

А.Е. Дорофєєв¹, Й. Хоростовска-Винімко², С.В. Коваленко³, В.С. Хорунжа¹,
І.В. Василенко¹, І.С. Давиденко³, Р. Струнявски²

Зміни клітинного інфільтрату в слизовій оболонці bronхів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень залежно від рівня антипротеолітичного захисту

Вперше вивчалися генотип та сироватковий рівень альфа-1-антитрипсину (ААТ), експресія муцинів MUC-2, MUC-3, MUC-4 в слизовій оболонці бронхів хворих на хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) під час інфекційного та неінфекційного загострення. Встановлено, що при загостренні ХОЗЛ на фоні зниження антипротеолітичного захисту в різних типах епітеліальних клітин слизової оболонці бронхів відбувається різного ступеню виразності зниження експресії антигенів MUC2 та MUC3. Виявлена експресія антигенів MUC2 та MUC3 у веретеноподібних клітинах стромы (фібробластах) при загостренні ХОЗЛ дозволяє засвідчити факт епітеліально-мезенхімальної трансформації, а саме, зміну якості трансформованих епітеліальних клітин, в зв'язку із чим вони по-іншому, ніж звичайні епітеліальні клітини, реагують на молекулярні фактори, які відіграють роль у розвитку запального процесу та прогресуванні фіброзу при ХОЗЛ.

ВСТУП

В'язкий слизовий гель, головною складовою частиною якого є муцини, покриває більшість епітеліальних поверхонь і служить селективним захисним бар'єром між плазматичною мембраною і оточенням клітини [7]. Дослідження функції муцинів можуть пояснити деякі клітинні механізми прогресування запалення дихальних шляхів (ДШ) [9]. Зміни продукції муцинів та дискринія є загальною ознакою запального процесу при хронічних обструктивних захворюваннях легень (ХОЗЛ), що логічно обґрунтовує важливість дослідження впливу муцинів на процеси прогресування запального процесу в ДШ [1, 6]. Відомо, що під дією прозапальних цитокінів посилюється експресія гена, що кодує муцин, а нейтрофільна еластаза і катепсин G стимулюють проліферацію секреторних клітин слизових залоз, що призводить до ремоделювання ДШ, в тому числі до клітинної гіперплазії

[12]. Функцію основного інгібітору нейтрофільної еластази та інших пошкоджуючих протеаз (трипсіна, хімотрипсіна, катепсіна G, протеїнази-3, тромбіну, калікреїну та інш.) виконує альфа-1-антитрипсин (ААТ), який грає провідну роль в гальмуванні тканинного протеолізу [11]. Дефіцит ААТ залишається мало діагностованою проблемою, знання про його наявності є дуже важливим для хворого. Вивчення функціонального стану муцинів на молекулярному рівні та факторів, які на нього впливають, має важливе значення для подальших досліджень, спрямованих на попередження прогресування та лікування ХОЗЛ.

Метою нашого дослідження було комплексне вивчення імуногістохімічних змін клітинного інфільтрату за вмістом муцинів MUC 2, 3, 4 у слизовій оболонці (СО) бронхів при ХОЗЛ в осіб з різними сироватковим рівнем ААТ і його генотипом.

© А.Е. Дорофєєв, Й. Хоростовска-Винімко, С.В. Коваленко, В.С. Хорунжа, І.В. Василенко, І.С. Давиденко, Р. Струнявски

МЕТОДИКА.

