

М.Т. Луценко

КОМПЬЮТЕРНАЯ ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ПРОЦЕССА АПОПТОЗА В ЯДРАХ СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА ВОРСИН ПЛАЦЕНТЫ У РОДИЛЬНИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ ВСПЫШКУ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Лаборатория «Механизмы этиопатогенеза и восстановительных процессов органов дыхания при неспецифических заболеваниях легких» (зав. — академик РАМН проф. М.Т. Луценко) Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН, г. Благовещенск

Изучали развитие процесса апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсин плаценты 50 родильниц, перенесших во второй половине беременности вспышку герпесвирусной инфекции (титр антител — 1:12 800). Контрольную группу составил материал плаценты 20 не болевших женщин. На парафиновых срезах после фиксации в 10% забуференном формалине выявляли апоптоз путем метки фрагментов ДНК *in situ* (ISEL-метод). Оценку проводили на основании изучения 2000 ядер в 100 терминальных ворсинах из различных участков гистологического среза в каждой плаценте. Ядра на срезах анализировали с использованием компьютерной программы Bio Vision, позволяющей выявить участки с различной степенью конденсации хроматина в процессе развития апоптоза.

Ключевые слова: плацента, синцитиотрофобласт, ядро, апоптоз, герпесвирусная инфекция.

Целью настоящего исследования явилось изучение процесса развития апоптоза с помощью компьютерной программы Bio Vision, дающей возможность разделять ядра в состоянии апоптоза на участки (фазы) различной яркости, измеренные в пикселях. В качестве объекта изучения выбраны ядра синцитиотрофобласта ворсин плаценты, полученной у женщин, перенесших во время беременности вспышку герпесвирусной инфекции поскольку известно, что эта инфекция приводит к появлению в синцитиотрофобласте до 2% ядер в состоянии апоптоза.

Исследовали плаценту 50 женщин, перенесших вспышку герпесвирусной инфекции в III триместре, с антителами к вирусу герпеса второго типа. Контролем служила плацента 20 женщин, которые за период беременности не переносили никаких заболеваний. Все женщины с начала беременности до поступления в родильное отделение находились под контролем (ежемесячное плановое углубленное обследование) в клинике физиологии и патологии беременных Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания Сибирского Отделения РАМН. Беременность завершилась у всех обследованных в нормальные сроки. Возраст женщин колебался от 20 до 25 лет.

Материал получали из центральной части плаценты, фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 12–24 ч. После заливки в парафин

изготавливали серийные срезы толщиной 4–5 мкм с помощью стеклянных ножей LKB 2078 Histo Knife Maker (LKB-Produkter, Bromma, Швеция).

Срезы помещали на стекла фирмы Shandon (США), которые подогревали слегка на термостойке при 30°C и придавливали на стекле. С помощью Flammable Dako Pen NS2002 (Dako, Дания) окантовывали участок, помещая на него срез, который депарафинировали. Апоптоз исследовали ISEL-методом (In Situ End Labeling) [4] с помощью реагентов фирмы Oncor (Франция). Метод основан на использовании экзогенного фермента — терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (ТДТ), который может инкорпорировать меченые нуклеотиды в места разрывов цепи ДНК, вызванные эндонуклеазами, осуществляющими процесс апоптоза.

Морфологическую классификацию апоптоза проводили на парафиновых срезах по метке концов фрагментов ДНК *in situ* [4]. Срезы после регидратации в дистиллированной воде в течение 30 мин инкубировали в 3% растворе перекиси водорода и отмывали 0,15 М фосфатно-солевым буфером (PBS) (0,15 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5). Затем срезы инкубировали в смеси 0,3 М NaCl и 30 мМ цитрата натрия (pH 7,0; 80°C, 20 мин) и отмывали 0,15 М PBS. После этого срезы инкубировали в растворе проназы (1 мг/мл на 0,15 М PBS; Calbiochem, США) при комнатной температуре в течение 30 мин.

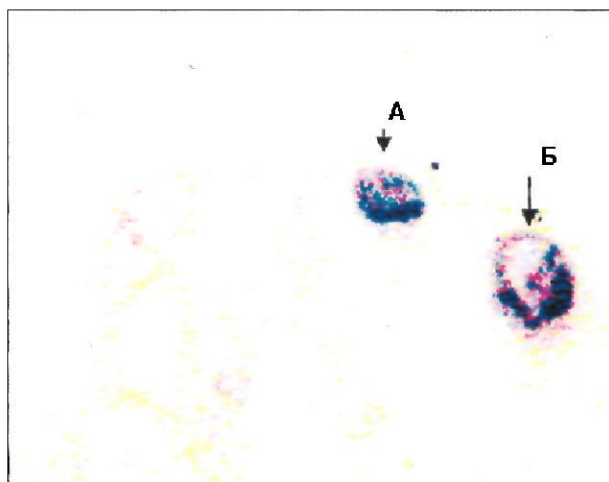


Рис. 1. Терминальная ворсина плаценты родильницы, перенесшей герпесвирусную инфекцию.

