

УДК 61:34:612.014.3:615.9-009

© О. В. Беловицкий, 2009.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ АПОПТОЗА ПРИ АЛКОГОЛЬНО-НАРКОТИЧЕСКИХ ИНТОКСИКАЦИЯХ

О. В. Беловицкий*Кафедра судебной медицины с курсом права (зав. – проф. А. А. Бабанин) Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского, г. Симферополь.*

IMMUNOGISTOCHEMICAL MARKERS OF APOPTOSIS IN ALCOHOLIC-NARCOTIC INTOXICATIONS

O. V. Belovitsky

SUMMARY

In work is described immunogistochemical manifestations of the apoptosis markers – p53, bcl-x, Bax., bcl-2 on microscopic level in cellular population of cerebrum tissues, lungs, heart of corpses, which dead due to combined acute alcoholic poisoning with narcotic preparations (opioids). The direct toxic action revealed in Purkinie's cells and some departments of the brain stem. Expression of apoptotic proteins in the other cells of the cerebellum cortex and large brain, cardiomyocytes and alveolar epithelium cells was defined.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ МАРКЕРИ АПОПТОЗУ ПРИ АЛКОГОЛЬНО-НАРКОТИЧНИХ ІНТОКСИКАЦІЯХ

О. В. Біловицький

РЕЗЮМЕ

У роботі на світлооптичному рівні описані імуногістохімічні прояви маркерів апоптозу - p53, bcl-x, Bax., bcl-2. у клітинних популяціях тканинах головного мозку, легенів, серця трупів осіб, що загинули від комбінованого гострого отруєння алкоголем і наркотичними препаратами (опіоїдами). Виявлено пряме токсичне дії відносно кліток Пуркіне й деяких відділів стовбура мозку, у той час як в інших клітках кори мозочка й великого мозку, а також кардіоміоцитах і клітках альвеолярного епітелію визначалася експресія апоптичних білків.

Ключевые слова: апоптоз; иммуногистохимия, алкоголь, наркомания, интоксикация, морфология, аутопсия.

В настоящее время принято считать, что существуют две основные формы гибели клеток: некроз и апоптоз. Выделяют и другие формы гибели (например, темноклеточная гибель, тип В темных клеток, аутофагическая дегенерация), но их описания в научной литературе встречаются редко. Идентификация формы гибели клетки в ряде случаев представляет существенные трудности. Это связано с тем, что гибель некоторых типов клеток не укладывается в существующее определение апоптоза и некроза, а также с тем, что определение формы гибели клеток проводят не только по морфологическим критериям [2].

Апоптоз – это такой тип гибели клеток, при котором сама клетка активно участвует в процессе своей гибели, т.е. происходит самоуничтожение клетки. Апоптоз, в отличие от некроза, является процессом активным – после воздействия этиологических факторов запускается генетически запрограммированный каскад реакций, сопровождающийся активацией определенных генов, синтезом белков, ферментов, приводящих к эффективному и быстрому удалению клетки из ткани [7,9].

Регуляция апоптоза осуществляется преимущественно белками семейства bcl-2, которые разделяют на 2 класса – тормозящие апоптоз (bcl-2, bcl-x, bcl-w, Mcl-1 и др.) и индуцирующие этот процесс (Bax, Bak, Bok). Антиапоптические белки bcl-2, bcl-x, Mcl-1 содержат все 4 (BH1-4) функциональных домена, они имеют общий принцип локализации в мембранах

митохондрий, эндоплазматической сети и кариолеммы ядра. Проапоптотические белки Bax, Bak, Bok (а также Mtd) содержат 3 функциональных домена (BH1, BH2, BH3); белки Bad, Bik, Blk, Hrk, Bcl-Xs, Bim, Bid, Puma и Noxa содержат только BH3 функциональный домен, они являются антагонистами протеинов выживания клеток. Соотношение белков bcl-2 агонистов и антагонистов апоптоза определяет способность клетки положительно отвечать на внешние и внутренние апоптотические сигналы [7].