Обстежено 30 пацієнтів, які знаходилися на стаціонарному лікуванні у пульмонологічному відділенні обласної клінічної лікарні м. Чернівці. Вік обстежених коливався від 26 до 77 років (в середньому $53,7 \pm 2,1$ року). У дослідження включалися хворі, які звернулися в стаціонар в період загострення, яким був виставлений діагноз ХОЗЛ (виставлявся на підставі критеріїв діагностики “Key indicators for considering a diagnosis of COPD” [2, 5]). З метою визначення ступеня та характеру запалення бронхів всім хворим проводили фібробронхоскопію (ФБС) за допомогою фібробронхоскопа Olympus. У зв'язку із необхідністю збереження для імуногістохімічних досліджень цілісності антигенів у структурах бронхів виконували прижиттєву біопсію СО бронхів за загальноприйнятою методикою. Рівень біопсії – шпори сегментарних бронхів. Під час фібробронхоскопії спеціальними щипцями забирали шматочок стінки бронху із макроскопічно-змінених ділянок. Висікався шматочок тканини, що містив лише слизову та підслизову оболонки, не травмуючи хрящові кільця. Свіжий матеріал фіксували протягом 22 годин в нейтральному забуференому 10% водному розчині формаліну, після чого здійснювали зневоднювання у висхідній батареї етанолу і заливку в парафін. З парафінових блоків на санному мікромомі виготовляли зрізи товщиною 5 мкм. Парафінові зрізи монтували на неімуногенні предметні скельця SuperFrost®Plus (Germany). Вивчали оптичну густину (в умовних одиницях) специфічного забарвлення структур бронхів у хворих на ХОЗЛ при застосуванні імуногістохімічних методик на антигени MUC-2, MUC-3, MUC-4 за допомогою первинних моноклональних АТ до цих протеїнів та системи візуалізації Dako EnVision+System, Peroxidase (AEC). Інтенсивність забарвлення (оптична густина) оцінена об'єктивно на цифрових копіях оптичних зображень мікропрепаратів за допомогою методу комп'ютерної мікроденсито-

метрії у середовищі графічної комп'ютерної програми GIMP, версія 2,82 (ліцензія GPL) зондовим способом у градаціях інтенсивності забарвлення (від 0 до 255) з логарифмічним перерахунком в умовні одиниці оптичної густини (ум.од.опт.густина) з градацією від «0» (абсолютна прозорість) до «1» (абсолютна непрозорість).

Сироватковий рівень ААТ визначали за допомогою імуноферментного аналізу за допомогою панелі Immunokit на базі імунологічної лабораторії Університетської клініки при Донецькому національному медичному університеті ім. М. Горького. У всіх хворих проводилося генотипування S- і Z-дефіцитних алелей - методом полімеразної ланцюгової реакції з висушених зразків крові в Національному інституті туберкульозу та хвороб легень (Варшава, Польща).

Статистична обробка результатів проводилася з використанням методів інтервованої системи статистичної обробки стандартного пакету Microsoft Excel для вірогідності 95% і 99%. Для протяжних змінних обчислювали середні величини, їх стандартні відхилення й помилки ($M \pm m$).

Обстежені хворі були розподілені на 2 групи: I група - хворі на ХОЗЛ III стадії без ознак інфекційного загострення – 14 пацієнтів та II група - 16 осіб, хворі на ХОЗЛ та ознаками інфекційного загострення I типу за Антонісенном та стадії III [5]. Серед хворих I групи жінок було 6 (42,8%), II групи – 7 (43,75%) осіб жіночої статі. За ставленням до тютюнокуріння хворі I групи розподілялися так: 11 - активні курці в минулому, 3 - залишилися ними і дотепер, стаж куріння – $41,2 \pm 5,1$ роки. Індекс „пачка/рік” становив $29,5 \pm 2,4$ роки. Середній показник ОФВ₁ у пацієнтів I групи становив $38,9 \pm 4,3\%$ до належної величини. До II групи увійшли 16 хворих на ХОЗЛ, середній вік $65,4 \pm 4,3$ роки. Середня тривалість захворювання – $18,3 \pm 1,7$ роки. Активних курців – 5 осіб, в минулому - 15 осіб, індекс „пачка/рік” становив $48,3 \pm 3,8$ роки. Середній показник ОФВ₁ у пацієнтів I

групи складав $37,6 \pm 2,7\%$ від належних.