А, Б — реакция на апоптоз в ядрах ворсин. ISEL-метод. Об. 90, ок. 10.

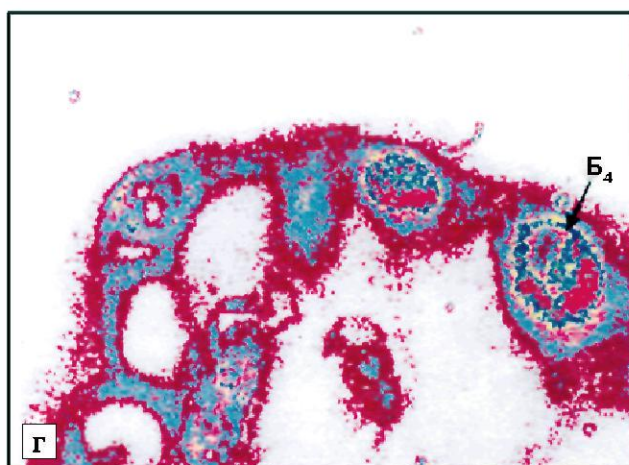
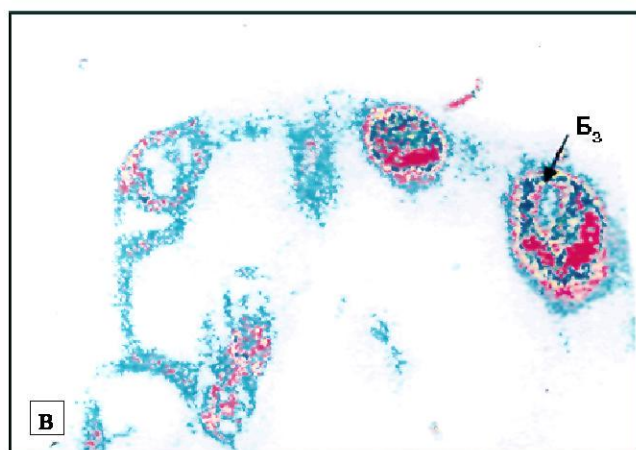
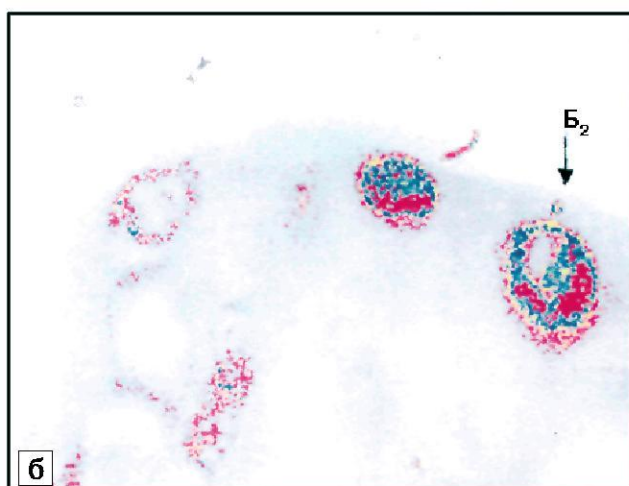
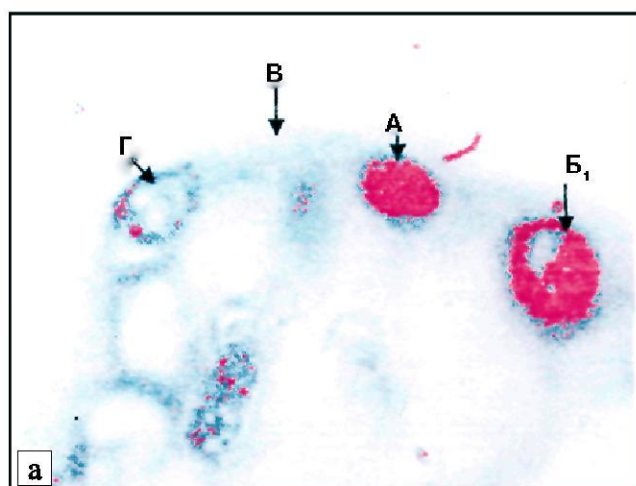


Рис. 2. Ядра синцитиотрофобласта терминальной ворсины плаценты родильницы, перенесшей герпесвирусную инфекцию.

