

Федеральное агентство по здравоохранению и социальному развитию  
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
**ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**имени И.М.СЕЧЕНОВА**

На правах рукописи

**Тыонг Фи Выонг**

**Морфологические особенности и молекулярные механизмы  
ремоделирования легочной ткани при  
идиопатическом легочном фиброзе**

(14.03.02 – «патологическая анатомия»)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор  
Коган Е.А.

**Москва 2010**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность работы**

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) — самый распространенный вариант хронических идиопатических интерстициальных пневмоний (ИИП), имеющий морфологию обычной интерстициальной пневмонии (ОИП) и отличающийся «злокачественным» течением. Недостаточное понимание этиологии и патогенеза ИЛФ приводит к тому, что заболевание диагностируется поздно, в результате чего используемые методы терапии часто оказываются неэффективны. Почти у всех больных ИЛФ отмечается прогрессирующее течение, приводящее к хронической сердечно-легочной недостаточности. Средняя продолжительность жизни больных ИЛФ составляет 3–4 года, что является наиболее короткой среди всех вариантов ИИП [Travis W.D, 2002; Краева В. с соавт. , 2003]. Ситуация осложняется также тем, что на фоне ИЛФ рак легкого развивается, в среднем, в 12–14% случаев [Коган Е., 2007].

Механизмы прогрессирования ИЛФ от стадии альвеолита до стадии выраженного фиброза (так называемого “сотового легкого”) изучены недостаточно. До сих пор нет единого мнения относительно процессов патогенеза и морфогенеза заболеваний из группы ИИП. Одновременно существуют противоречащие друг другу воспалительная и репаративная теории патогенеза ИЛФ. Одна группа исследователей связывает развитие ИЛФ с иммунным воспалением [Oshikawa K et al, 2002; Kamp D, 2003], другая — с нарушением репарации стромы и эпителия в участках повреждения терминальных респираторных отделов легкого [Selman M, King T.E., Pardo A, 2003].

Комплексного изучения морфологических особенностей и молекулярных механизмов регуляции процессов пролиферации, апоптоза, клеточной дифференцировки, неоангиогенеза и фиброза с учетом стадии заболевания и локализации патологического процесса в ткани легких при ИЛФ не проводилось. Имеются многочисленные работы, указывающие на

усиление апоптоза эпителия при ИЛФ [Kuwano K. et al., 1999; Maeyama T et al., 2001; Thannickal V.J. and Horowitz J. C., 2006], продукцию TGF- $\beta$  [Коган и соавт., 2007], а также матриксных металлопротеиназ (MMPs) [Suga M et al., 2000; Cook D. N., et al., 2002; Pardo A. and Selman M, 2006] в эпителии и клетках стромы. Остаются открытыми вопросы, по какой причине ИЛФ, в отличие от других вариантов ИИП, имеет резистентность ко всем известным современным методам терапии, а также как объяснить столь быстро прогрессирующее течение ИЛФ, сопровождающееся развитием тяжелейшего фиброза и дисрегенерации эпителия (“сотовое” легкое), аденоматозной гиперплазии, возникновение рака легкого.

Кроме того, при ИЛФ патологические изменения захватывают респираторный отдел легкого, включающий бронхиоло-альвеолярную переходную зону (БАПЗ). Также остается не изученным вопрос об участии структуры переходной зоны в прогрессировании фиброза и аденоматоза при ИЛФ, неизвестны молекулярные механизмы, которые могли бы участвовать в этих процессах. Знание морфологических изменений и молекулярных механизмов необходимо для совершенствования методов диагностики и лечения больных ИЛФ.

**Целью исследования является изучение морфологических особенностей и молекулярных механизмов ремоделирования легочной ткани, включая бронхиоло-альвеолярную переходную зону, в ходе прогрессирования идиопатического легочного фиброза**

Для реализации цели поставлены следующие задачи:

1. Дать морфологическую характеристику ИЛФ с учетом структурно-функциональных особенностей БАПЗ и стадии заболевания.
2. Изучить иммуногистохимические особенности ИЛФ с помощью маркеров пролиферации, апоптоза, ангиогенеза в респираторных отделах легкого, включая БАПЗ.
3. Изучить роль MMPs и TIMP-4 в развитии патологических процессов и ремоделирования легочной ткани при ИЛФ.

4. Изучить морфологические и иммуногистохимические характеристики процесса ремоделирования легочной ткани на ранней и поздней стадиях ИЛФ.

