

ГІСТОХІМІЧНІ ЗМІНИ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ БРОНХІВ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ОБСТРУКТИВНОМУ ЗАХВОРЮВАННІ ЛЕГЕНЬ З СИНДРОМОМ ПОДРАЗНЕНОГО КИШЕЧНИКА

Д. мед. н. Коваленко С. В.,
к. мед. н. Патратий М. В.

Україна, м. Чернівці, Буковинський державний медичний університет,
кафедра внутрішньої медицини

Abstract. The article presents data of own research : features immune-histochemically changes in bronchial mucosa shell in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with concomitant irritable bowel syndrome (IBS). A reduction in expression of the secretory mucin - MUC2 that MUC3, contributing to the formation of a gel component mucus, worsening the phenomena of alteration and inflammation of bronchial walls in COPD with IBS, with the manifestation of the transformation of epithelial-mesenchymal in stroma of the bronchial tubes, which contributes to fibrosis, malfunction and the integrity of the mucosal barrier of the bronchi.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, mucins, epithelial-mesenchymal transformation, irritable bowel syndrome.

Вступ. На сьогодні з'явилися нові положення щодо хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) і, зокрема, захворювання має системні прояви [1, 3]. Недостньо вивченим є вплив системного запалення при ХОЗЛ на зміни слизових бар'єрів організму, що першими включаються у процеси, викликані персистуючим запаленням. До них належать слизові оболонки (СО) бронхів та кишечника. Поєднання ХОЗЛ із гастроентерологічними захворюваннями, набуває останніми роками все більшого значення [4,5]. Одним з частих і вивчених варіантів функціональних захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ) є синдром подразненого кишечника СПК [5].

Враховуючи спільні ознаки слизових бар'єрів бронхів та кишечника, цікавим на нашу думку є, встановити вплив системного персистуючого запалення при ХОЗЛ на зміни СО бронхів та кишечника шляхом імуногістохімічної оцінки клітинного запального інфільтрату, вмісту муцинів MUC 2, 3, 4 та перебудови епітелію СО бронхів та кишечника.

Метою нашого дослідження було комплексне вивчення морфологічних змін слизової оболонки (СО) бронхів, імуногістохімічне вивчення муцинпродукуючих клітин при ХОЗЛ та визначення основних чинників і механізмів патологічного ремоделювання бронхів.

Матеріали та методи. Обстежено 30 пацієнтів на ХОЗЛ, з них 19 хворих на ХОЗЛ - I група та 21 хворий на ХОЗЛ з СПК - II група. Діагноз та стадію ХОЗЛ було встановлено згідно з наказом МОЗ України №128 від 19.03.2007 р.) [2].

З метою визначення ступеня та характеру запалення бронхів проводили фібробронхоскопію. У зв'язку із необхідністю збереження для імуногістохімічних досліджень цілісності антигенів у структурах бронхів виконували прижиттєву біопсію СО бронхів. Рівень біопсії – шпори сегментарних бронхів. Під час фібробронхоскопії спеціальними щипцями забирали шматочок стінки бронху із макроскопічно-змінених ділянок. Свіжий матеріал фіксували протягом 22 годин в нейтральному забуференому 10% водному розчині формаліну за Р. Ліллі, 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). Мікроскопічними методами вивчали морфологічний стан наступних структур: у бронхах різного калібру – покривний епітелій бронхів, епітелій слизових залоз, стромальний компонент стінки бронха, периваскулярну тканину, інтерстицій міжальвеолярних перетинок.

Для оцінки стану зазначених структур застосовані наступні мікроскопічні методи: оглядове забарвлення гематоксилином і еозином, забарвлення пікрофуксином за методом ван Гізон для вивчення зрілих колагенових волокон, забарвлення альціановим синім за Стідменом на кислі глікозаміноглікани, PAS-реакція на полісахариди та глікопротеїни, імуногістохімічні методики на антигени MUC-2, MUC-3, MUC-4 за допомогою первинних моноклональних антитіл (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 мікроденситометрії 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. густини) з градацією від «0» (абсолютна прозорість) до «1» (абсолютна непрозорість).