Сохраняющаяся во всем мире в течение последних десятилетий тенденция к увеличению употребления наркотических веществ, алкоголя и других психотропных средств привела к значительному увеличению числа больных наркоманией и алкоголизмом и росту числа связанных с ними соматических заболеваний [4].

Ситуация в Украине также характеризуется высоким уровнем потребления психоактивных веществ на душу населения и широкой распространенностью разнообразной патологии, причинно связанной с ними. При этом наиболее часто потребляемыми остаются наркотические вещества, прежде всего опиоды, а также алкоголь и комбинированные случаи употребления [5].

В последнее время появились сведения относительно того, что злоупотребление наркотическими веществами является основной причиной активации апоптотических процессов у наркоманов. В частно-

сти, показано активирующее влияние морфина на процессы апоптоза макрофагов в экспериментальных условиях [6]. В эксперименте также показано, что наркотические вещества весьма серьезно влияют на цитокиновый статус, играющий важную роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы. В частности, продемонстрировано, что длительное введение мышам морфина способствовало увеличению у них продукции провоспалительных цитокинов (интерлейкина (ИЛ)-1-бета, интерферона-гамма) и оксида азота, но оказывало супрессивное влияние на продукцию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12) [1]. Хроническое введение алкоголя мышам способствовало достоверному повышению количества апоптотических телец в гепатоцитах, в основном, вокруг терминальных печеночных венул. Показано повышение числа апоптотических гепатоцитов у алкогользависимых мышей с сопутствующей патологией печени (жировое перерождение печени, хронический гепатит) [6]. Проведено исследование влияния морфина на активность основного фермента запрограммированной гибели клетки (апоптоза) каспазы-3 в различных отделах мозга крыс. Через 1, 2 и 4 часа после острого внутрибрюшинного введения морфина в дозе 30 мг/кг обнаружена активация каспазы-3, наиболее выраженная в стволе мозга. Изменений активности каспазы-3 в коре больших полушарий не обнаружено [8].

Однако литературных данных по этому вопросу мало, в основном они носят отрывочный характер. Работ, оценивающих процессы апоптоза при комбинированных интоксикациях, нами встречено не было, хотя можно предположить, что усиление воздействия на организм совместно опиоидов и алкоголя в каком-либо ракурсе отразится на запрограммированной клеточной гибели.

В связи с этим целью нашего исследования явилось выявление и изучение маркеров апоптоза – p53, bcl-x, Вах., Fas, bcl-2. в клеточных популяциях тканях головного мозга, лёгких, сердца при алкогольно-наркотической интоксикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами проведено судебно-медицинское исследование 22 трупов лиц, погибших от комбинированной алкогольно-наркотической интоксикации. Набор материала производился на базе отдела экспертизы трупов Крымского республиканского учреждения «Бюро судебно-медицинской экспертизы». Погибшими являлись 17 мужчин в возрасте 17-30 лет и 5 женщин от 20 до 29 лет.

Во всех наблюдениях при судебно-токсикологическом исследовании выявлено наличие в тканях и биологических жидкостях трупов этанола, концентрация которого в крови и моче соответствовала средней и тяжелой степени алкогольного опьянения применительно к живым лицам, и наркотических веществ

из группы опиоидов (морфина, героина, кодеина). Кроме того, диагноз – хроническая наркотическая интоксикация, был подтвержден данными катаннеза и наличием следов множественных инъекций различной давности.

Контрольную группу составили 7 трупов лиц обоего пола в возрасте 18-25 лет, у которых алкоголь и другие психоактивные вещества не определялись общепринятыми методиками, отсутствовали вероятный алкогольно-наркотический катаннез, наличие заболеваний ЦНС, сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а причиной смерти явились механические повреждения, исключая черепно-мозговые травмы.

В работе использовался комплекс исследований: макроскопический; гистологический, иммуногистохимический, газовая хроматография. Изучены и обобщены данные, касающиеся морфологии алкогольно-наркотических интоксикаций и гибели клетки. Всего 11 отечественных и 19 зарубежных источников.