### **Научная новизна**

Новизна диссертационной работы состоит в том, что в ней впервые описана морфология ремоделирования легочной ткани при прогрессировании ИЛФ с учетом структурно-функциональных особенностей не только респираторных отделов легкого, но и БАПЗ, а также стадии заболевания. В данной работе также впервые показаны следующие факты:

Важнейшим патогенетическим и морфологическим проявлением ремоделирования легочной ткани при ИЛФ является развертывание дисрегенераторных изменений на фоне хронического воспаления в бронхиоло-альвеолярной переходной зоне. Именно в этой зоне развивается инициальное повреждение, хроническое воспаление, патологическая репарация с пролиферацией миофиibroбластов, неоангиогенезом, апоптозом и дисрегенерацией эпителия, приводящие к развитию сотового легкого, своеобразного легочного цирроза, а также к предраку и раку легкого.

В ремоделировании респираторных отделов легочной ткани, в первую очередь, БАПЗ, участвуют не только клетки воспалительного инфильтрата, но и миофиibroбласты, а также гиперплазированный альвеолярный и бронхиолярный эпителий посредством механизма стимуляции деструкции внеклеточного матрикса, пролиферации, апоптоза и неоангиогенеза. Взаимодействие между этими клетками в так называемой “эпителиально–мезенхимальной трофической единице” может быть ключевым звеном морфогенеза прогрессирующего легочного фиброза при ИЛФ.

На ранней стадии ИЛФ клетки воспалительного инфильтрата вместе с миофиibroбластами и гиперплазированным эпителием выполняют главную роль в ремоделировании легочной ткани и раннем формировании миофибrotических фокусов в области бронхиоло-альвеолярной переходной зоны. По мере развития ИЛФ миофиibroбласты приобретают апоптоз-

резистентный фенотип и способность к персистенции в ткани легких, стимуляции апоптоза рядом лежащих альвеолоцитов и становятся центральными клетками, ответственными за прогрессирование фиброза легких. На поздней стадии ИЛФ клетки стромы вместе с эпителиальными клетками аденоматозных структур продуцируют различные факторы роста, тем самым усиливают склеротические изменения и неоангиогенез в легочной ткани.

### **Практическая значимость работы**

Полученные данные морфологических и иммуногистохимических характеристик ремоделирования легочной ткани в респираторном отделе, включая БАПЗ, при ИЛФ могут быть использованы в проведении ранней морфологической дифференциальной диагностики ИЛФ с другими нозологическими вариантами ИИП на биопсийном и аутопсийном материале легких, а также в разработках новых подходов в прогнозировании течения, профилактики и таргетной терапии ИЛФ. Наблюдаемая в данной работе избыточная продукция MMP 1, 2, 7 клетками паренхимы и стромы легочной ткани и относительная недостаточность их ингибиторов TIMPs (в т. ч. TIMP4) дает обоснование необходимости разработки лекарственных средств — специфических ингибиторов MMPs. Такие ингибиторы не только помогут понять биологическую роль MMPs, но и откроют новый терапевтический подход в лечении заболеваний, связанных с неконтролируемой деструкцией внеклеточного матрикса, в том числе ИЛФ.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Важнейшим патогенетическим отличительным признаком ИЛФ является развитие ремоделирования легочной ткани на фоне хронического воспаления в области бронхиоло-альвеолярной переходной зоны, где происходит интенсивная пролиферация SMA-положительных миофибробластов, фибробластов, макрофагов и респираторного эпителия с высокой экспрессией ими PCNA, PDGF, MMPs, а также интенсивный неоангиогенез (высокая

экспрессия CD34 эндотелием новообразованных сосудов) и повышенный уровень апоптоза альвеолоцитов, судя по экспрессии Apo - CAS.

2. На ранней стадии ИЛФ клетки воспалительного инфильтрата вместе с миофибробластами и гипертрофированным эпителием выполняют главную роль в ремоделировании легочной ткани и раннем формировании миофибротических фокусов в области бронхиоло-альвеолярной переходной зоны. На поздней стадии ИЛФ эпителиальные клетки аденоматозных структур вместе с клетками стромы продуцируют различные факторы роста, тем самым усиливают склеротические изменения и неоангиогенез в легочной ткани.

3. Прямые корреляции между уровнем экспрессии MMP-7 и маркером апоптоза Apo-CAS в гиперплазированном эпителии, а также между MMP-2 в клетках стромы и гиперплазированном эпителии и количеством CD34-положительных новообразованных сосудов позволяют выдвинуть предположение о том, что металлопротеиназы также участвуют в ремоделировании легочной ткани при ИЛФ.

