

УДК 616.223-002-018.23:577.112.6:577.322

РОЛЬ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА β_1 В СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ БРОНХИАЛЬНОЙ СТЕНКИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ВОСПАЛЕНИЯ В БРОНХАХ

Елена Андреевна ГЕРЕНГ, Ирина Владимировна СУХОДОЛО, Раиса Ивановна ПЛЕШКО, Людмила Михайловна ОГОРОДОВА, Иван Васильевич МИЛЬТО, Екатерина Борисовна БУКРЕЕВА, Ольга Сергеевна КОБЯКОВА, Полина Александровна СЕЛИВАНОВА, Иван Сергеевич КРЕМИС

*ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2*

Целью исследования явилась оценка влияния трансформирующего фактора роста β_1 на развитие структурных изменений в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. С помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования установлено, что у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой бронхиальной астмы фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» определяется повышение содержания трансформирующего фактора роста β_1 в клетках бронхиального эпителия с субэпителиальным фиброзом, утолщение базальной мембраны, а при хронической обструктивной болезни легких наблюдается повышенная плотность макрофагов, экспрессирующих рецепторы к трансформирующему фактору роста β_1 , что сочетается с выраженным периваскулярным фиброзом, плоскоклеточной метаплазией бронхиального эпителия.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста β_1 , фиброз бронхиальной стенки, воспаление в органах дыхательной системы.

Трансформирующий фактор роста β_1 (TGF- β_1), продуцируемый эпителиоцитами слизистой оболочки бронхов (СОБ), клетками воспалительного инфильтрата обладает выраженным иммунорегуляторным, антипролиферативным и регенерирующим действием [1]. Предпосылкой для проведения настоящего исследования послужили противоречивые данные о роли этого ростового фактора в реализации воспаления и структурных изменениях бронхиальной стенки при тяжелой форме бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

Цель исследования – оценить роль TGF- β_1 в развитии структурных изменений в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме БА и ХОБЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено одномоментное сравнительное исследование 10 пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая) (9 женщин и 1 мужчина) в возрасте от 36 до 62 лет (средний

Геренг Е.А. – к.м.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры морфологии, e-gereng@mail.ru

Суходоло И.В. – д.м.н. проф., зав. кафедрой морфологии, e-mail: suhodolo@sibmail.com

Плешко Р.И. – д.м.н., проф. кафедры морфологии

Огородова Л.М. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, заслуженный деятель науки, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Мильто И.В. – к.б.н., доцент кафедры морфологии, e-mail: milto_bio@mail.ru

Букреева Е.Б. – д.м.н., проф. кафедры внутренних болезней педиатрического факультета, e-bukreeva@mail.ru

Кобякова О.С. – д.м.н., зав. кафедрой общей и врачебной практики (семейной медицины), e-mail: olga_kobyakova@rambler.ru

Селиванова П.А. – к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины, e-mail: p_selivanova@mail.ru

Кремис И.С. – врач пульмонологического отделения, e-mail: kremanton@yandex.ru

возраст $49,09 \pm 1,52$ года) и 15 пациентов с тяжелым течением ХОБЛ (13 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 54 до 65 лет (средний возраст $54,8 \pm 11,6$ года). Обязательным условием участия в исследовании было наличие письменного информированного согласия больного, одобренное локальным комитетом по этике ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России г. Томска № 2833/1 от 31.11.2011 г. Диагностика болезней проведена согласно критериям глобальной стратегии лечения и профилактики БА и ХОБЛ (GINA, GOLD, 2006). Общий стаж болезни при БА составил $14,8 \pm 1,0$ года, при ХОБЛ – $18,6 \pm 2,6$ года.

Контрольной группой выступали лица без патологии органов дыхания ($n = 10$), сопоставимые по полу и возрасту с исследуемыми больными.