Результати та їх обговорення. Генотипування ААТ показало, що більшість обстежених пацієнтів виявилися гомозиготними по М-аллелю (93,33%), у двох пацієнтів II групи був виявлений генотип PiMZ (6,67%).

Серед пацієнтів I групи нормальний рівень ААТ (120 - 200 мг/дл) спостерігався у 11 осіб (78,57%), суміжні значення ААТ (100 - 120 мг/дл) – у 2 осіб (14,29%), у одного хворого (7,14%) рівень ААТ був низьким (менше 100 мг/дл). Відповідно пацієнтів II групи: 10 осіб (62,5%) мали нормальні показники ААТ у сироватці крові, 4 осіб (25%) – суміжні, 2 (12,5%) – низькі.

Серед пацієнтів з нормальним рівнем ААТ кількість курців та некурців розподілилася в процентному співвідношенні 59,09% до 40,91%. Серед хворих з суміжними значеннями ААТ теж превалювали курці - 80,0% до 20,0%. Усі пацієнти з низьким рівнем ААТ виявилися курцями (100%). Таким чином, куріння може розглядатися як фактор ризику, який гальмує генетично нормальну продукцію ААТ. Наші дані зіставленні з міжнародними [3, 5, 11]. У курящих осіб з дефіцитом ААТ активність протеолітичних ферментів може бути значно вище норми, а знижена

антіпротеазна активність не в змозі захистити легеневу тканину від ранньої деструкції.

При використанні імуногістохімічних методів на антигени MUC-2, MUC-3, MUC-4 у хворих на ХОЗЛ I групи отримані наступні результати. Позитивне імуногістохімічне забарвлення (експресія) на антиген MUC-2 спостерігається в поодиноких клітинах, які злучені у просвіт бронхів (рис.1), оптична густина такого забарвлення у середньому становить $0,128 \pm 0,010$ ум.од.опт.густини. Точно такі ж цифри отримані для покривного епітелію бронхів (табл.).

Експресія антигену MUC-3 відмічається в покривному епітелії бронхів з виразністю від середньої до слабкої із середніми цифрами оптичної густини забарвлення $0,201 \pm 0,021$ ум.од.опт.густини. Максимальна експресія антигену MUC-3 в покривному епітелії бронхів показана на рисунку 2.

У келихоподібних клітинах експресія антигену MUC-3 не виявлена. У слизових залозах експресія MUC-3 відсутня у більшості клітин, а в тих клітинах, в яких вона присутня, її можна оцінити як помірну.

У стромі бронхів експресія MUC-3 визначається в веретеноподібних клітинах під субепітеліальною базальною мембраною

Таблиця. Оптична густина (в умовних одиницях) специфічного забарвлення структур бронхів у хворих на ХОЗЛ при застосуванні імуногістохімічних методик на антигени MUC-2, MUC-3, MUC-4 ($X \pm s_x$)

Імуногістохімічна методика/локалізація	I група хворих (n=14)	II група хворих (n=16)	Вірогідність розбіжностей (P) у середніх тенденціях за методом Mann-Whitney
MUC-2 / покривний епітелій	$0,128 \pm 0,010$	Не визначається	P не обраховано
MUC-2 / келихоподібні клітини	$0,247 \pm 0,016$	$0,196 \pm 0,015$	$P < 0,05$
MUC-2 / епітелій слизових залоз	$0,212 \pm 0,018$	$0,103 \pm 0,008$	$P < 0,01$
MUC-2 / MUC-2-позитивні веретеноподібні клітини стромы	$0,208 \pm 0,025$	$0,206 \pm 0,028$	$P > 0,05$
MUC-3 / покривний епітелій	$0,201 \pm 0,021$	$0,049 \pm 0,006$	$P < 0,001$
MUC-3 / келихоподібні клітини	Не визначається	Не визначається	P не обраховано
MUC-3 / епітелій слизових залоз	$0,192 \pm 0,009$	$0,065 \pm 0,007$	$P < 0,001$
MUC-3 / MUC-3-позитивні веретеноподібні клітини стромы	$0,286 \pm 0,024$	$0,289 \pm 0,028$	$P > 0,05$
MUC-4 / будь-які структури	Не визначається	Не визначається	P не обраховано