### **Апробация работы**

Апробация работы проведена на кафедре патологической анатомии ММА имени И.М. Сеченова (14 апреля 2010 г.) Результаты исследования докладывались и обсуждались на научных конференциях кафедры патологической анатомии ММА имени И.М. Сеченова, на обществе патологоанатомов г. Москвы (28 октября 2008 г.), на итоговых научных конференциях с международным участием «Татьянин день» и Школы молодых исследователей «Достижения молекулярной медицины и разработка новых способов диагностики и лечения болезней человека» (Москва, 2007, 2008), на XVIII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Екатеринбург, 2008), на XXI Европейском Конгрессе по патологии (Стамбул, Турция, 2007), на XVII, XVIII Конгрессах Европейского респираторного общества (Стокгольм, Швеция, 2007; Берлин, Германия 2008), на XIV Интернациональном конгрессе гисто- и цитохимии (Гданьск, Польша, 2008),

на XXVII Интернациональном конгрессе интернациональной Академии патологов (Афины, Греция, 2008), на XXII европейском конгрессе по патологии (Флоренция, Италия, 2009).

### **Публикации.**

По результатам исследования опубликовано 13 работ, из них 2 полнотекстовых статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы о результатах собственного исследования и их обсуждения, общего заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа содержит 106 страниц машинописного текста, а также 9 страниц списка литературы на русском и английском языках. В работе использовано 2 таблиц, 6 схем, 42 рисунков (из них 20 монтажей микрофотографий). Проанализировано 104 источников литературы, в том числе 13 отечественных.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнена на текущем и архивном материале открытых и трансбронхиальных биопсий, полученном от 100 больных ИИП. Больные находились на лечении в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Тареева ММА им. И.М. Сеченова и в клинике факультетской хирургии им. Н.Н. Бурденко ММА им. И.М. Сеченова с 1998 по 2006 г. В соответствии с “золотым стандартом” диагностики ИИП (ATS, ERS, 1999), на основании совокупности клинико-лабораторных, рентгенологических и морфологических данных удалось разделить больных по нозологическим формам: 58 больных ИЛФ (основная группа), 13 больных идиопатической интерстициальной пневмонией (ДИП), 17 больных облитерирующим бронхиолитом с организующейся пневмонией (ОБОП) и 12 больных неспецифической интерстициальной пневмонией (НСИП) (группа

сравнения). Кроме того в качестве контрольной группы мы использовали биопсий нормальных тканей легких, взятых от 10 пациентов с клинически предполагаемым диагнозом саркоидоза (таблица 1).

Таблица 1. Распределение пациентов, включенных в морфологическое и иммуногистохимическое исследование, по группам по нозологическим вариантам ИИП.

Группы		Количество пациентов	Средний возраст	Женщины/ мужчины
Основная группа: ИЛФ		58	51,78 ± 9,92	33/25
Группа сравнения	ДИП	13	56,2 ± 3,87	6/7
	ОБОП	17	55,3 ± 4,5	9/8
	НСИП	12	54,78 ± 5,1	6/6
Контрольная группа: неизменная легочная ткань		10	50,78 ± 5,1	6/4
Всего		110		

Были проанализированы описания макропрепаратов удаленных легких и их частей. Гистологические методы исследования: изучали серийные парафиновые срезы толщиной 4 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, альциановым синим, пикрофуксином по Ван Гизону, ставилась PAS-реакция по общепринятым методикам.

Иммуногистохимический анализ проведен на 24 больных с ранней стадией ИЛФ, 34 больных с поздней стадией ИЛФ (из основной группы) и всех больных в группе сравнения и контрольной группе. Было проведено иммуногистохимическое выявление антигенов в парафиновых срезах иммунопероксидазным методом двойных антител с стрептовидин-биотиновым комплексом (SBK KIT, DAKO) по общей методике. В качестве первичных антител были использованы моноклональные антитела к MMP 1, 2, 7 и TIMP 4, Apo- CAS (Novocastra, в концентрации 1:100), PCNA, PDGF, EGFR, CD34, SMA (Lab Vision, в концентрации 1:100). В качестве вторичных антител применяли биотинилированные антитела к иммуноглобулинам мыши



и кролика (Dako LSAB + KIT, PEROXIDASE). Рабочая концентрация составила 1:200. Ставили позитивные и негативные контрольные реакции.

Результаты иммуногистохимических реакций оценивались в процентах по количеству клеток с позитивным окрашиванием. Уровень ангиогенеза рассчитывали по среднему количеству CD34-положительных новообразованных сосудов в 10 полях зрения при увеличении  $\times 400$ .