Биоптаты (2–3 фрагмента) забирали во время бронхоскопии из устья среднедолевого бронха правого легкого. Материал фиксировали в 10 % забуференном формалине, обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по стандартной методике [2, 4].

Гистологические препараты окрашивали гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону [2].

При обзорной световой микроскопии оценивали воспалительные, дисрегенераторные (пролиферацию базальных клеток, наличие плоскоклеточной метаплазии и бокаловидно-клеточной гиперплазии), фиброзные процессы.

На цифровой фотокамере Canon Power Shot A 630 (Япония) проводили съемку гистологических препаратов (7–10 случайных полей зрения для каждого среза). Цифровые фотографии подвергали морфометрическому исследованию с использованием компьютерной программы ImageJ 1.43 (режим доступа <http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>). За единичный объем принимали 1 мм^2 ткани бронхов. С помощью метода точечного счета Автандилова с использованием Plugins «Grid» в бронхиобиоптатах подсчитывали объемные плотности ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$) покровного эпителия и отдельных клеточных форм, удельный объем соединительной ткани, желез, микрососудов. Используя окуляр-микрометр, определяли высоту эпителиального пласта, а также ширину базальной мембраны (мкм).

При помощи Plugins «Cell» программы ImageJ в 1 мм^2 собственной пластинки СОБ подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата и различных клеточных популяций (макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов, полиморфоядерных лейкоцитов).

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных антител и системы визуализации фирмы «Dako» (Дания) LSAB2 System – HRP. Срезы докрашивали гематоксилином, заключали в бальзам.

Экспрессию $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ клеток воспалительного инфильтрата оценивали на 1 мм^2 ткани собственной пластинки СОБ.

Экспрессию рецепторов к $\text{TGF-}\beta_1$ в эпителиоцитах бронхов оценивали по интенсивности окраски срезов с помощью люминесцентного микроскопа «Люам И-3» с фотометрической насадкой ФМЭЛ-2. Фотометрирование проводили в 50 клетках реснитчатого эпителия слизистой оболочки бронхов при длине волны монохроматического света 548 нм (зеленый).

Данные представляли в виде медианы (Me), меру рассеяния в виде квартильного интервала ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$). В связи с тем, что небольшой объем выборки не позволил отнести данное распределение к нормальному закону, статистический анализ осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей в трех несвязанных группах проводили дисперсионным анализом Краскела–Уоллиса. Сопряженность между полученными данными определяли посредством оценки коэффициентов корреляции рангов Спирмена. Критическим уровнем значимости считали значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая) в СОБ выявлено увеличение плотности воспалительного инфильтрата преимущественно за счет лимфоцитов, которые принадлежали к субпопуляции CD4^+ -клеток (Т-хелперы) (табл. 1). Этот факт указывает на развитие аллергического воспаления в СОБ у пациентов с исследуемым фенотипом астмы, что подтверждается статистически значимой положительной ассоциацией между плотностью CD4^+ -клеток в бронхиальной стенке, с одной стороны, и концентрацией сывороточного IgE ($r = 0,72$; $p = 0,004$) и суточной лабильностью бронхов ($r = 0,85$; $p = 0,025$) – с другой. Отмеченное нами повышение плотности эозинофилов в СОБ, а также связь эозинофильного инфильтрата с ремоделированием бронхиальной стенки нашло отражение в обратных корреляциях между эозинофилией СОБ и стажем болезни ($r = -0,95$; $p = 0,005$), а также объемом форсированного выдоха за 1 с (ОФВ_1) ($r = -0,75$;

