

- chronic obstructive pulmonary disease. ATS statement // *Respir. Crit. Care Med.* — 1995. — Vol. 152. — P.77-120.
50. Barney P. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease and asthma // *Anticholinergic therapy in obstructive airway disease* / Ed. by N.J. Cross, London, 1993. — P.18-32.
 51. Buist A.S. Risk factors for COPD // *Eur Respir Rev.* — 1996. — Vol. 39, № 6. — P.253-258.
 52. Charplin D., Vervloet D. Role of atmospheric pollutants in asthma // *Revue de Pneumologie.* — 1996. — Vol. 52, № 2. — P.70-78.
 53. Cohen B.H., Ball W.C., Brashears S. et al. Risk factors in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) // *Am. J. Epidemiology.* — 1997. — Vol. 105. — P.223-232.
 54. Doll R., Peto R., Wheatley K. et al. Mortality in relation to smoking: 40 years observations on male British doctors // *Br. Med. J.* — 1994. — Vol. 309. — P.901-911.
 55. Global Strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease // *National institutes of health, National Heart, Lung and Blood institute*, 2003. — 100 p.
 56. Halpin D. Chronic obstructive pulmonary disease. — Moscow, 2001. — 136 p.
 57. Hodgkin J.E. Prognosis in Chronic Obstructive Pulmonary disease // *Clin. Chest Med.* — 1990. — Vol. 11, № 3. — P.555-569.
 58. Murray J.F., Nadel J.A. Textbook of respiratory medicine. — Philadelphia, WB Saunders, 1994. — 1430 p.
 59. Silverman E.K., Speizer F.E. Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease // *Med. Clin. North Am.* — 1996. — Vol. 80. — P.501-522.
 60. Yang F., Haile D.S., Coalson J.J. et al. Haptoglobin in lung defence // *Redox Rep.* — 2001. — Vol. 6, № 6. — P.372-374.

© АМЕЛЬЧУГОВА О.С., САЛМИНА А.Б., ЦУКАНОВ В.В., МИХУТКИНА С.В. — 2007

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА TUNEL ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АПОПТОЗА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА

О.С. Амелчугова, А.Б. Салмина, В.В. Цуканов, С.В. Михуткина

(Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера СО РАМН, директор — д.м.н., проф. В.Т. Манчук; Красноярская государственная медицинская академия, ректор — д.м.н., проф. И.П. Артюхов, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, зав. — д.м.н., проф. А.Б. Салмина)

Резюме. Литературный обзор посвящен исследованию апоптоза методом TUNEL в слизистой оболочке желудка при различной патологии.

Ключевые слова: апоптоз, TUNEL, слизистая оболочка желудка.

Апоптоз — широко распространенный общебиологический механизм, ответственный за поддержание постоянства численности и выбраковку дефектных клеток. В слизистой оболочке желудка происходит постоянное активное обновление клеток. Каждую минуту погибают около полумиллиона эпителиоцитов и столько же появляются вновь. Структурная сохранность слизистой оболочки гастроинтестинального тракта, как известно, обеспечивается балансом между числом вновь образованных клеток и числом погибших клеток, т.е. между пролиферацией и апоптозом [1]. Показатели клеточного обновления при гастрите, язвенной болезни и раке желудка, а также влияние *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) и других этиологических факторов на апоптоз и пролиферацию еще недостаточно изучены и представляя большой интерес для исследователей.

В настоящее время для определения различных стадий апоптоза применяется достаточно широкий спектр методик, среди них рутинная световая микроскопия с использованием обычных и селективных методов фиксации и окрашивания, флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флюорохромов, включая проточную цитофотометрию; электронно-микроскопические методы, иммуногистохимическое выявление белков-маркеров, участвующих в запуске апоптоза, и выявление фрагментации ДНК *in situ*.

TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotidyl Transferase — mediated dUTP — biotin Nick — End Labeling), считается одним из самых надежных способов выявления апоптотической гибели клеток, поскольку направлен на верификацию основного феномена — распада ДНК под действием Mg^{2+}/Ca^{2+} -зависимых эндонуклеаз с образованием фрагментов, размеры которых кратны размеру одной нуклеосомы (186 азотистых оснований). Суть метода заключается в специфическом связывании терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы с 3'-концами разорванной нити ДНК, которые могут быть вы-

явлены при световой или флуоресцентной микроскопии. TUNEL имеет ряд преимуществ: возможность применения как на отдельных клетках, так и на парафиновых и замороженных срезах, количественной оценки апоптотических клеток, одновременного анализа большого количества образцов, относительная простота постановки метода, высокая чувствительность, более чем в 500 раз превышающая выявление фрагментации ДНК методом гель-электрофореза [8,11,23]. Некоторые исследователи одновременно применяют несколько методов определения апоптоза, подтверждая TUNEL рутинной световой микроскопией [4,29], лазерной конфокальной сканирующей микроскопией [11], электронной микроскопией [9], докрашивая срезы реактивом Хекста или йодидом пропидия [13] и другими методами.

Особое внимание исследователей в последнее время привлекает инфекция *H.pylori*. Сейчас нет ясной точки зрения о влиянии этой бактерии на процессы пролиферации и апоптоза в слизистой оболочке желудка. По одним данным *H.pylori* у лиц с диспепсией увеличивает индекс пролиферации, уменьшает индекс апоптоза [7]. По другим, как пролиферация, так и апоптоз, повышаются при *H.pylori* (+) гастрите [19,24].

Методика TUNEL широко применяется в исследованиях для детекции запрограммированной клеточной гибели при *H.pylori*-ассоциированных заболеваниях, причем зачастую разные исследователи при одной и той же патологии регистрируют сильно различающиеся значения индекса апоптоза, который определяют как отношение количества TUNEL-позитивных клеток к общему количеству клеток, выраженное в процентах. Так, в Германии при обследовании пациентов с хроническим гастритом и неязвенной диспепсией апоптотический индекс (АИ) составил 8% у *H.pylori*-положительных пациентов и 1,9% — у *H.pylori*-отрицательных ($p=0,002$) [22]. В аналогичной работе бразильских исследователей при применении метода TUNEL индекс

апоптоза был равен 18,7% у *H.pylori*-положительных и 16,4% у *H.pylori*-отрицательных пациентов ($p = 0,068$) [21]. В исследовании О.Ю. Бондаренко и соавт. [2] у лиц с хроническим гастритом, ассоциированным с *H.pylori*, в антральном отделе желудка АИ составил 6,7%, в теле — 7,2%. В другой работе при обследовании пациентов с язвенной болезнью и неязвенной диспепсией АИ=24,8% у *H.pylori*-позитивных, АИ=3,6% у *H.pylori*-негативных ($p<0,01$) [15]. Средний возраст пациентов был одинаковым, методики проводились согласно стандартным инструкциям производителей, возможно причиной таких различий стали этнические особенности исследуемых групп или различия в способе подсчета клеток, так как не во всех статьях авторы указывают, в каких клетках считали апоптоз, только в эпителиоцитах или во всех клетках слизистой оболочки желудка, включая желудочные железы и стромальные клетки.

Интересны исследования апоптоза с применением метода TUNEL, моделирующие хеликобактерную инфекцию на животных. При заражении *H.pylori* лабораторных животных апоптоз повышается в сравнении с *H.pylori*-негативным контролем [6,12,14]. Однако вопрос о применимости подобных данных к человеческому организму является спорным.

Влияние различных штаммов *H.pylori* на запрограммированную клеточную гибель также привлекает внимание многих исследователей [18,20,21,28]. Так в 1997 г. Р.М. Peek и соавт. [20] сообщили, что CagA штаммы стимулируют пролиферацию и угнетают апоптоз эпителиоцитов в слизистой оболочке желудка. В 2001 S.F. Moss и соавт. [18] опубликовали прямо противоположные результаты, в которых показали, что CagA штаммы *H.pylori* стимулируют апоптоз эпителиоцитов в слизистой оболочке желудка. Исследования были проведены

в одной лаборатории при помощи методики TUNEL, однако группы пациентов были разными, в первом случае — европеоиды, у половины из которых была язвенная болезнь, во втором — афроамериканцы без язвы. С нашей точки зрения, среди причин, определяющих превалирование апоптоза или пролиферации под действием *H.pylori*, имеют важное значение исходное состояние слизистой оболочки желудка, а также этнические особенности хозяина и генетические особенности макро- и микроорганизма.