Для статистического анализа использованы методы непараметрической статистики: для сравнения выраженности активности изучаемых маркеров в основной и контрольной группах — U-тест Манна-Уитни; для сравнения частоты встречаемости маркеров — точный критерий Фишера (для четырехпольных таблиц сопряженности) и коэффициент ранговой корреляции Спирмена для оценки корреляции между уровнями экспрессии изученных маркеров. Критический уровень значимости различий между группами был принят равным  $p=0,05$ . Во всех случаях использовались двусторонние статистические критерии.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

#### **Морфологическая характеристика ремоделирования легочной ткани, включая бронхиоло-альвеолярную переходную зону, в ходе прогрессирования идиопатического легочного фиброза**

В основной группе были изучены морфологические особенности ИЛФ (ОИП), имеющего стадийность течения и мозаичность расположения патологических фокусов в легочной ткани. Макроскопическая картина легких в начальную стадию ИЛФ незначительно изменена, ткань легкого неравномерно воздушна, полнокровна, с увеличенной плотностью за счет отека интерстиция. Микроскопические проявления начальных изменений при ИЛФ укладываются в картину хронического экссудативно-продуктивного альвеолита с мелкими очаговыми пролифератами SMA-положительных миофибробластов в области БАПЗ (рис.1в). Лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью единичных

полиморфноядерных лейкоцитов в паренхиме и строме респираторных отделов легкого. Отмечено, что основные изменения развиваются одновременно в альвеолах и респираторных бронхиолах, захватывая так называемую БАПЗ (рис. 1 а). ИЛФ отличается от других вариантов ИИП развитием склероза интерстиция респираторных отделов легких уже в самом раннем периоде заболевания. При этом в области БАПЗ можно увидеть первые фокусы пролиферации миофибробластов (рис. 1 в).

Поздняя стадия ИЛФ характеризуется макроскопическими изменениями в виде уплотнения легочной ткани, которая при этом приобретает резиновую плотность, пониженную воздушность и эластичность, вплоть до формирования ячеистых структур, напоминающих пчелиные соты — "сотовое легкое". При микроскопическом исследовании на малом увеличении легочная ткань с цирротическими изменениями в виде сотового легкого в субплевральных отделах. Имеются очаги сохранной легочной ткани и очаги более свежего поражения, располагаются по ходу терминальных бронхиол и в прилежащих альвеолах с лимфомacroфагальной инфильтрацией и отдельными миофибробластическими фокусами с пролиферацией кубического и цилиндрического эпителия бронхиол и альвеол. Интерстиций неравномерно склерозирован и инфильтрирован лимфоплазматочными элементами. Капилляры и сосуды микроциркуляции расширены, полнокровны. Плевра склерозирована, неравномерно инфильтрирована лимфоплазматочными элементами. На большом увеличении кистозные структуры сотового легкого выстланы аденоматозно-гиперплазированным альвеолярным эпителием (рис.1б). Альвеолоциты 1-го типа замещаются гиперплазированными альвеолоцитами 2-го типа с развитием очаговой аденоматозной гиперплазии и атипической аденоматозной гиперплазии, которая встречается в 75% случаях поздних стадий ИЛФ, а также очагами плоскоклеточной метаплазии, дисплазии эпителия. Аденоматозная гиперплазия характеризуется пролиферацией клеток Клара в бронхиолах и альвеолоцитов II типа, выстилающих альвеолы,

больше выражена вокруг очагов пневмосклероза. Видны крупные очаговые пролифераты SMA-положительных миофибробластов, окруженных коллагеновыми волокнами, преимущественно в области БАПЗ (миофибробластические фокусы, которые являются кардинальным признаком ОИП). Местами обнаруживаются признаки атипической аденоматозной гиперплазии: увеличение размеров эпителиальных клеток, появление признаков клеточного и ядерного полиморфизма.

При исследовании морфологических особенностей других нозологических форм ИИП (ДИП, ОБОП и НИП) в группе сравнения были отмечены, что главным морфологическим отличием ДИП является содержание значительного количества альвеолярных макрофагов и десквамизированных клеток в просвете альвеол и слабо выраженный интерстициальный фиброз. При ОБОП хроническое воспаление обнаруживается на уровне терминальных бронхиол, в процессе вовлекаются как бронхиолярная эпителиальная выстилка, так и перибронхиолярный интерстиций. При НСИП наблюдается картина хронического воспаления в основном в межальвеолярном интерстиции с лимфогистиоцитарной инфильтрацией.

Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают, что морфологическим маркером ремоделирования легочной ткани при ИЛФ, в отличие от других вариантов ИИП, является развитие хронического фиброзирующего воспаления, преимущественно в области БАПЗ с формированием типично для ИЛФ миофибробластических фокусов в самом раннем периоде заболевания.

### **Иммуногистохимические особенности экспрессии биомаркеров в респираторных отделах легкого, включая бронхиоло-альвеолярную переходную зону при ИЛФ**

Для выявления особенностей ремоделирования легочной ткани при ИЛФ было проведенное иммуногистохимическое исследование экспрессии биомаркеров в основной группе (с ИЛФ), группе сравнения (с ДИП, ОБОП,

НСИП) и контрольной группе (нормальная легочная ткань) на каждом уровне респираторного отдела легкого, который условно разделен на три зоны: зону бронхиол и перибронхиолярной ткани; бронхиоло-альвеолярную переходную зону; и зону альвеол и межальвеолярной ткани. При этом установлено отсутствие или очень низкая степень экспрессии всех изученных маркёров во всех зонах респираторных отделов нормальной легочной ткани в контрольной группе.