Вскрытия трупов производили в первые 24 часа после наступления смерти. Макроскопическое исследование проводили на основании общепринятых секционных методик. Для микроскопии изымались кусочки ткани не менее 5-ти из исследуемых органов в каждом случае. Кусочки органов размерами не более 1x1x1 см фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и далее подвергали стандартной парафиновой проводке. Приготовленные парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, по методу Ниссля. [3]. Иммунопереоксидазным методом с использованием системы визуализации DAKO изучена экспрессия апоптотических белков p53, bcl-x, Вах., Fas, bcl-2. Срезы помещали на обычные предметные стёкла для стандартных окрасок и на адгезивные - для иммуногистохимического исследования. Препараты изучали с помощью светового микроскопа «Olympus CX-31», и цифровой фотокамеры «Olympus C5050 ZOOM»

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что в изучаемых органах развивались морфологические изменения в результате комбинированного воздействия алкоголя и наркотических веществ, которые не имели выраженного специфического характера.

Макроскопически при внутреннем исследовании выявлялись признаки быстронаступившей смерти. Наблюдался резкий отек и набухание вещества головного мозга, отек мозговых оболочек. В ряде случаев отечная жидкость вызывала значительное расширение мозговых желудочков, сдавление ствола мозга. Гистологически выявлены разнообразные нарушения микроциркуляции. В коре преобладали набухание и ишемические изменения нейронов, а в подкорковых ядрах и стволе – ишемические и тяже-

лые изменения нервных клеток с явлениями сателлитоза и нейронофагии.

В легких при макроскопическом исследовании наблюдались признаки массивного отека. Нередко отмечались кровоизлияния в ткань легких. Микроскопически помимо стромального и интерстициального отека, выявлялись полнокровие, интраальвеолярные острые кровоизлияния и явления стаза и сладжа эритроцитов в сосудах микроциркуляции. Помимо этого в большинстве наблюдений встречались признаки очагового гемосидероза. Кроме того, выявлялись участки дистелектазов и эмфиземы, фибриновые тромбы в артериолах, капиллярах, повреждения альвеолоцитов, а также гиалиновые мембраны. Нередко наблюдался очаговый пневмосклероз.

При исследовании сердца и сосудов наблюдались дилатация камер сердца, отложения жировой ткани под эпикардом и диффузный кардиосклероз. Микроскопически были характерны острые расстройства микроциркуляции и явления кардиосклероза при нерезко выраженном атеросклерозе артерий. Встречались признаки фибрилляции сердца и дистрофических повреждений кардиомиоцитов.

На светооптическом уровне при помощи системы визуализации ДАКО в препаратах сердца трупов лиц, умерших от комбинированного отравления алкоголем и наркотиками наблюдалась экспрессия bcl-2 в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 1). В клетках, в которых наблюдались пикноз ядер, отсутствие поперечной исчерченности, экспрессия bcl-2 не отмечалась.

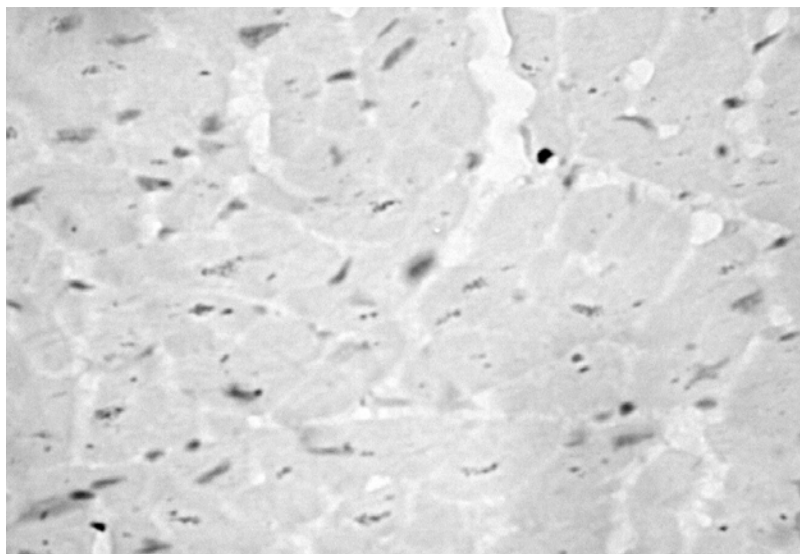


Рис. 1. Алкогольно-наркотическая интоксикация. Экспрессия bcl-2 в цитоплазме кардиомиоцитов. Система визуализации ДАКО. Ув. ок. 10, об. 40.