Не меньший интерес представляют исследования апоптоза методом TUNEL при раке желудка [10,16,17,26]. Большинство исследователей выявляют снижение апоптоза при предраке и раке желудка в сравнении с контрольной группой пациентов без рака. Так, в работе, проведенной в Китае, у *H.pylori*-положительных лиц АИ составил 4,36% при метаплазии, 2,31% — при дисплазии, 1,34% — при раке желудка ($p<0,01$) [30]. Эти данные логично вписываются в современную концепцию патогенеза некардиального рака желудка Correa [5], согласно которой *H.pylori*, воздействуя на СОЖ, вызывает хронический гастрит, который последовательно переходит в атрофический гастрит, метаплазию, дисплазию и приводит к аденокарциноме желудка. Однако есть работы, противоречащие современным представлениям об участии апоптоза в канцерогенезе [3], в которых приводятся значения АИ при раке желудка более высокие, чем в контрольной группе пациентов с неязвенной диспепсией [25,27].

Таким образом, TUNEL — высокочувствительный метод детекции апоптоза, широко используемый в ведущих научных лабораториях мира при исследовании клеточного обновления в слизистой оболочке желудка.

TUNEL METHOD APPLICATION IN GASTRIC MUCOSA APOPTOSIS DETECTION

O.S. Amelchugova, A.B. Salmina, V.V. Tsukanov, S.V. Mihutkina

(State Scientific Medical Research Institute for Northern Problems of Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk State Medical Academy)

The literature review is devoted to apoptosis research in gastric mucosa in various pathologies.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И. Клеточное обновление слизистой оболочки желудка в условиях инфекции *Helicobacter Pylori* // Педиатрия. — 2002. — № 2. — С.27-33.
2. Бондаренко О.Ю., Коган Е.А., Склянская О.А. и др. Апоптоз и пролиферация эпителиоцитов при *Helicobacter pylori*-ассоциированном гастрите // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопрокт. — 2003. — № 6. — С.27-32.
3. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиол. Экспер. терапия. — 1998. — № 2. — С.38-48.
4. Charriaut-Marlangue C., Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis // NeuroReport. — 1995. — Vol. 7. — P.61-64.
5. Correa P. // Cancer Res. — 1988. — Vol. 48. — P.3554-3560.
6. Esteves M.I., Schrenzel M.D., Marini R.P. *Helicobacter pylori* Gastritis in Cats with Long-Term Natural Infection as a Model of Human Disease // Amer. J. Pathol. — 2000. — Vol. 156. — P.709-721.
7. Freitas D., Urbano M., Goulao M.H. et al. The effect of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium // Hepatogastroenterology. — 2004. — Vol. 51, № 57. — P.876-82.
8. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in-situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // J. Cell Biol. — 1992. — Vol. 119. — P.493-501.
9. Goping G., Wood K.A., Sei Y. et al. Detection of Fragmented DNA in Apoptotic Cells Embedded in LR White: A Combined Histochemical (LM) and Ultrastructural (EM) Study // J. Histochem. Cytochem. — 1999. — Vol. 47. — P.561-568.
10. Ikeguchi M., Cai J., Nariyuki P. Clinical significance of spontaneous apoptosis in advanced gastric adenocarcinoma // Cancer. — 2000. — Vol. 85, № 11. — P.2329-2335.
11. Jerome K.R., Vallan C., Jaggi R. The TUNEL assay in the diagnosis of graft-versus-host disease: caveats for interpretation. Pathology. — 2000. — Vol. 2. — P.213-216.
12. Jones N.L., Day A. S., Jennings H. Enhanced Disease Severity in *Helicobacter pylori*-Infected Mice Deficient in Fas Signaling // Infect. Immun. — 2002. — Vol. 70, № 5. — P.2591-2597.
13. Kelly K.J., Sandoval R.M., Dunn K.W. et al. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2003. — Vol. 284. — P.1309-1318.
14. Kim T.I., Chan Lee Y. Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Mucosae of Mice: Apoptosis, Cell Proliferation, and Inflammatory Activity // Infect Immun. — 2001. — Vol. 69, № 8. — P.5056-5063.
15. Lehmann F.S., Terracciano L., Carena I. et al. In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastritis // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. — 2002. — Vol. 283. — P.481-488.
16. Li L.G., Xu H.M. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in gastric adenocarcinomas and their correlation with a poor survival // World J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 11, № 17. — P.2539-2544.
17. Li Y.H., Wang C., Meng K. et al. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma.