В основной группе было отмечено, что ИЛФ в отличие от других вариантов ИИП характеризовался более высокой степенью экспрессии всех изученных маркёров в ткани легких, преимущественно в области БАПЗ (рис.2). Ниже представлены особенности экспрессии каждого изученного маркера в респираторных отделах легкого при ИЛФ.

**PCNA** (ядерный антиген пролиферирующих клеток) визуализируется в виде интенсивного коричневого окрашивания ядер и цитоплазмы эпителиальных клеток аденоматозных структур ( $62,50\% \pm 13,09\%$ ;  $P < 0,05$ ) и макрофагов ( $42,50\% \pm 13,45\%$ ;  $P < 0,05$ ) в области БАПЗ (рис. 1г). В остальных клетках переходной зоны (в фибробластах, миофибробластах и эндотелии новообразованных сосудов в очагах ангиогенеза) PCNA присутствует в умеренной степени. Экспрессия PCNA в легочной ткани у больных ИЛФ на уровне бронхиол и альвеол не отличается от таковой в контрольной нормальной легочной ткани (рис.2).

**PDGF** (тромбоцитарный фактор роста) также выявляется в виде интенсивного коричневого окрашивания ядер и цитоплазмы, который в отличие от PCNA, высоко экспрессируется не только в эпителиальных клетках БАПЗ, но и в клетках окружающей стромы: в фибробластах ( $40,00\% \pm 10,74\%$ ;  $P < 0,05$ ), миофибробластах ( $42,50\% \pm 12,33\%$ ;  $P < 0,05$ ) и в эндотелии новообразованных сосудов в очагах неоангиогенеза ( $50,00\% \pm 6,20\%$ ;  $P < 0,05$ ) (рис. 2).

