.H. Measurement of the surface hydrophobicity of human gastrointestinal mucosa. Gastroenterology 1989; 97: 104-111.

Поступила 18.11.02

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.24-002-07:616.153-074

Б.И.Гельцер, Е.В.Маркелова, Е.В.Силич, И.В.Корявченкова, В.Е.Красников

СИСТЕМА ЦИТОКИНОВ ПРИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЯХ

Владивостокский государственный медицинский университет

CYTOKINE SYSTEM IN NOSOCOMIAL PNEUMONIA PATIENTS

B.I.Geltser, E.V.Markelova, E.V.Silich, I.V.Koryavchenkova, V.E.Krasnikov

Summary

Investigation results of cytokine system in the patients with nosocomial pneumonia of different severity, etiology and clinical forms are presented. The prevalent activation of Th₂-lymphocytes determining the cellular immune deficiency in nosocomial pneumonia is displayed. A dynamic increase in IL-6, IL-8, IL-10 levels with simultaneous abrupt fall in IFN γ level is a poor prognostic factor. The obtained results extend the knowledge of cytokine-mediated mechanisms of the lung injury.

Резюме

Представлены результаты исследований системы цитокинов у больных с нозокомиальными пневмониями разной степени тяжести и этиологии. Показана преимущественная активация Th₂-системы лимфоцитов, что