

ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ ПАРАВАЗАЛЬНОЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПОЛЫХ ОРГАНОВ В РАЗЛИЧНЫЕ ВОЗРАСТНЫЕ ПЕРИОДЫ

Никель В.В.¹, Ефремова В.П.¹, Самотесов П.А.¹, Батухтина Н.П.¹, Беззаботнов В.Е.¹, Вахтина Л.Ю.¹

¹ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия (660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1), e-mail: vica-nic@mail.ru

Проведено изучение пролиферативной активности клеток паравазальной соединительной ткани полых органов: сердца, желудка, подвздошной кишки. Исследование проводилось на органах от 30 трупов мужчин трех возрастных групп (первый период зрелого возраста, пожилой и старческий возраста). Определение экспрессии Ki-67 фибробластами паравазальной соединительной ткани проводилось по иммуногистохимической методике с использованием мышиных антител (DAKO) в разведении 1:75. Визуализирующая система – DAKO REAL Detection System Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (DAKO, Дания). Подсчет количества Ki-67-позитивных клеток производился на 100-300 клеток при анализе не менее 10 полей зрения, с последующим расчетом индекса пролиферации. В результате исследования выявлено постепенное снижение количества клеток, осуществляющих экспрессию белка Ki-67, и, как следствие, находящихся в состоянии пролиферации. Установлено, что характерной чертой пролиферативной активности фибробластов паравазальной соединительной ткани полых органов является достаточно большое количество Ki-67–позитивных клеток даже в возрасте старше 75 лет.

Ключевые слова: паравазальная соединительная ткань, фибробласты, индекс пролиферации, полые органы, первый период зрелого возраста, пожилой возраст, старческий возраст.

PARTICULARITIES OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF FIBROBLASTS PARAVASAL CONNECTIVE TISSUE OF HOLLOW ORGANS AT DIFFERENT AGES

Nickel V.V.¹, Efremova V.P.¹, Samotesov P.A.¹, Batukhtina N.P.¹, Bezzabotnov V.E.¹, Vakhtina L.Y.¹

¹Krasnoyarsk State Medical University n.a. professor V.F. Voyno-Yasenetsk, Krasnoyarsk, Russia (660022, Krasnoyarsk, street P. Zheleznyaka, 1), e-mail: vica-nic@mail.ru

The study of cell proliferative activity paravasal connective tissue of hollow organs: the heart, stomach, ileum. The study was conducted on the bodies of 30 dead men three age groups (the first period of mature age, elderly). Determination of expression of Ki-67 fibroblasts paravasal connective tissue was performed by immunohistochemical technique using the mouse antibody (DAKO) at a dilution of 1:75. Imaging system - DAKO REAL Detection System Peroxidase / DAB + Rabbit / Mouse (DAKO, Denmark). Counting the number of Ki-67-positive cells was performed on 100-300 cells in the analysis of at least 10 fields of view, followed by calculation of the index of proliferation.. The study found a gradual decrease in the number of cells carrying the expression of the protein Ki-67, and as a result, are able to proliferate. It was established that a characteristic feature of proliferative activity of fibroblasts paravasal connective tissue of hollow organs is a sufficiently large number of Ki-67-positive cells even over the age of 75 years.

Keywords: paravasal connective tissue, fibroblasts, proliferation index, hollow organs, the first period of mature age, old age.

Клеточная пролиферация – один из основных биологических процессов, обеспечивающих функционирование органов и тканей и лежащих в основе их неопластической трансформации [3,7]. Универсальным маркером для оценки клеточного цикла является ядерный белок – антиген Ki-67 (клон М1В-1), по экспрессии которого можно исследовать пролиферативную активность клеток [4]. Антитела к Ki-67 выявляют пролиферирующие клетки, находящиеся в разных фазах цикла. Это наиболее надежный и

четкий маркер пролиферации, который используется как важный прогностический критерий пролиферативной активности клеток [5,8].

Антиген Ki-67, выявляемый соответствующими моноклональными антителами, представляет собой короткоживущий протеин, разрушающийся в течение 1,5-2 часов. Поэтому, антитела к Ki-67 выявляют только делящиеся клетки, т.к. Ki-67 не успевает накапливаться и не остается в покоящихся клетках [6,9].

Экспрессия данного белка неодинакова в клетках паравазальной соединительной ткани разных органов на различных этапах онтогенеза.

Целью исследования стало исследование активности процессов пролиферации фибробластов в паравазальной соединительной ткани сердца, желудка и подвздошной кишки в возрастном аспекте.

Материал и методы исследования

Для проведения исследования производился забор препаратов сердца, желудка и подвздошной кишки от 30 трупов мужчин трех возрастных групп (первый период зрелого возраста (n=10), пожилой возраст (n=10) и старческий возраст (n=10)), умерших от ненасильственной смерти с быстрым темпом умирания, от причин, не связанных с заболеваниями исследуемых органов. Забор органов производился не позднее 24 часов после констатации факта смерти.