Результати дослідження. При морфологічному дослідженні СО хворих II групи мало місце зниження висоти не десквамованих епітеліоцитів поверхні слизової оболонки бронхів за рахунок відторгнення їх апікальної частини. Запальний інфільтрат, який локалізувався переважно під покривним епітелієм бронху, складався з лімфоцитів та моноцитів. Збільшення об'єму судин мікроциркуляторного русла свідчило про повнокров'я мікроциркуляторного русла. У деяких його ділянках спостерігалися дрібні периваскулярні діapedезні крововиливи. Слиз на поверхні покривного епітелію бронху виявлявся у вигляді вузької смужки, яка мала переривчастий характер. Оптична густина забарвлення смужки у пацієнтів II гр. в деяких ділянках СО бронхів не виявлялася при наявності у пацієнтів I гр. значення $(0,104 \pm 0,012)$ ум. од. опт. густини. Оптична густина забарвлення на наявність слизу келихоподібних клітин у пацієнтів II гр. дорівнювала $(0,111 \pm 0,010)$ ум. од. опт. густини, була зменшеною порівняно з хворими I групи у 1,8 рази ($p < 0,001$). Крім того, виявлялося зростання об'єму залоз у стінці бронха до $(47,4 \pm 1,48)\%$ що було вірогідно на 12,3% більше, ніж у осіб I групи. Питомий об'єм запального інфільтрату строми під покривним епітелієм бронхів у досліджених II групи становив $(49,2 \pm 2,24)\%$, був на 17,4% більше ($p < 0,05$), ніж у хворих I групи.

У хворих II гр. відзначалося збільшення товщини субепітеліальної базальної мембрани до $(2,9 \pm 0,22)$ мкм або на 38,1 % відносно аналогічної у пацієнтів I гр. ($p < 0,05$) при збільшенні питомого об'єму зрілих колагенових волокон строми до $(27,8 \pm 1,62)$ у.о. на 19,8% ($p < 0,05$) від такого у пацієнтів I групи – $(23,2 \pm 1,47)$ у.о. При вивченні питомого об'єму судин мікроциркуляторного русла строми під покривним епітелієм СО бронхів пацієнтів III групи спостерігалось його збільшення від аналогічного в I групі на 83,1 % ($p < 0,05$). У запальних інфільтратах біоптатів СО бронхів досліджених II групи, порівняно з хворими I групи, відзначалося суттєве зростання вмісту поліморфноядерних лейкоцитів на 16,7% ($p < 0,05$) від їх кількості у пацієнтів I групи, що свідчило про більшу виразність місцевого запалення в СО бронхів у хворих на ХОЗЛ при поєднанні з СПК.

На тлі більш високої активності місцевого запалення збільшення об'єму слизових залоз та підвищення об'єму запального інфільтрату в СО бронхів, потовщення субепітеліальної базальної мембрани зі зростанням об'єму судин мікроциркуляторного русла під покривним епітелієм бронхів та об'єму зрілих колагенових волокон строми СО бронхів хворих на ХОЗЛ із СПК сприяє погіршенню бронхіальної прохідності, підвищує ступінь бронхіальної обструкції під час загострення.

У хворих II групи на поверхні покривного епітелію бронхів кількість слизового секрету зменшувалася; спостерігалися порушення процесів слизоутворення – майже у 2 рази ($p < 0,01$) зменшувався вміст полісахаридів та глікопротеїнів у слизу келихоподібних клітин та на 37,8% – зменшувалася кількість полісахаридів та глікопротеїнів у клітинах слизових залоз; синтез кислих глікозаміногліканів слизу у келихоподібних клітинах зменшувався на 33,6% ($p < 0,05$), у клітинах слизових залоз – у 2 рази ($p < 0,01$). Окрім цього, у слизовому секреті хворих II групи переважали полісахариди та глікопротеїни, на відміну від хворих I групи, де у слизовому секреті переважали кислі глікозаміноглікани. Таким чином, порушення слизоутворення та фізико-хімічних властивостей слизу, більш виражене у пацієнтів II групи сприяло бактеріальній адгезії і збільшенню кількості МО у бронхах. МО, в свою чергу, за рахунок інгібуючого впливу на синтез і продукцію компонентів слизу, сприяли порушенню проникності СБ бронхів, погіршенню його функції та структури.

При оцінці забарвлення структур бронхів на антигени MUC2,3,4 при ХОЗЛ з СПК було виявлено їх експресію різної вираженості у покривному епітелії бронхів та епітелії слизових залоз, в келихоподібних клітинах, веретеноподібних клітинах строми (фібробластах). Так, у покривному епітелії бронхів експресія MUC2 визначалась у хворих I групи та не визначалась у II групі; експресія MUC2 в келихоподібних клітинах у хворих II групи становила $(0,196 \pm 0,015)$ ум. од. опт. густини або була у 1,26 рази ($p < 0,05$) меншою за таку в I групі. Експресія MUC2 в епітелії слизових залоз в III групі дорівнювала $(0,103 \pm 0,008)$ ум. од. опт. густини, була у 2 рази меншою в порівнянні з I групою, а експресія MUC2 в веретеноподібних клітинах строми (фібробластах) спостерігалась однакового ступеню виразності як в I, так і в II групах.