а — ядра синцитиотрофобласта; Б₁ — в фазе I (60 пикселей); Б₂ — в фазе II (120 пикселей); Б₃ — в фазе III (180 пикселей); Б₄ — в фазе IV (240 пикселей); Исследование проведено с использованием компьютерной программы Bio vision. Об. 90, ок. 10.

Отмывали 0,15 М PBS и буфером А (50 мМ трис-гидрохлорид, 5 мМ хлорид магния, 10 мМ β -меркаптоэтанол и 0,005% раствор бычьего сывороточного альбумина, БСА, pH 7,5).

Последовательно инкубировали (18°C, 2 ч) в смеси из 4 нуклеотидов: 0,01 мМ dATP, dCTP, dGTP (Promega, США), 0,001 мМ biotin-II-dUTP (Sigma, США) и ДНК-полимеразе-1 E. coli (20 ед/мл; Promega, США), приготовленной на буфере А. Затем отмывали буфером Л, а вслед за ним — 0,5 М PBS (0,5 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5).

Окончательно срезы инкубировали с конъюгатом пероксидазы (Vectastam Elite ABC Kit-Vector, Burlingame, США), разведенным 1:25 0,5 М PBS, в который введены 1% БСА и 0,5% твин-20, и в течение 10 мин окрашивали 0,04% раствором 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорида на 0,05 М трис-буфере, pH 7,5 и перекиси водорода в конечной концентрации 0,015%. Промывали дистиллированной водой и заключали.

Изготовленные срезы анализировали под микроскопом Opton (Германия). Участки препарата, содержащие ядра с признаками апоптоза, фотографировали при общем увеличении микроскопа 400 на пленке Kodak-200 Color-Plus (США).

На пленку одновременно снимали после проведенной реакции препараты плаценты, полученной от женщин, перенесших герпесвирусную инфекцию, и практически здоровых (контрольная группа). После проявления пленки ее анализировали с помощью сканера (Epson perfection 2580 Photo, Япония) и вносили в компьютер AMD отклон IBM-PS (США). Компьютер сопряжен с камерой Pixera — model PVC 100C (США), позволяющей работать по программе Bio Vision. В программе Bio Vision (version 2, West Medica GmbH, Австрия), выбранные кадры (плацента в контрольной группе и рожениц, перенесших герпесвирусную инфекцию) калибровали по размерам (10 см×300 пикселей/дюйм) и вводили в программу сканирования (Bio Vision). После этого производили калибровку по ранжированию объекта.

В настоящем исследовании были взяты в расчет следующие фазы плотности: 60→120→180→240 в пикселях, позволяющие определить участки самой высокой плотности. Помимо того можно, используя программу Excel, произвести расчет относительного содержания вещества различной плотности в ядрах, подвергающихся апоптозу. Наконец, исследуемый материал можно представить в виде рисунка, на котором находящееся в

состоянии апоптоза ядро в цветном изображении состоит из участков хроматина с различной плотностью конденсации. В плаценте у каждой роженицы (как перенесших герпесную инфекцию, так и в контрольной группе) изучали по 100 ворсин, отбирая 2000 ядер.

Исследования показали, что при герпесвирусной инфекции в III триместре при титре антител 1:12 800 до 2–4% ядер синцитиотрофобласта ворсинок проявляют отчетливые признаки апоптоза (в контроле — 1–1,5%) [1 — 3]. Однако процесс вовлечения ядерного материала в апоптоз происходит не одномоментно, а с различной скоростью и интенсивностью конденсации хроматина. В некоторых ядрах этот процесс при обычной световой микроскопии практически не улавливается.

Используя современные методы биоинформации, с помощью компьютерной программы Bio Vision можно проследить этапы разворачивания процесса конденсации хроматина в ядрах, вступающих в апоптоз.