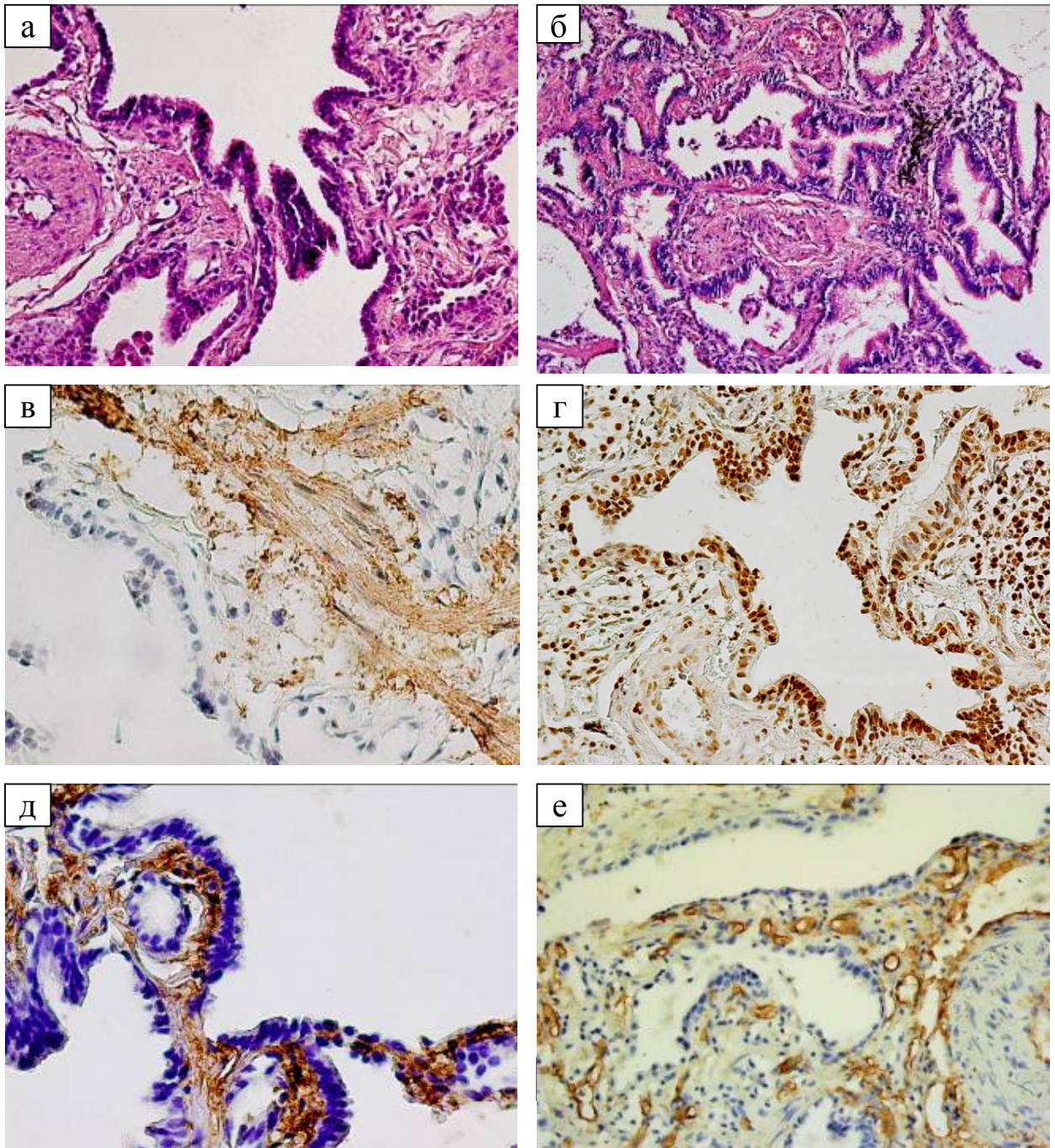


Рисунок 1. Ремоделирование легочной ткани на ранней и поздней стадиях ИЛФ. Иммунопероксидазная реакция с ДАБ на парафиновых срезах. x200

а- ремоделирование легочной ткани в области бронхиоло-альвеолярной переходной зоны (БАПЗ) на ранней стадий ИЛФ (окраска гематоксилином и эозином. x200).

б-аденоматозная структура на поздней стадии ИЛФ (окраска гематоксилином и эозином. x200).

в-SMA в миофибробластах миофибротического фокуса в области БАПЗ на ранней стадии.

г-экспрессия PCNA в гиперплазированном эпителии и клетках стромы на поздней стадии ИЛФ.

д-MMP-2 в области базальной мембраны респираторного эпителиа и сосудов и в цитоплазме клеток стромы переходной зоны на ранней стадии ИЛФ.

е- экспрессия CD34 в эндотелии новообразованных сосудов на поздней стадии ИЛФ.



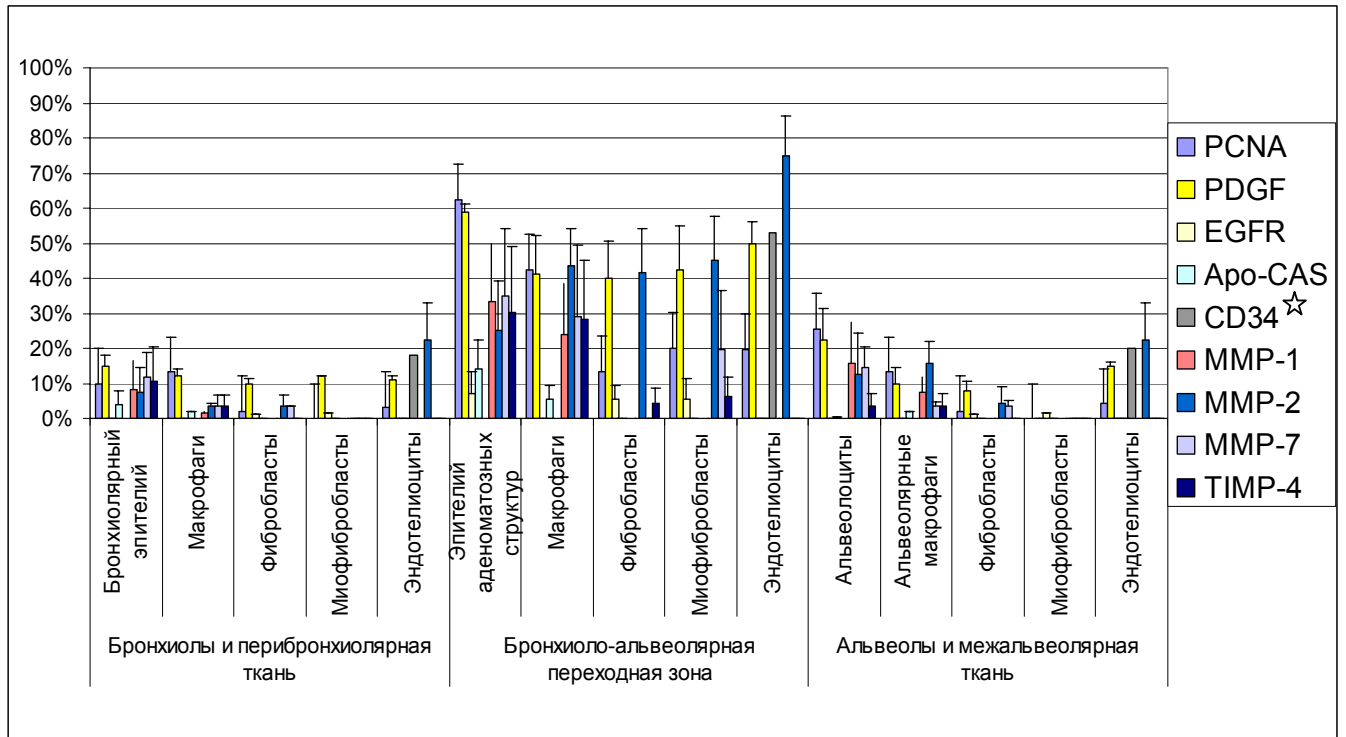


Рисунок 2. Гистограмма среднего уровня экспрессии изученных маркеров в легочной ткани при ИЛФ с преимущественной экспрессией в БАПЗ.

