

© Годованець Ю.Д., Альошина Г.В.

УДК 616.36-053.31-06-076

РЕЗУЛЬТАТИ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ АПОПТОЗУ ТА ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН ПЕЧІНКИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПРИ ПЕРИНАТАЛЬНІЙ ПАТОЛОГІЇ

Ю.Д.Годованець, Г.В.Альошина

Кафедра акушерства, гінекології та перинатології (зав. – проф. О.В.Кравченко) Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Резюме. Наведено дані імуногістохімічних досліджень печінки новонароджених, які померли внаслідок перинатальних причин. Обговорюються патогенетичні основи формування апоптозу гепатоцитів. Одержані результати є суттєвим доповненням до розуміння тяжкості перебігу нозологічної патології в ранньому неонатальному періоді.

Ключові слова: новонароджені діти, печінка, апоптоз.

Клітинна смерть разом з процесами проліферації та диференціювання є найбільш важливим станом життєдіяльності клітин [1, 2]. Реалізація факторів перинатального ризику на фоні тяжкої гіпоксії є основою формування тяжких форм нозологічної патології в новонароджених дітей. Одним з найважливіших механізмів ураження тканини печінки при гіпоксії є пероксидне окиснення ліпідів та білків. За умов патологічного пологового оксидативного стресу в організмі новонародженого настає дисбаланс прооксидантної та антиоксидантної систем. Підвищена активація окисно-відновних реакцій спричиняє генерацію активних форм кисню, які мають високу реакційну здатність, сприяють окисній модифікації білків, ліпідів, нуклеїнових кислот та вуглеводів. Численні біологічні субстанції, які мають ендокринний та/або аутокринний вплив, є лише окремими ланками патогенезу процесів регенерації або апоптозу клітин печінки [2, 3].

Мета дослідження. Обґрунтувати патогенетичні основи формування апоптозу печінки в новонароджених, які померли внаслідок перинатальних причин.

Матеріал і методи. Вивчено імуногістохімічні особливості печінки 20 новонароджених, які померли внаслідок перинатальних причин. У зв'язку з необхідністю збереження для імуногістохімічних досліджень цілісності антигенів у структурах печінки виконували ранні розтини померлих дітей – до

2 годин після встановлення факту біологічної смерті. Вирізані шматочки печінки фіксували впродовж 22 годин у нейтральному забуференому 10 % водному розчині формаліну, після чого їх зневоднювали у висхідній батареї етанолу і заливали в парафін. Зрізи завтовшки 5 мкм монтували на спеціальні неімуногенні предметні скельця SuperFrost®Plus (Німеччина). Після депарафінізації зрізів та проведення послідовних етапів біотинового і пероксидазного блоку (для нейтралізації ендogenous біотину та пероксидази) імуногістохімічно визначали антигени Bcl-2, Bax та PCNA за допомогою первинних моноклональних антитіл до цих протеїнів та стрептавідін-біотинової системи візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника Dako-Cytomation (Данія). Виконували позитивні та негативні контролю, дотримувалися стандартизації протоколів кожної методики для всіх зрізів. Дофарбування ядер здійснювали за допомогою гематоксилину Майєра, причому при визначенні PCNA використовували адаптовану зменшену експозицію для кращої візуалізації позитивної PCNA-реакції в клітинних ядрах у вигляді коричневого забарвлення. Підраховували процент PCNA-позитивних ядер гепатоцитів. Кількісні дослідження інтенсивності зафарбування ядер або цитоплазми проводили так. Спочатку отримували цифрові копії (формат цифрової інформації – "Tagged Image File Format") оптичного зображення печінкової тканини при використанні об'єктива мікроскопа x40. Цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВідеоТест-Размер 5,0" (Росія). Аналіз здійснювався на підставі зондових вимірю-

вань (площа круглого зонда – 4 мкм²) інтенсивності забарвлення з отриманням величин показника "середня оптична щільність" (у відносних одиницях). Окрім імуногістохімічних реакцій, з оглядовою метою гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном і еозином. З метою приблизної оцінки інтенсивності процесів апоптозу підраховували на площі 22100 мкм² кількість структур, ідентифікованих як апоптотні тілця, та ядер з маргінацією хроматину печінкової тканини. Статистична обробка отриманих результатів проведена з використанням пакету прикладних програм "STATGRAPHICS" (2001).

Результати дослідження та їх обговорення. Тяжкість стану дітей при народженні зумовлена в 7 випадках асфіксією тяжкого ступеня (35,0 %); 5 – СДР (25,0 %); 3 – аспіраційним синдромом (15,0 %); 5 – постгіпоксичним ураженням ЦНС тяжкого ступеня (25,07 %). Серед ознак порушень функціонального стану гепатобіліарної системи в новонароджених відмічалися набряки (90,0 %), парез кишечника (90,0 %), стійкі прояви жовтяниці (60,0 %) та геморагічна симптоматика (55,0 %). Характерне збільшення розмірів печінки, яка виступала з-під краю реберної дуги в середньому на 3,8±0,23 см. У 6 новонароджених (30,0 %) був гепатолієнальний синдром.