- noma // World J. Gastroenterol. — 2004. — Vol. 10, № 13. — P.1984-1988.
18. Moss S.F., Sordillo E.M., Abdalla A.M. et al. Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with cagA Helicobacter pylori strains // Cancer Res. — 2001. — Vol. 61. — P.1406-1411.
 19. Murakami K., Fujioka T., Kodama R. et al. Helicobacter pylori infection accelerates human gastric mucosal cell proliferation // J. Gastroenterol. — 1997. — Vol. 32. — P.184-8.
 20. Peek R.M.J., Moss S.F., Tham K.T. et al. Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cells proliferation from apoptosis // J. Nat. Cancer Inst. — 1997. — Vol. 89. — P.863-868.
 21. Ramos K., Leite M., Darini E. et al. Helicobacter pylori and cagA gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis // Sao Paulo Med. J. — 2005. — Vol. 123, № 3. — P.195-198.
 22. Rudi J., Kuck D., Strand S. et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand System in Helicobacter pylori-induced Gastric Epithelial Apoptosis // J. Clin. Invest. — 1998. — Vol. 102, № 8. — P.1506-1514.
 23. Salgame P., Varadhachary A.S., Primiano L.L. et al. An ELISA for detection of apoptosis // Nucl. Acids Res. — 1997. — Vol. 25, № 8. — P.680-691.
 24. Scotiniotis I.A., Rokkas T., Furth E.E. et al. Altered gastric epithelial cell kinetics in Helicobacter pylori-associated intestinal metaplasia: implications for gastric carcinogenesis // Int. J. Cancer. — 2000. — Vol. 85, № 2. — P.192-200.
 25. Shridhar T., Ujjala G., Uday G. et al. Helicobacter pylori-induced apoptosis in pathogenesis of gastric carcinoma // Indian J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 24, № 5. — P.193-196.
 26. Tenderenda M., Rutkowski P. Expression of CD34 in Gastric Cancer and its Correlation with Histology, Stage, Proliferation Activity, p53 Expression and Apoptotic Index // Pathol. Oncol. Research. — 2001. — Vol. 7, № 2. — P.112-117.
 27. Yoshimura T., Shimoyama T., Tanaka M. et al. Gastric mucosal inflammation and epithelial cell turnover are associated with gastric cancer in patients with Helicobacter pylori infection // J. Clin. Pathol. — 2000. — Vol. 53. — P.532-536.
 28. Yu J., Leung W.K., Go M.Y.Y. et al. Relationship between Helicobacter pylori babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions // Gut. — 2002. — Vol. 51. — P.480-484.
 29. Zheng J.Y., Wang W.Z. Effect of p27KIP1 on cell cycle and apoptosis in gastric cancer cells // World J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 11, № 45. — P.7072-7077.
 30. Zhang Z., Yuan Y., Gao H. et al. Apoptosis, proliferation and P53 gene expression of H. pylori associated gastric epithelial lesions // World J. Gastroenterol. — 2001. — Vol. 7, № 6. — P.779-782.
 31. Zhao W.H., Wang S.F., Ding W. et al. Apoptosis induced by preoperative oral 5'-DFUR administration in gastric adenocarcinoma and its mechanism of action // World J. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 12, № 9. — P.1356-61.