☆ Уровень ангиогенеза рассчитывали по количеству сосудов с CD34 положительным эндотелием в 10 полях зрения при увеличении x 400.

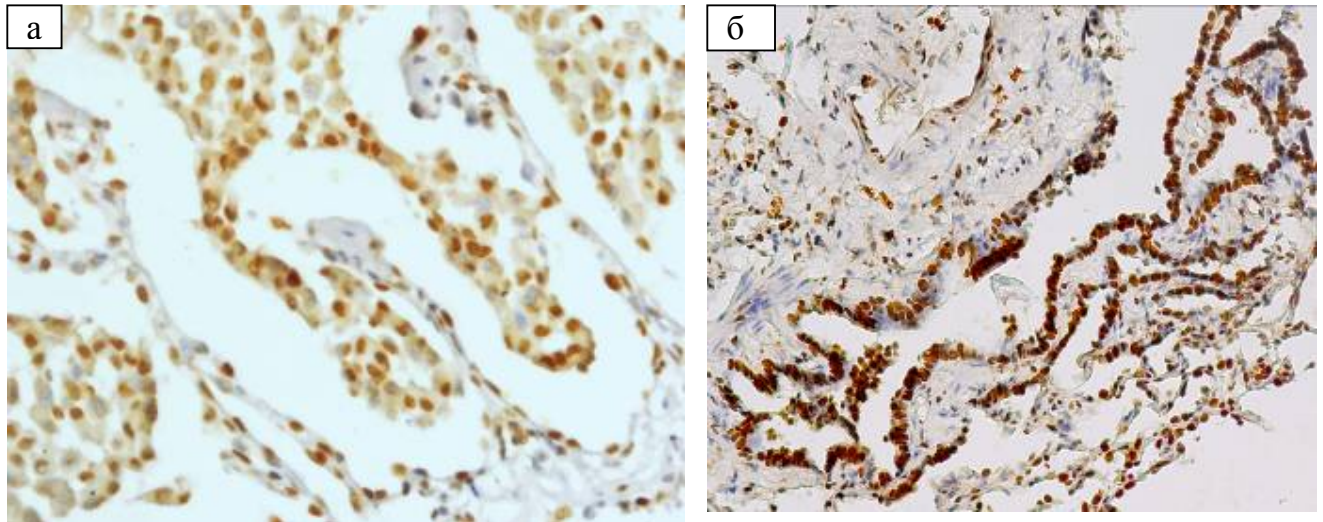


Рисунок 3. Ремоделирование легочной ткани при других нозологических формах идиопатических интерстициальных пневмоний. Иммунопероксидазная реакция с ДАБ на парафиновых срезах.

а- повышенная экспрессия PCNA в гиперплазированных альвеолоцитах и альвеолярных макрофагах при ДИП. x400.

б- высокий уровень экспрессии PCNA в бронхиолярном эпителии и клетках перибронхиолярной стромы при БООП. x200.

**EGFR** (рецептор эпидермального фактора роста) обнаружен на мембране не только клеток эпителиального происхождения, но и клеток стромы в области БАПЗ на стадии сотового легкого (рис. 2). По нашему мнению наличие EGFR-положительных миофибробластов и фибробластов при ИЛФ обусловлено фенотипической изменчивостью этих клеток в процессе ремоделирования легочной ткани, что согласно мнению ряда авторов является результатом дифференцировки миофибробластов из эпителиальных клеток путем эпителиально-мезенхимальной транзиции.

**Apo-CAS** (apo-протеин, кодируемый геном клеточной апоптической чувствительности) обнаруживается в ядрах гиперплазированных клеток БАПЗ: в эпителии аденоматозных структур ( $14,06\% \pm 8,26\%$ ;  $P < 0,05$ ) и макрофагах ( $5,60\% \pm 3,92\%$ ;  $P < 0,05$ ). Уровень Apo-CAS в других локализациях респираторных отделов легочной ткани не отличается от контрольной нормы (рис. 2). По нашим данным повышенная готовность альвеолярного и бронхиолярного эпителия к апоптозу отмечается в переходной зоне. В тоже время признака апоптоза SMA-положительных миофибробластах отсутствует.