Определение экспрессии Ki-67 в клетках паравазальной соединительной ткани проводилось по иммуногистохимической методике с использованием мышинных антител (ДАКО) в разведении 1:75. Визуализирующая система – DAKO REAL Detection System Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (ДАКО, Дания). Исследование проводилось в строгом соответствии со стандартным протоколом фирмы производителя антител (ДАКО, Дания).

При микроскопии (x400, микроскоп «Биолам»-АУ12) регистрировались клетки осуществляющие экспрессию белка Ki-67 (клон М1В-1). Подсчет количества Ki-67-позитивных клеток производился на 100-300 клеток при анализе не менее 10 полей зрения.

В результате проводилось определение индекса пролиферации (ИП) по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{количество Ki-67+ клеток}}{\text{общее количество клеток}} \times 100\%$$

С целью выявления адекватной работы системы визуализации, специфичности положительного окрашивания и для проверки соблюдения методической последовательности использовались положительные и отрицательные контроли. Для определения корректной работы антител исследовались положительные контроли, в которых

окрашивалась ткань, заведомо содержащая исследуемые антигены. Для отрицательного контроля использовались срезы тканей изучаемых органов, в которых при проведении ИГХ реакции была исключена инкубация с первичными антителами, на них наносился только дилуэнт [1].

Все проведенные исследования выполнены с соблюдением этических принципов (протокол №24/2010 заседания локального этического комитета ГОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» от 14.05.2010г.)

Все полученные количественные данные подвергались необходимой статистической обработке с помощью компьютерной программы «Statistica 6.0 for Windows». Статистический анализ включал в себя методы описательной статистики. Учитывая малый объем выборки (n=30), для оценки межгрупповых различий распределения относительных долей ИП применяли непараметрический критерий хи-квадрат (χ^2). После расчета данного критерия по стандартным таблицам находили критическое значение χ^2 с учетом количества степеней свободы, отдельно для каждой группы сравниваемых признаков. Если полученное эмпирическое значение χ^2 было больше критического – различия признавали статистически значимыми [2].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что в первом периоде зрелого возраста в клетках паравазальной соединительной ткани уровень пролиферации достаточно высокий и примерно одинаков для всех изученных органов.

Исключением из этой общей тенденции является паравазальная соединительная ткань сердца, в которой ИП в данной возрастной группе достоверно наименьший и составляет $33,60\pm 0,78$ ($\chi^2=8,91$) (таблица 1, рис. 1).

Таблица 1

Количество Ki-67–позитивных клеток в структуре паравазальной соединительной ткани полых органов, %

Возраст	Первый период зрелого возраста	Пожилой возраст	Старческий возраст
Орган	1	2	3
Сердце (n=10)	$33,60\pm 0,78$	$23,89\pm 1,71$	$19,90\pm 1,36$
	$\chi^2_{1-2} = 3,47$; $\chi^2_{1-3} = 7,16$ (P<0,01); $\chi^2_{2-3} = 0,71$		
Желудок (n=10)	$43,26\pm 0,48$	$22,78\pm 0,38$	$20,50\pm 0,79$
	$\chi^2_{1-2} = 14,06$ (P<0,01); $\chi^2_{1-3} = 19,14$ (P<0,01); $\chi^2_{2-3} = 0,34$		
Подвздошная кишка (n=10)	$43,78\pm 0,93$	$23,50\pm 0,70$	$20,24\pm 0,73$
	$\chi^2_{1-2} = 15,31$ (P<0,01); $\chi^2_{1-3} = 21,15$ (P<0,01); $\chi^2_{2-3} = 0,54$		

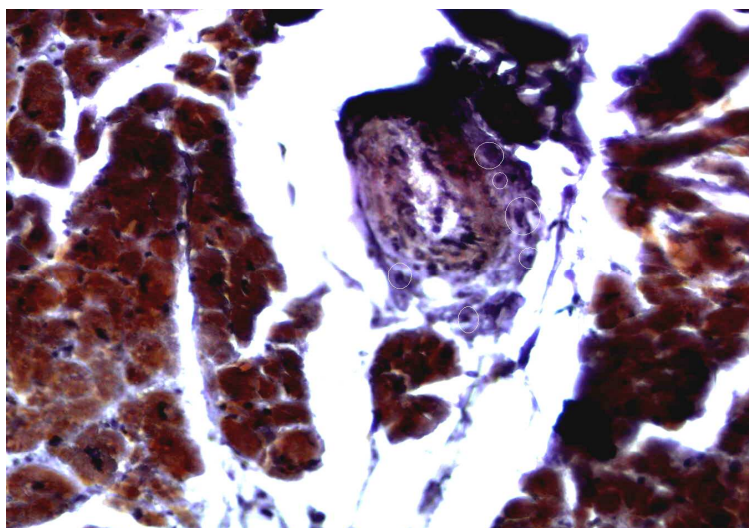


Рис. 1. Ki-67–позитивные клетки паравазальной соединительной ткани сердца мужчины 30 лет (× 400)

С возрастом установлено постепенное снижение количества клеток, осуществляющих экспрессию белка Ki-67, и, как следствие, находящихся в состоянии пролиферации. При этом, паравазальная соединительная ткань всех исследуемых органов характеризуется практически одинаковым процентным содержанием Ki-67–позитивных клеток в возрасте старше 60 лет (таблица 1).