Таблица 1

Морфометрические показатели состава клеточного инфильтрата и количества $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клеток в слизистой оболочке бронхов у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» и ХОБЛ, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Исследуемый параметр	Контрольная группа (n = 10)	Пациенты с бронхиальной астмой (n = 10)	Пациенты с ХОБЛ (n = 10)
Суммарная плотность инфильтрата	267,94 (106,93–478,98)	1636,63 (1486,66–1854,71)*	1164,03 (999,05–1593,82)*.#
Макрофаги	83,44 (26,43–125,22)	256,24 (234,32–282,44)*	183,23 (123,62–225,62)*.#
Полиморфно-ядерные лейкоциты	18,24 (5,86–24,43)	498,31 (365,21–533,42)*	528,62 (485,34–688,42)*.#
Эозинофилы	–	26,43 (18,25–32,42)*	13,82 (12,27–24,52)*.#
Лимфоциты	166,22 (74,64–329,33)	855,72 (665,32–1006,43)*	438,36 (377,82–655,24)*.#
$CD4^+$ -лимфоциты	66,39 (29,85–131,82)	525,63 (185,24–635,47)*	102,35 (98,43–285,42)*.#
$CD8^+$ -лимфоциты	55,33 (24,88–109,77)	285,43 (136,43–342,23)*	336,01 (279,36–369,82)*.#

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя лиц контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$, # – отличие от величины соответствующего показателя пациентов с бронхиальной астмой фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» статистически значимо при $p < 0,05$.

$p = 0,001$). Среди эозинофильных гранулоцитов преобладали клетки с признаками дегрануляции, что свидетельствует о высвобождении ими катионных белков, обладающих выраженным цитотоксическим действием на эпителий бронхов [3, 4]. Возможно, этим можно объяснить снижение высоты эпителиального пласта у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая). Доказательством обнаруженного нами факта может служить корреляция между данным морфометрическим параметром и плотностью эозинофильных гранулоцитов в собственной пластинке СОБ ($r = -0,91$; $p = 0,009$).

В последние годы эозинофилам отводится ключевая роль в генерации оксида азота, образующегося вследствие высокой функциональной активности индуцибельной NO-синтазы. В условиях окислительного стресса, наблюдаемого при воспалении в СОБ у пациентов с данной формой астмы, оксид азота метаболизируется преимущественно с образованием пероксинитрита, который стимулирует выработку $TGF-\beta_1$ в бронхиальной стенке [5].

Действительно, у пациентов с фенотипом «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» определяется статистически значимое ($p = 0,002$) повышение содержания данного ростового фактора в клетках бронхиального эпителия (0,526 (0,437–0,688) усл. ед.; 0,415 (0,305–

0,586) усл. ед. при тяжелой форме ХОБЛ, 0,223 (0,098–0,395) усл. ед. – в контроле). Интересно, что у исследуемой группы пациентов с тяжелой формой астмы высокие показатели экспрессии рецепторов к $TGF-\beta_1$ в бронхиальном эпителии СОБ сочетаются с большей плотностью клеток фибробластического ряда и утолщением базальной мембраны (табл. 2).

Вероятно, все эти изменения взаимосвязаны: усиление высвобождения $TGF-\beta_1$ из клеток бронхиального эпителия приводит к увеличению толщины базальной мембраны за счет повышения продукции коллагена I, III, VIII типов и компонентов основного вещества (фибронектина, тенасцина), синтезируемых лаброцитами [4]. Утолщение базальной мембраны можно рассматривать, с одной стороны, как защитно-приспособительную реакцию, с другой – как морфологический маркер бронхиальной гиперреактивности, наблюдаемой у пациентов с тяжелой формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимой).

У пациентов с тяжелой формой ХОБЛ по сравнению с лицами всех сравниваемых групп в СОБ определяется самая высокая плотность макрофагов, экспрессирующих рецепторы к $TGF-\beta_1$ и локализованных преимущественно периваскулярно. Известно, что $TGF-\beta_1$ активизирует функционирование фибробластов, стимулируя развитие периваскулярного фиброза