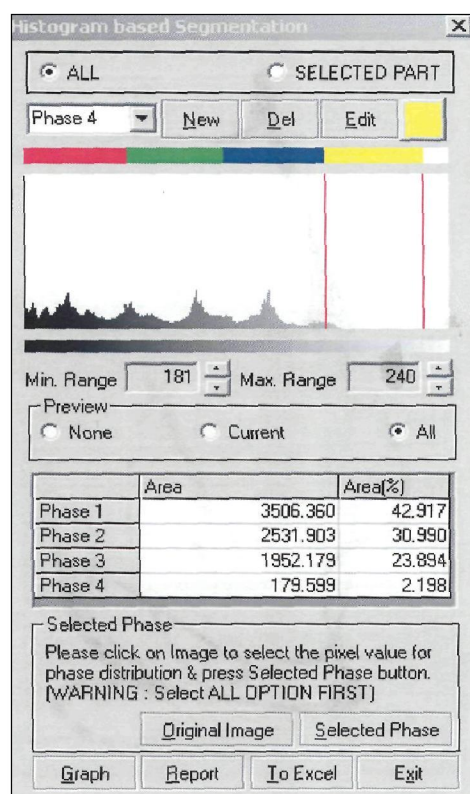


Рис. 3. Автоматизированный компьютерный расчет в программе Bio vision ядра Б (рис. 1) синцитиотрофобласта после реакции ISEL. Фазы яркости взяты в интервале 60 пикселей. Одновременно в программе ISEL произведен подсчет площади (мкм²), которую занимает каждая фаза и ее удельный вес (%).

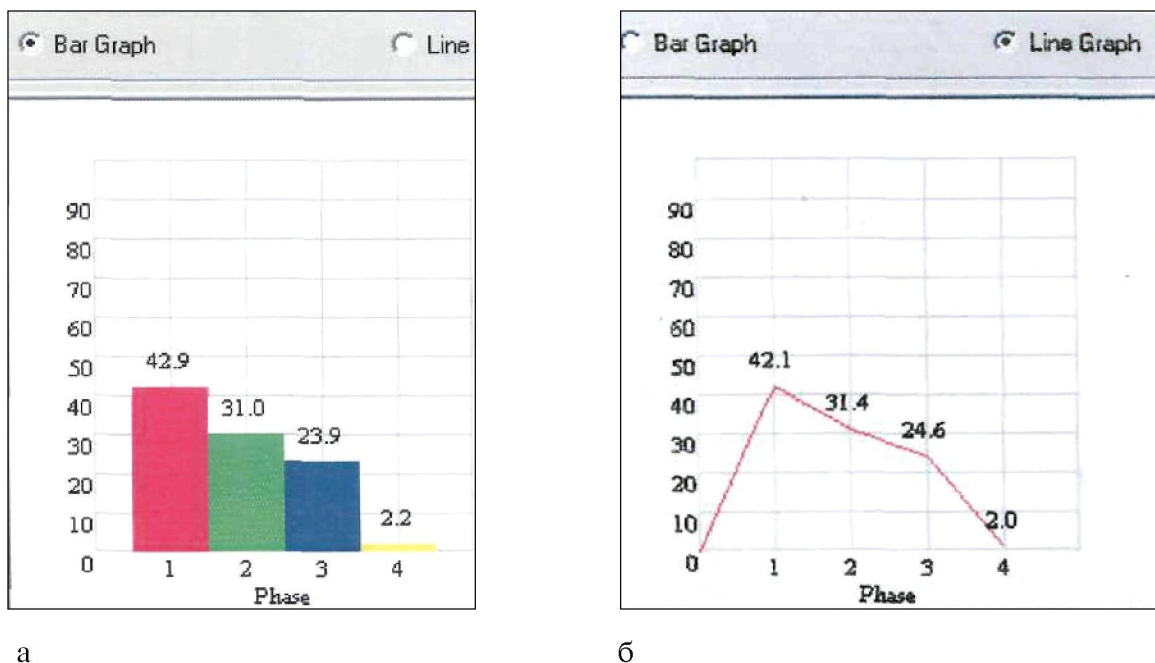


Рис. 4. Графическое (а) и линейное (б) отражение содержания фаз в ядре Б синцитиотрофобласта.

По оси абсцисс — оттенки яркости (фазы); по оси ординат — плотность (в пикселях от 0 до 90).

В участке ворсины при использовании ISEL-метода в синцитиотрофобласте было обнаружено только 2 ядра, дающих отчетливую реакцию на апоптоз (рис. 1). При использовании компьютерной программы Bio Vision в этом участке были найдены еще 2 ядра (рис. 2, а, В, Г), в которых происходят процессы конденсации хроматина, не улавливаемые при исследованиях методом световой микроскопии при об. 100, ок. 15. В данном случае была использована фаза в 30 пикселей.