В старческом возрасте описанная тенденция сохраняется: количество Ki-67–позитивных клеток продолжает уменьшаться (таблица 1). При этом достоверной разницы данного показателя между исследуемыми полыми органами не установлено.

Характерной чертой пролиферативной активности фибробластов паравазальной соединительной ткани полых органов является достаточно большое количество Ki-67–позитивных клеток даже в возрасте старше 75 лет (таблица 1, рис. 2).

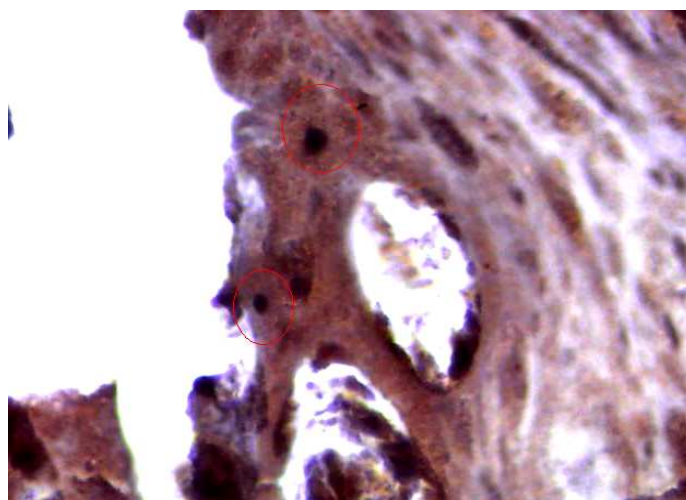


Рис. 2. Ki-67–позитивные клетки в паравазальной соединительной ткани стенки подвздошной кишки мужчины 88 лет (× 400)

Таким образом, проведенное исследование позволило установить уровень пролиферативной активности клеток соединительной ткани в возрастном аспекте. Выявлено, что в первом периоде зрелого возраста паравазальная соединительная ткань всех изучаемых органов характеризуется достаточно высоким ИП, что может свидетельствовать о больших потенциальных возможностях клеток и, следовательно, может сказываться на функциональной активности кровеносных сосудов.

Исследование показало, что в старших возрастных группах количество клеток, осуществляющих экспрессию белка Ki-67, снижается. В то же самое время выявлено, что полые органы даже после 75 летнего возраста сохраняют высокий ИП, что создает условия, в данной возрастной группе, для увеличения риска возникновения клеточных линий, имеющих мутации генов.

Заключение

Проведенное исследование позволило установить особенности пролиферативной активности клеток фибробластов паравазальной соединительной ткани сердца, желудка и подвздошной кишки мужчин в трех возрастной группах. Все полученные в результате проведенного исследования данные по определению процентного содержания Ki-67-позитивных клеток в структуре паравазальной соединительной ткани подтверждают и полностью вписываются в общие закономерности возрастной изменчивости соединительной ткани организма человека.

Список литературы

1. Бабиченко И. И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста: учеб. пособие / И. И. Бабиченко, В. А. Ковязин. – М. : РУДН, 2008. – 109 с.
2. Вентцель Е. С. Теория вероятностей / Е. С. Вентцель. – М.: Высшая школа, 1999. – 576 с.
3. Влияние аминокислот на клеточную пролиферацию и апоптоз в органической культуре тканей молодых и старых крыс / А. И. Анискина, Н. И. Чалисова, А. Н. Закуцкий [и др.] // Успехи геронтологии. – 2006. – Вып. 19. – С. 55–59.
4. Значение маркеров прогрессии при опухолях головного мозга у детей / А. В. Моргун, Т. Е. Таранушенко, А. Б. Салмина [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2007. - №1 (42). – С. 13-17.
5. Моргун А. В. Прогностическое значение индекса Ki-67 при опухолях головного мозга / А. В. Моргун, А. Б. Салмина // Вопросы современной педиатрии. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 390.
6. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – 3-е изд. доп. и перераб. – Казань: Титул, 2004. – 456 с.

7. Plasma alpha-tocopherol is negatively correlated with hepatocyte apoptosis in chronic hepatitis B patients / X. P. Fan, K. Wang, Y. Liu [et al.] // Intern. Med. – 2009. – Vol. 48, № 18. – P. 1585–1593.
8. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 as predictors of survival for renal cell carcinoma / M. H. Bui, H. Visapaa, D. Seligson [et al.] // J. Urol. – 2004. – Vol. 171, № 6. – P. 2461–2466.
9. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential / R. Yerushalmi, R. Woods, P. M. Ravdin [et al.] // Lancet Oncol. – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 174–183.

Рецензенты:

Горбунов Н.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск;

Синдеева Л.В., д.м.н., доцент кафедры анатомии и гистологии человека ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.