© ПИНСКИЙ С.Б., ДВОРНИЧЕНКО В.В., РЕПЕТА О.Р., ПОНОМАРЕНКО Д.М. — 2007

ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗ (ЛИМФОМА ХОДЖКИНА) ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.Б. Пинский, В.В. Дворниченко, О.Р. Репета, Д.М. Пономаренко

(Иркутский государственный медицинский университет, ректор — д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра общей хирургии, зав. — д.м.н., проф. С.Б. Пинский; Иркутский государственный институт усовершенствования врачей, ректор — д.м.н., проф. В.В. Шпрах, кафедра онкологии, зав. — д.м.н., проф. В.В. Дворниченко)

Резюме. В статье приводятся два наблюдения лимфомы Ходжкина щитовидной железы. Больные были в возрасте 21 и 26 лет. Приводятся клинические проявления и особенности диагностики. В одном случае выполнена операция, в другом проведена современная комбинированная полихимиотерапия в сочетании с лучевой терапией.

Ключевые слова: лимфогранулематоз, лимфома Ходжкина, полихимиотерапия, лучевая терапия.

Это заболевание впервые описал Томас Ходжкин (1832) и с 1865 г в медицинской литературе известно под названием болезнь Ходжкина. В 1904 г. был введен термин «лимфогранулематоз», а с 2001 г., в соответствии с классификацией ВОЗ — лимфома Ходжкина.

Лимфома Ходжкина относится к числу онкологических заболеваний, которое еще в конце 70-х годов XX века было признано абсолютно фатальным, а в настоящее время, благодаря достижениям в области медицины и, прежде всего, противоопухолевой химиотерапии, признано потенциально излечимым или позволяет добиться стойкой ремиссии. По данным большинства авторов, частота полных ремиссий и 10-летняя безрецидивная выживаемость больных лимфомой Ходжкина при использовании лечебных программ последнего поколения, превышает 80-90% [5,7].

Заболеемость лимфомой Ходжкина в России составляет 2,3, в США — 2,8, в центральной Европе — 4 на 100 тысяч населения [4,22]. Заболевание встречается в любом возрасте, но чаще в молодом (медиана 28 лет). До последнего времени различали два пика кривой заболеваемости: первый в возрасте 15-40 лет (с преобладанием мужчин), второй — нарастает после 50 лет.

Лимфома Ходжкина — это злокачественное заболевание лимфатической системы с увеличением лимфатических узлов с последующим возможным вовлечением других органов. Основным патоморфологическим субстратом опухоли являются крупные многоядерные клетки Березовского-Рид-Штернберга. Причины их

возникновения и до настоящего времени окончательно не установлены. Согласно основной гипотезы патогенеза клетки Ходжкина (крупные одноядерные) и клетки Березовского-Рид-Штернберга являются результатом моноклональной пролиферации зрелых В-клеток, происходящие из зародышевого центра фолликула лимфатического узла. Эти клетки, избежав апоптоза, получили возможность неконтролируемой пролиферации. Основным механизмом, определяющим начало злокачественной пролиферации, является блок апоптоза [4]. Лимфома Ходжкина, являясь злокачественной опухолью иммунной системы, находится в особой связи с эндокринным звеном гомеостаза. Развитие иммунной и эндокринной систем взаимосвязано с раннего периода онтогенеза. В ряде исследований было показано значение гормонов щитовидной железы и тиреотропного гормона гипофиза для лимфопролиферативных процессов [13].

В Международной морфологической классификации (2001) по иммуно-морфологическим характеристикам выделено четыре гистологических варианта лимфомы Ходжкина: 1) богатый лимфоцитами (5-6%), 2) нодулярный (узловатый) склероз (30-45%), 3) смешанно-клеточный (35-45%), 4) лимфоидное истощение (до 10%). Отдельно выделена особая форма — нодулярная с лимфоидным преобладанием лимфома Ходжкина, которая имеет наиболее благоприятное течение. Наряду с определением гистологического варианта используется клиническая классификация, отражающая степень