У покривному епітелії бронхів хворих II групи спостерігалось вірогідне зменшення експресії MUC3 у 4,1 рази порівнянні з хворими I групи; в епітелії слизових залоз – майже в 3

рази ($p < 0,001$). У веретеноподібних клітинах величина експресії MUC3 не залежала від групи хворих – $0,286 \pm 0,024$ та $0,289 \pm 0,028$ ($p > 0,05$), відповідно в I та II групах. У келихоподібних клітинах експресії MUC3 не спостерігали у хворих обох груп.

Експресія MUC4 у покритому епітелії бронха спостерігалась тільки у 2 хворих I групи. Ймовірно, це пов'язано із низьким порогом чутливості методики до антигену MUC4 та слабкою його секрецією при ХОЗЛ. Мембрано-зв'язаний MUC4, присутній на апікальній поверхні війчастих клітин, ймовірно, разом з епітелієм піддається десквамації і не попадає в досліджуваний матеріал. Зниження експресії муцинів більшістю структурних елементів бронхів, що продукують слиз, можна розцінювати як фактор погіршення стану слизового бар'єру бронхів внаслідок зниження мукоциліарного кліренсу бронхів та бронхіальної прохідності у хворих із ХОЗЛ та СПК.

Рівномірна експресія MUC2,3, яка з'являється у фіброблестах строми, ймовірно, пов'язана із явищами епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT), коли нормальні епітеліальні клітини (наприклад, слизової оболонки залоз) під впливом певних факторів, наприклад, TGF- β 1 [8,10], набувають рис міофібробластних клітин. Внаслідок EMT епітеліальні клітини, втрачаючи міжклітинні зв'язки, переміщуються в інтерстицій, де, отримуючи повний мезенхімальний фенотип, приймають участь у синтезі фіброзної матриці [9,11]. Хоча остаточна роль муцинів в дихальних шляхах 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 EMT [6,7].

Висновки. При загостренні ХОЗЛ із СПК спостерігалось зниження експресії секреторних муцинів - MUC2 та MUC3, що сприяють утворенню гелевого компоненту слизу. Синтез MUC2 і MUC3 зменшується в дихальних шляхах при поєднанні ХОЗЛ з СПК в порівнянні з їх експресією при ХОЗЛ без СПК. Рівномірна експресія MUC 2,3, яка з'являється у фіброблестах строми, ймовірно, пов'язана із явищами епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT), коли нормальні епітеліальні клітини, втрачаючи міжклітинні зв'язки, переміщуються в інтерстицій, де, отримуючи повний мезенхімальний фенотип, приймають участь у синтезі фіброзної матриці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Морфологические маркеры ремоделирования слизистой оболочки бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких / Суходоло И.В. [и др.] // Пульмонология. – 2009. – № 4. – С.64-68.
2. Наказ МОЗ України від 19.03.2007р. №128 «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія». [Електронний ресурс]. - Режим доступа: // www.ifp.kiev.ua.
3. 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-Міськів // Укр. пульмон. ж. - 2009. - №3. - С. 49-54.
4. Baretic M. Epidemiology of irritable bowel syndrome in Croatia / Baretic M. // Coll. Antropol. 2002. - Vol.26. - P. 85-91.
5. Cole J.A. Incidence of IBS in a cohort of people with asthma / J.A. Cole // Respir Med. - 2007. – V. 52(2). – P. 329-35.
6. Linden S. K. Mucins in the mucosal barrier to infection / S. K. Linden // Mucosal Immunology. – 2008. – Vol. 1. – P. 183–197.
7. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection / J.L. Auley at al. // J Clin Invest. – 2007. – V. 117 (8) – P. 2313-24.
8. Pierre P. Savagner. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon / Pierre P. Savagner // Ann Oncol. – 2010. – V. 21(7). – P. 89–92.
9. Sohal Sukhwinder Singh. Role of epithelial mesenchymal transition (EMT) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) / Sohal, Sukhwinder Singh, Walters, Eugene Haydn // Respiratory Research. – 2013. - 14(1). – P. 120.
10. TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition modeling / Xenitidis, P., Seimenis, I., Kakolyris, S., Adamopoulos, A. // Journal of Physics: Conference Series. – 2015. – V. 637 (1).
11. Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1 / Yamauchi Y. [et al.] // Exp Lung Res. – 2010. – V. 36(1). – P.12-24.