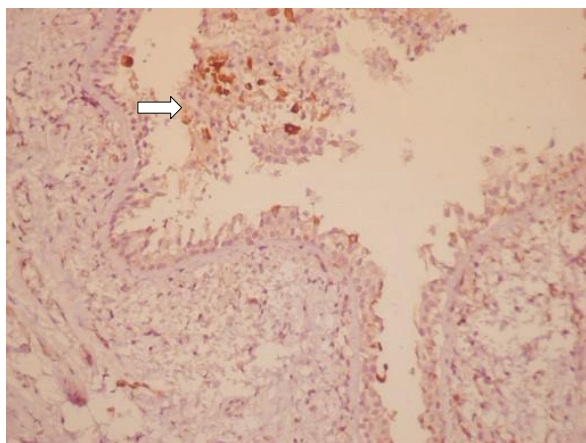


Рис. 1. Експресія антигену MUC-2 в десквамованому епітелії бронха у хворих на ХОЗЛ І групи. Імуногістохімічний метод, візуалізація з діамінобензидином. Об.20х.Ок.10х

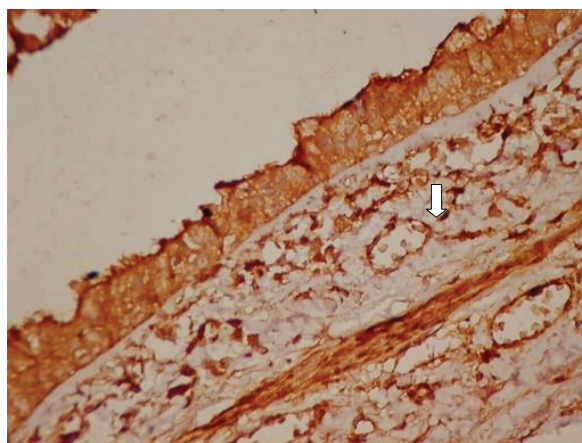


Рис. 2. Експресія антигену MUC-3 в покривному епітелії бронха та у веретеноподібних (фібробластоподібних) клітинах стромы бронха у хворих на ХОЗЛ І групи. Імуногістохімічний метод, візуалізація з діамінобензидином. Об.20х.Ок.10х

(рис.2) з виразністю від помірної до сильно вираженої із середніми цифрами оптичної густини забарвлення $0,286 \pm 0,024$ ум.од.опт. густини.

Щодо MUC-4, то слід відмітити, що в наших дослідженнях експресія цього антигену, як правило, не визначалася в жодній структурі. Лише у двох пацієнтів експресія антигену MUC-4 була виявлена у покривному епітелії бронхів, причому вона була ледве помітною.

Імуногістохімічне дослідження експресії антигенів MUC-2, MUC-3, MUC-4 у хворих на ХОЗЛ II групи дало наступні результати.

Експресія антигену MUC-2 в покривному епітелії практично не визначається. Отже, продукція цього білка в покривному епітелії при інфекційному загостренні ХОЗЛ порушена. Окрім того, за інтенсивністю забарвлення слід констатувати зниження експресії антигену MUC-2 в келихоподібних клітинах та епітелії слизистих залоз), у цифрах це показано в таблиці.

У покривному епітелії та епітелії слизистих залоз також знижена експресія антигену MUC-3 (табл.). У келихоподібних клітинах при інфекційному загостренні ХОЗЛ, так само, як і при неінфекційному, експресія антигену MUC-3 не визначалася.