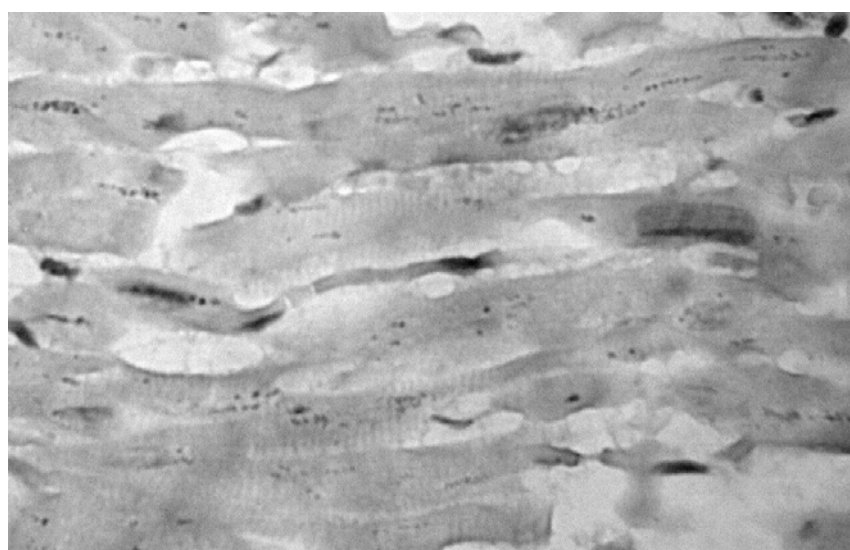


Рис. 2. Алкогольно-наркотическая интоксикация. Экспрессия p53 в цитоплазме кардиомиоцитов. Система визуализации ДАКО. Ув. ок. 10, об. 90.

Экспрессия p53 в наших наблюдениях визуализировалась несколько меньше (рис. 2).

При исследовании легких наблюдались признаки «перерастяжения» альвеол, массовые включения корпускул (пыли) в составе альвеолярных макрофагов и стромальной ткани. Реакция p 53 и bcl-2 слабоположительная в стенках клеток альвеол, маскируется пылью. Оценивая экспрессию bcl-x, Fas можно отметить положительно маркирующиеся клетки эндотелия и субэпителиального слоя крупных сосудов (вероятнее всего, судя по выраженности их расширения – вен) и диффузно слабо маркирующиеся клетки интерстициальной ткани лёгкого.

В препаратах головного мозга (подкорковых и

стволовых образованиях) реакция на Bcl-x слабоположительная. Слоистость коры мозжечка сохранена, однако наблюдалось существенное уменьшение числа ганглиозных клеток (экранный центр мозжечка). Большая часть имеющихся ганглиозных клеток была деформирована, имела вакуолизированную цитоплазму и неправильную форму ядер. Многие клетки молекулярного и зернистого слоёв демонстрировали признаки вакуолизации цитоплазмы.

При очевидном поражении ганглиозного слоя мозжечка отдельные нейроны сохраняли жизнеспособность и экспрессии bcl-2 не наблюдалось. В отдельных клетках молекулярного слоя мозжечка активно экспрессировали bcl-2 (рис. 3).