Таблица 2

Морфометрические показатели слизистой оболочки бронхов у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» и ХОБЛ, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Исследуемый параметр	Контрольная группа (n = 10)	Пациенты с бронхиальной астмой (n = 10)	Пациенты с ХОБЛ (n = 10)
Объемная плотность покровного эпителия, мм ³ /мм ³	0,201 (0,132–0,344)	0,155 (0,044–0,241)*	0,274 (0,162–0,551)*, #
Объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,141 (0,102–0,203)	0,081 (0,022–0,101)*	0,156 (0,121–0,255)*, #
Объемная плотность бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,042 (0,031–0,092)	0,021 (0,012–0,061)*	0,023 (0,011–0,081)*
Объемная плотность базальных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,028 (0,012–0,043)	0,053 (0,014–0,085)*	0,107 (0,031–0,223)*, #
Относительный объем желез, мм ³ /мм ³	0,271 (0,141–0,622)	0,191 (0,134–0,324)*	0,132 (0,054–0,266)*, #
Относительный объем микрососудов, мм ³ /мм ³	0,047 (0,032–0,075)	0,065 (0,022–0,091)*	0,032 (0,014–0,135)*, #
Относительный объем соединительной ткани, мм ³ /мм ³	0,661 (0,364–0,845)	0,751 (0,632–0,851)*	0,836 (0,602–0,891)*, #
Высота эпителиального пласта, мкм	38,13 (21,82–73,54)	19,32 (17,81–28,91)*	83,92 (65,62–94,84)*, #
Ширина базальной мембраны, мкм	–	16,72 (8,15–29,12)*	6,48 (2,09–9,35)*, #

в собственной пластинке СОБ и сужение просвета сосудов [6]. Это приводит к уменьшению объемной плотности сосудов микроциркуляторного русла, утяжеляет течение ХОБЛ и клинически проявляется в снижении индекса Тиффно (отношение ОФВ₁ к форсированной жизненной емкости легких ФЖЕЛ), что подтверждается в обнаруженной нами отрицательной ассоциации между индексом Тиффно и плотностью макрофагов, экспрессирующих рецепторы к TGF- β_1 ($r = -0,75$; $p = 0,004$).

Согласно данным S. Isajevs, иммунорегуляторное влияние TGF- β_1 осуществляется активацией пула Т-лимфоцитов и возрастанием числа CD8⁺-клеток [7]. У пациентов с тяжелой формой ХОБЛ в бронхиальной стенке нами обнаружено повышение плотности CD8⁺-клеток, локализующихся суб- и интраэпителиально (см. табл. 1). У пациентов с тяжелой формой ХОБЛ цитотоксический эффект проявляется деструктивными процессами в бронхиальной стенке, что в дальнейшем может приводить к развитию плоскоклеточной метаплазии (см. табл. 2). Метаплазия реснитчатого эпителия в многослойный плоский, наблюдаемая нами более чем в 50 % случаев у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ, расценивается как пролиферативно-клеточный вариант реорганизации бронхиального эпителия, связанный с истощением структурно-

метаболических резервов клетки и снижением их белок-синтетической функции [4, 7].

Помимо непосредственного цитотоксического действия на клетки бронхиального эпителия, CD8⁺-лимфоциты вырабатывают TNF- α , который усиливает высвобождение IL-8 из макрофагов. Под влиянием данного интерлейкина происходит активация нейтрофильных лейкоцитов, плотность которых была повышена в СОБ у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ (см. табл. 1). При тяжелой форме ХОБЛ нейтрофилы участвуют в развитии окислительного стресса, формируют дисбаланс в протеиназно-антипротеиназной системе с последующей структурной перестройкой бронхиальной стенки [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, аллергический тип воспаления, развивающийся в слизистой оболочке бронхов у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой бронхиальной астмы фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией», приводит к повышению содержания трансформирующего фактора роста β_1 в клетках бронхиального эпителия с развитием субэпителиального фиброза, утолщения базальной мембраны с более высокими показателями бронхиальной гиперреактивности. В бронхиальной стенке у пациентов с тяжелой формой