На відміну від вищевказаних епітеліальних клітин в веретеноподібних клітинах стромы бронха зниження експресії антигенів MUC-2 та MUC-3 при інфекційному загостренні ХОЗЛ не знайдено. Отже, продукція вказаних молекул у клітинах, які, вірогідно, піддалися так званій епітеліально-мезенхімальній трансформації (EMT), не змінена при інфекційному загостренні ХОЗЛ у порівнянні з ХОЗЛ без інфекційного загострення. Ймовірно, це додатково підтверджує зміну якості даних трансформованих епітеліальних клітин, в зв'язку із чим вони по-іншому, ніж звичайні епітеліальні клітини, реагують на молекулярні фактори, які відіграють роль у розвитку запального процесу та прогресуванні фіброзу при ХОЗЛ.

Таким чином, при загостренні ХОЗЛ спостерігається експресія секреторних муцинів - MUC2 та MUC3, що сприяють утворенню гелевого компоненту слизу. Синтез MUC2 і MUC3 зменшується в ДШ при інфекційному загостренні ХОЗЛ III в порівнянні з їх експресією при неінфекційному загостренні ХОЗЛ III в усіх структурах, окрім веретеноподібних клітин стромы – фіброблестах. Хоча остаточна роль муцинів в ДШ не відома, вони можуть

функціонувати в якості рецепторів або рецепторних лігандів та активувати внутрішньоклітинні сигнальні каскади, що впливають на функції епітеліальних клітин, сприяючи, в тому числі розвитку ЕМТ [4,10, 13].

ВИСНОВКИ

1. Генотипування ААТ показало, що більшість обстежених пацієнтів виявилися гомозиготними по М-аллелю (93,33%), у двох був виявлений генотип RmZ (6,67%).

2. Усі пацієнти з низьким рівнем ААТ виявилися курцями, що дозволяє розглядати куріння як фактор ризику, який гальмує продукцію ААТ.

3. При інфекційному загостренні ХОЗЛ адекватний антипротейолітичний захист спостерігався у 62,5% обстежених, при неінфекційному загостренні - у 78,57%. На фоні зниженого антипротейолітичного захисту відмічається більш виражена проліферація секреторних клітин слизових залоз, що призводить до ремоделювання ДШ.

4. При інфекційному загостренні ХОЗЛ в різних типах епітеліальних клітин слизової оболонки бронхів знижується експресія антигенів MUC2 та MUC3.

5. Імуногістохімічне дослідження антигенів MUC2 та MUC3 у веретеноподібних клітинах строми дозволяє засвідчити факт так званої епітеліально-мезенхімальної трансформації в слизовій оболонці бронхів при загостренні ХОЗЛ.

**А.Е. Дорофеев¹, Й. Хоростовска-Винимко²,
С.В. Коваленко³, В.С. Хорунжа¹,
І.В. Василенко¹, І.С. Давиденко³, Р. Струнявски²**

ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ БРОНХОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОБСТРУКТИВНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ ЛЕГКИХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ АНТИПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ

Впервые изучался генотип и сывороточный уровень альфа-1-антитрипсина (ААТ), экспрессия муцинов MUC-2,

MUC-3, MUC-4 в слизистой оболочке бронхов больных хроническим обструктивным заболеванием легких (ХОЗЛ) во время инфекционного и неинфекционного обострения. Установлено, что при обострении ХОЗЛ на фоне снижения антипротейолитической защиты в различных типах эпителиальных клеток слизистой оболочки бронхов происходит различной степени выраженности снижение экспрессии антигенов MUC2 и MUC3. Выявлена экспрессия антигенов MUC2 и MUC3 в веретеноподобных клетках строны (фибробластах) при обострении ХОЗЛ позволяет засвидетельствовать факт эпителиально-мезенхимальной трансформации, в связи с чем они по-другому, чем обычные эпителиальные клетки, реагируют на молекулярные факторы, играющие роль в развитии воспалительного процесса и прогрессировании фиброза при ХОЗЛ. Ключевые слова: альфа-1-антитрипсин, муцины, слизистая оболочка бронхов, воспаление.