При построении гистограммы за единицу монохромного изображения взята фаза в 60 пикселей — это та фаза, которая отражает наиболее конденсированные участки хроматина. Если ядро А (см. рис. 2, а) полностью представлено фазой 60 пикселей, то на ядре Б₁ (см. рис. 2, а) можно проследить последовательно этапы вхождения ядра в апоптоз. Здесь четко представлен удельный вес (в %) и плотность фаз конденсации ядерного материала (Б₁), после проведения иммуногистохимической реакции на апоптоз.

Почти половина материала (42,9%) этого ядра резко конденсирована. Это вполне соответствует данным литературы, указывающим, что начальные этапы апоптоза включают в себя конденсацию ДНК с молекулярной массой, кратной молекулярной массе ДНК в нуклеосомных частицах — 180–200 пар нуклеотидов [5, 6]. Остальные участки, по данным настоящего исследования, некоторое

время находятся в состоянии менее выраженной конденсации: 2-я фаза — 31%; 3-я фаза — 23,9% и, наконец, 4-я фаза — 22% (см. рис. 2).

Этот процесс можно видеть на полихромном изображении этого ядра после компьютерной обработки в диапазоне от 60 до 240 пикселей (см. рис. 2, Б₁, Б₂, Б₃, Б₄). Площадь, занимаемая каждой фазой, автоматически обрабатывается в программе Excel (рис. 3), и можно продемонстрировать её в графическом исполнении (рис. 4, а, б).

Таким образом, с помощью современных методов биоинформатики можно проследить за морфологическими изменениями, протекающими в ядрах, вовлеченных в процесс апоптоза. Компьютерная программа Bio Vision позволяет после выполнения специфической для процесса апоптоза реакции ISEL подвергнуть выделению в ядре, находящемся на той или иной стадии апоптоза, фазы яркости, соответствующие плотности хроматина от 0 до 255 пикселей. В последующем эти показатели легко обрабатываются в программе Excel с выделением площади, занимаемой фазой, и расчетом удельного веса (в %) по отношению к другим фазам. Предложенный способ позволяет обнаружить начальные этапы уплотнения хроматина в ядрах при развитии апоптоза, что недоступно при исследовании объекта с помощью стандартной световой микроскопии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриевская И.А. Гормональные и микробицидные изменения у беременных с герпесвирусной инфекцией. Бюл. физиол. патол. дыхания, 2003, вып. 15, с. 41–44.
2. Андриевская И.А. Особенности белкового обмена у беременных с герпесной инфекцией. Бюл. физиол. патол. дыхания, 2006, вып. 23, с. 13–16.
3. Луценко М.Т. Процессы синтеза белка в симпласте хориона при герпес-вирусной инфекции. Бюл. физиол. и патол. дыхания, 2003, вып. 15, с. 7–14.
4. Погорелов В.М. и Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе. Гематол. и трансфузиол., 1995, т. 43, № 5, с. 21–24.
5. Самуилов В.Д., Олескин А.В. и Лагунова Е.М. Программируемая клеточная смерть. Биохимия, 2000, т. 65, вып. 8, с. 1029–1046.
6. Wijsman J.H., Jonker R.R., Keijzer R. et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA. J. Histochem. Cytochem., 1993, v. 41, p. 7–12.

Поступила в редакцию 12.02.08
Получена после доработки 26.10.08

COMPUTER ASSESSMENT OF AN APOPTOTIC PROCESS DYNAMICS IN THE NUCLEI OF PLACENTAL VILLI SYNCYTIOTROPHOBLAST IN PUERPERAS AFTER THE OUTBURST OF HERPES VIRUS INFECTION

M.T. Lutsenko

The development of an apoptotic process in the nuclei of syncytiotrophoblast was studied in the placenta of 50 puerperas, who had the outburst of herpes virus infection in the second part of their pregnancy (antibody titre — 1:12800). Control group was represented by the placental material obtained from 20 women with no disease. Apoptosis was demonstrated in paraffin sections of the material fixed in 10% buffered formalin by in situ labeling of DNA fragments (ISEL-method). The assessment was performed by studying 2000 nuclei from 100 terminal villi in the different areas of the histological section within each placenta. The nuclei in sections were analyzed using a Bio Vision computer program, allowing to detect the areas with the different degree of chromatin condensation during the apoptosis development.

Key words: *placenta, syncytiotrophoblast, nucleus, apoptosis, herpes virus infection.*

Laboratory of the Mechanisms of Etiopathogenesis and Regenerative Processes of Respiratory Organs in Non-specific Pulmonary Diseases, Far Eastern Center of Respiratory Physiology and Pathology, RAMS SB, Blagoveshchensk.