ХОБЛ наблюдается повышенная плотность макрофагов, экспрессирующих рецепторы к трансформирующему фактору роста β_1 , что сочетается с выраженным периваскулярным фиброзом, плоскоклеточной метаплазией бронхиального эпителия с более низкими показателями индекса Тиффно (ОФВ₁/ФЖЕЛ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boxall C., Holgate S.T., Davies D.E. et al. The contribution of transforming growth factor- β_1 and epidermal growth factor signaling to airway remodeling in chronic asthma // Eur. Respir. J. 2006. 27. 208–229.
2. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. М., 2002. 240 с.
3. Непомнящих Г.И. Биопсия бронхов: морфогенез общепатологических процессов в легких. М., 2005. 405 с.

4. Jeffery P.K. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // Proc. Am. Thorac. Soc. 2004. 1. 176–183.

5. Козина О.В., Огородова Л.М., Андрушечев В.В. и др. Метаболиты оксида азота и их значение в патогенезе бронхиальной астмы // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. (6). 34–37.

6. Wilson J.W., Hii S. The importance of the airway microvasculature in asthma // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2006. 6. 51–55.

7. Isajevs S., Taivans I., Strazda G. et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD // Eur. Respir. J. 2009. 33. 61–67.

8. Gernez Y., Tirouvanziam R., Chanez P. et al. Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how? // Eur. Respir. J. 2010. 35. 467–469.

ROLE OF THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 IN STRUCTURAL CHANGES OF A BRONCHIAL WALL AT DIFFERENT VARIANTS OF INFLAMMATION IN BRONCHIA

Elena Andreevna GERENG, Irina Vladimirovna SUKHODOLO, Raisa Ivanovna PLESHKO, Lyudmila Mikhajlovna OGORODOVA, Ivan Vasilevich MILTO, Ekaterina Borisovna BUKREEVA, Olga Sergeevna KOPYAKOVA, Polina Aleksandrovna SELIVANOVA, Ivan Sergeevich KREMIS

Siberian State Medical University, 634050, Tomsk, Moskovsky tract, 2

The research aim was the evaluation of transforming factor of growth β_1 influence on development of structural changes in mucous membrane of bronchial tubes at severe form of bronchial asthma and chronic obstructive lung disease. It has been determined by means of histological, immunohistological and morphometric methods, that the increase of level of the transforming factor of growth β_1 in cells of bronchial epithelium with subepithelial fibrosis and thickening of basilar membranes were revealed at patients with severe therapeutically resistant form of bronchial asthma of the phenotype «the asthma with the fixed bronchial obstruction», while the raised density of macrophages exposing receptors to the transforming growth factor β_1 was found at patients with chronic obstructive lung disease, that is combined with expressed perivascular fibrosis, squamous metaplasia of bronchial epithelium.

Keywords: transforming growth factor β_1 , bronchial wall fibrosis, inflammation of the respiratory system.

Gereng E.A. – candidate of medical sciences, senior researcher, assistant professor of the chair for morphology, e-mail: e-gereng@mail.ru

Sukhodolo I.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for morphology, e-mail: suhodolo@sibmail.com

Pleshko R.I. – doctor of medical sciences, professor of the chair for morphology, e-mail: raisaP57@mail.ru

Ogorodova L.M. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, honored worker of science, head of the chair of faculty pediatrics with the course of children diseases, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Milto I.V. – candidate of biological sciences, assistant professor of the chair for morphology, e-mail: milto_bio@mail.ru

Bukreeva E.B. – doctor of medical sciences, professor of the chair for internal diseases of pediatric faculty, e-mail: e-bukreeva@mail.ru

Kobyakova O.S. – doctor of medical sciences, head of the chair for general and medical practice (family medicine), e-mail: olga_kobyakova@rambler.ru

Selivanova P.A. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for hospital therapy with the course of physical rehabilitation and sports medicine, e-mail: p_selivanova@mail.ru

Kremis I.S. – doctor of pulmonological department, e-mail: kremanton@yandex.ru