**A.E. Dorofeyev¹, J.Chorostowska-Wynimko²,
S.V. Kovalenko³, V.S. Khorunzhaya¹,
I.V. Vasylenko¹, I.S. Davydenko³, R. Struniawski²**

CHANGES OF THE CELLULAR INFILTRATE IN THE MUCOUS TUNIC OF THE BRONCHI IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN DEPENDENCE ON ANTIPROTOLITHIC PROTECTION

For the first time the genotype, serum levels of alpha-1-antitrypsin (AAT), the expression of mucin has been carried out of the mucous tunic of the bronchi in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) during an infectious and noninfectious exacerbation. It has been established that during an exacerbation of COPD in patients with reduced antiprotolitic protection in different types of epithelial cells of the mucous tunic of the bronchi there occurs a decline of the expression of antigens of MUC2 and MUC3 of a various degree of a marked character. The expression of antigens MUC2 and MUC3 detected in the fusiform cells of the stroma (fibroblasts) during a COPD exacerbation enables to certify a fact of an epithelial-mesenchymal transformation, as a result of which they react differently than ordinary epithelial cells to molecular factors which play a certain role in the development of an inflammatory process and progression of fibrosis in COPD.

Key words: alpha-1-antitrypsin, mucins, mucous tunic of the bronchi, inflammation.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Островський М.М. Вплив базового лікування хронічного обструктивного захворювання легень на процеси морфологічної перебудови та місцевих бар'єрних факторів захисту слизових оболонок бронхів / М.М. Островський, М.О. Кулініч-Міський // Укр. пульмон. журнал. - 2009. - №3. - С. 49-54.

2. Шмелев Е. И. Свежий взгляд на ХОБЛ // Пульмонология и аллергология. – 2011. - №4 (43). – С. 51-54.
3. Cigarette smoking is associated with subclinical parenchymal lung disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) – lung study / D.J. Lederer, P.L. Enright, S.M. Kawut, et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2009. - Vol. 180 – P. 407-14.
4. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation / L.A. Borthwick // Thorax. – 2009. – V. 64(9). – P.770-777.
5. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) / Workshop report, global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD.- Updated 2012. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http: \(www. goldcopd.com\)](http://www.goldcopd.com).
6. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1 / T.L. Hackett [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2009. – V.180(2). – P.122-33.
7. Linden S. K. MUCins in the MUCosal barrier to infection / S. K. Linden // MUCosal Immunology. – 2008. – Vol. 1. – P. 183–197.
8. Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients / C. Ward et al. // Thorax. – 2005. – V. 60(10). – P. 865-71.
9. Rose M.C. Respiratory tract MUCin genes and MUCin glycoproteins in health and disease / M.C. Rose, J.A. Voynow // Physiol Rev. – 2006. – Vol.86. – P.245-278.
10. Singh P.K. Cell surface-associated MUCins in signal transduction / P.K. Singh, M.A. Hollingsworth // Trends Cell Biol. - 2006. – Vol. 16.- P. 467-476.
11. Stoller J.K. A Review of α 1-Antitrypsin Deficiency / J.K. Stoller, L.S. Aboussouan // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2012. – Vol. 185, №3. - P. 246-59.
12. TGF-beta1 induces human bronchial epithelial cell-to-mesenchymal transition in vitro / M. Zhang, Z. Zhang, H.Y. Pan [et al.] // Lung. – 2009. – Vol. 187(3). – P. 187-194.
13. Voynow J.A. Mucins, mucus and sputum / J.A. Voynow, B.K. Rubin // Chest. – 2009. – Vol.135. – P. 505-512.

¹Донецький національний медичний університет ім. М. Горького,
dorofeyev@med.finfort.com

²Національний інститут туберкульозу та хвороб легень (Варшава, Польща),
rstruniawski@gmail.com

³Буковинський державний медичний університет,
cvetko@ukr.net