Механізм апоптозу відіграє важливу роль у підтримці органного гомеостазу. За допомогою апоптозу з організму видаляються пошкоджені та чужорідні клітини (H.Zou et al., 1997). Механізм апоптозу спрямований на попередження розвитку патології в постембріональному розвитку органів і тканин. Якщо процес апоптозу виходить з-під контролю, загибель клітин набуває незворотного характеру (T.G.Cotter et al., 1990). Процеси передачі сигналів, які ініціюють апоптоз, призводять до ефекторних механізмів та до загибелі клітин, які знаходяться під контролем взаємодії рецепторних білків. Найбільше вивчені з них білки сімейства Bcl-2, серед яких є індуктори (Bad, Bax, Bcl-Xs) та інгібітори апоптозу (Bcl-2, Bcl-XL).

Стосовно антигену Bax, який має проапоптотичну дію, нами виявлена відмінність його експресії в цитоплазмі гепатоцитів залежно від наявності чи відсутності в них дистрофічного процесу. При відсутності дистрофічного процесу експресія (виражена) антигену Bax у цитоплазмі гепатоцитів відмічалася зрідка. Інтенсивність забарвлення цитоплазми таких гепатоцитів, за комп'ютерно-денситометричними да-

ними, становила 0,48±0,062 відносних одиниць оптичної щільності. За наявності поєднаної зернистої та гідропічної дистрофії у гепатоцитах відмічалася регулярна експресія антигену Bax, яка завжди носила дрібногранулярний характер. Інтенсивність забарвлення цитоплазми таких гепатоцитів становила 0,29±0,031 відносних одиниць оптичної щільності.

У печінці всіх померлих новонароджених мала місце значна експресія антигену Bax у цитоплазмі епітеліоцитів жовчних проток. Часто ці епітеліоцити підлягали десквамації, інколи масивній. Виражений десквамативний процес у жовчних протоках може бути причиною внутрішньопечінкового холестазу.

Слід зазначити відсутність експресії протеїну Bcl-2 як у цитоплазмі гепатоцитів, так і в цитоплазмі епітелію жовчних проток. У випадках поєднання високої експресії антигену Bax та відсутності експресії антигену Bcl-2 можна застосувати термін "проапоптотичний стан". Чи буде цей стан реалізований до рівня фрагментації ДНК, залежатиме від повноти каспазного каскаду реакцій, які мають завершуватися активацією ендонуклеаз.

Експресія антигену PCNA спостерігалася в ядрах гепатоцитів та ядрах клітин, які входили до складу вогнищ екстремедулярного кровотворення. В одних випадках експресія антигену PCNA в гепатоцитах була знайдена з невеликою частотою – 0,4-1,8 %, у інших випадках частота була більшою – в діапазоні 3,1-4,8%. Залежності імуногістохімічних характеристик клітин печінки та жовчовивідних шляхів від нозологічних форм перинатальної патології не виявлено. У вогнищах екстремедулярного кровотворення більшість клітин проявляли значну експресію антигену PCNA. Тоді, коли трактування експресії антигену PCNA у вогнищах екстремедулярного кровотворення є достатньо чітким (ці клітини енергійно проліферують), експресія антигену PCNA в ядрах гепатоцитів неоднозначна.

Висновки. 1. При дослідженні печінкової тканини імуногістохімічними методами виявлена значна експресія антигену Bax за відсутності експресії антигену Bcl-2, що свідчить про переважання у клітинах печінки "проапоптотичних" механізмів та недостатності "протиапоптотичних". 2. Переважання ядер гепатоцитів з експресією антигену PCNA може свідчити про підсилення процесів проліферації гепатоцитів.

Література

1. Бондаренко Г.І. Програмована смерть. Апоптоз і некроз: загальні риси і відмінності (огляд літератури) // Перинатол. і педіатрія. – 2001. – № 2. – С. 45-47. 2. Гарбузенко Д.В., Попов Г.К. Механізми регуляції регенерації печені // Рос. ж. гастроентерол., гепатол., колопроктології. – 2001. – № 1. – С. 21-25. 3. Taub R., Greenbaum L.E., Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and independent pathways in liver regeneration // Semin. Liver Dis. – 1999. – V. 19, № 2. – P. 117-127.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

Резюме. Представлены данные иммуногистохимических исследований печени новорождённых, умерших вследствие перинатальных причин. Обсуждаются патогенетические основы формирования апоптоза гепатоцитов. Полученные результаты являются существенным дополнением к пониманию тяжести течения нозологической патологии в раннем неонатальном периоде.

Ключевые слова: новорождённые дети, печень, апоптоз.

RESULTS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF APOPTOSIS AND CELLULAR PROLIFERATION OF NEWBORNS' LIVER IN PERINATAL PATHOLOGY

Abstract. The findings of immunohistochemical studies of the liver of newborns who died due to perinatal causes are presented. The pathogenetical principles of the apoptotic formation of hepatocytes are discussed. The obtained findings are an essential contribution to the understanding of the severity of the course of nosologic pathology at an early stage of the neonatal period.

Key words: newborn children, liver, apoptosis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 23.10.2007 р.

Рецензент – проф. І.С.Давиденко (Чернівці)

**Науково-практична конференція
з міжнародною участю**

“Інноваційні технології в хірургії”

**10-11 квітня 2008 року
м. Полтава**

Адреса оргкомітету:

**Українська медична стоматологічна академія
вул. Т.Шевченка, 23, м. Полтава, 36024
тел. (05322)26874**