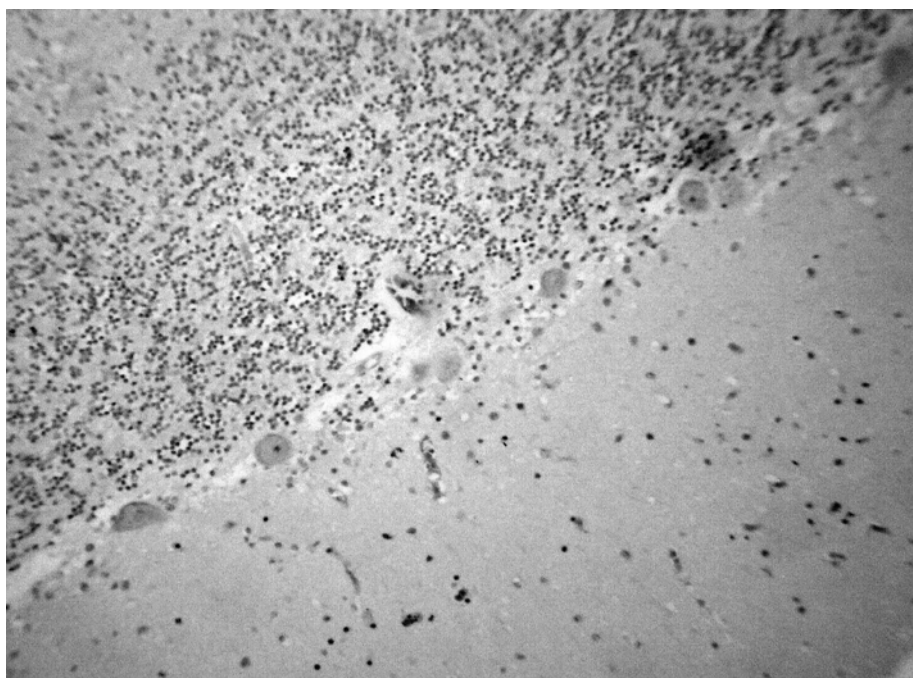


Рис. 3. Алкогольно-наркотическая интоксикация. Отсутствие экспрессии bcl-2 в ганглионарном и зернистом слоях мозжечка и единичные проявления экспрессии bcl-2 в молекулярном слое. Система визуализации DAKO. Ув. ок. 10, об. 40.

ВЫВОДЫ

1. Таким образом, говорить о прямом токсическом действии комбинированной алкогольно-наркотической интоксикации можно в отношении грушевидных нейронов (клеток Пуркинье) и нейронов некоторых отделов ствола мозга, т.к. в данных препаратах выявлялись некротические изменения, и отсутствовала экспрессия апоптических белков. В то время как в других клетках коры мозжечка и большого мозга, а также в кардиомиоцитах и клетках альвеолярного эпителия определялась экспрессия апоптических белков p53, bcl-x, Bax., bcl-2.

Несмотря на возможность обнаружения клеток с морфологическими признаками апоптоза на светоптическом уровне, проведение электронной мик-

роскопии необходимо и является перспективным направлением дальнейших наших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А.Ю., Шишков Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. – М.: Эдиторная УРСС, 2001. – 320 с.
2. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клеток (апоптоз). – М.: Медицина, 2001. – 192 с.: ил.
3. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М., 1996. – С. 7-50.
4. Морфологическая диагностика наркотических интоксикаций в судебной медицине / Под ред. Чл.-кор. Ю.И. Пиголкона. – М.: Медицина, 2004. – 304 с.
5. Сиволап Ю.П., Савченков В.А.. Злоупотреб-

ление опиоидами и опиоидная зависимость. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 304 с.

6. Суканова Г.А., Абашева О.Е.. Апоптоз. – Томск: «Издательство ТПУ. – 2006. – 172 с.

7. Туманский В.А., Евсеев А.В., Полковников Ю.Ф. Апоптоз и селективный некроз нейронов ЦНС после клинической смерти и церебральной ишемии: молекулярные механизмы и морфологические особенности. // Патология – Т. 5 – № 2 – 2008 – С. 19-28.

8. Яковлев А.А., Перегуд Д.И., Пирожков С.В., Гуляева Н.В., Панченко Л.Ф.// Активация каспазы-3 в отделах мозга крыс после однократного введения морфина. – Наркология. – 2004 – №9 – С. 65-71.

9. Denecker G., Vercaemmen D., Declercy W., Vandenaabeele P. “Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors// Cell Mol. Life Sci. – 2001 – Vol. 58. № 3, - P. 356-370.