**CD34** неравномерно окрашивает эндотелий сосудов легочной ткани при ИЛФ, который локализуется преимущественно в области БАПЗ, рядом с аденоматозными структурами и вокруг очагов пневмосклероза (рис. 1е, 2). Результаты нашего исследования подтверждают гетерогенность расположения очагов неоангиогенеза, которые преимущественно расположены вокруг очагов аденоматоза в области БАПЗ. В тоже время низкая васкуляризация наблюдается в очагах фиброза и миофибротических фокусов.

Таким образом, ИЛФ отличается преобладанием поражения на уровне БАПЗ, где происходит интенсивная пролиферация эпителия и клеток стромы с высокой экспрессией PCNA, PDGF гиперплазированными эпителиальными клетками, макрофагами, фибробластами и миофибробластами, а также интенсивный неоангиогенез и повышенный уровень апоптоза альвеолоцитов.

**ММР-2** выявлена в виде коричневого окрашивания в цитоплазме клеток стромы и области базальной мембраны (БМ) респираторного эпителия и сосудов в области БАПЗ. Высокая экспрессия ММР-2 обнаруживается в макрофагах ( $63,54\% \pm 10,42\%$ ;  $P < 0,05$ ), фибробластах ( $75,00\% \pm 12,65\%$ ;  $P < 0,05$ ) и эндотелиоцитах в очагах ангиогенеза ( $75,00\% \pm 11,16\%$ ;  $P < 0,05$ ), а также в эпителии аденоматозных структур. Миофибробласты субэпителиальных очагов в области БАПЗ позитивны только для ММР-2 ( $61,46\% \pm 12,55\%$ ;  $P < 0,05$ ) (рис.1д). В тоже время, эпителиальные и стромальные клетки легочной ткани на уровне бронхиол и альвеол либо не окрашены, либо окрашены на низком уровне (рис.2). Выраженная экспрессия ММР-2 в области БМ эпителия и сосудов переходной зоны свидетельствует о способности ММР-2 разрушать коллаген IV типа в БМ.

**ММР-1** экспрессируется в умеренной степени ( $33,33\% \pm 16,33\%$ ) в цитоплазме гиперплазированного эпителия аденоматозных структур и несколько ниже в цитоплазме макрофагов ( $23,96\% \pm 14,29\%$ ) в области бронхиоло-альвеолярной переходной зоны. Альвеолярный и бронхиолярный эпителий также продуцируют ММР-1, но в слабой степени (рис. 2). ММР-1, синтезируемая гиперплазированным эпителием и макрофагами в области БАПЗ, может играть роль в миграции эпителиальных клеток, необходимой для процесса реэпителизации

**ММР-7**, в основном, обнаружена в цитоплазме эпителиальных клеток БАПЗ, особенно в гиперплазированном эпителии аденоматозных структур ( $28,13\% \pm 19,26\%$ ;  $P < 0,05$ ), в макрофагах ( $29,17\% \pm 20,11\%$ ;  $P < 0,05$ ) и в миофибробластах переходной зоны. Экспрессия ММР-7 в легочной ткани у больных ИЛФ на уровне бронхиол и альвеол не отличается от тех в контрольной нормальной легочной ткани (рис. 2)

**ТИМР-4:** гиперплазированный эпителий и макрофаги в области БАПЗ являются основными источниками ТИМР-4, которая присутствует и в других эпителиальных и стромальных клетках но в слабой степени (рис. 2).



Таким образом, избыточная продукция MMP 1, 2, 7 и относительная недостаточность TIMP-4 в области БАПЗ приводит к дисбалансу между MMPs и TIMPs и глубокой необратимой деструкции легочной ткани в этой зоне.

В группе сравнения ДИП характеризуется повышением экспрессии PCNA, PDGF, а также Aro-CAS гиперплазированными альвеолоцитами и альвеолярными макрофагами в легочной ткани в зоне альвеол по сравнению с вышележащими зонами в респираторных отделах легкого (рис.3а). Интенсивное новообразование сосудов также в основном видно в межальвеолярных зонах. MMPs также преимущественно экспрессируются в зоне альвеол и межальвеолярной ткани с умеренной активностью MMP-2 в клетках стромы и умеренной активностью MMP1 и 7 в альвеолоцитах и альвеолярных макрофагах.

ОБОП отличается тем, что повышенная экспрессия изученных маркеров наблюдается преимущественно в бронхиолах и перибронхиолярной ткани, а также в эпителии на поверхности телец Массона. Бронхиолярный эпителий, а также макрофаги и, в меньшей степени, фибробласты телец Массона имеют высокий уровень экспрессии PCNA (рис.3 б), PDGF. Высокая плотность новообразованных сосудов с экспрессией CD34 эндотелием свидетельствует о высокой интенсивности ангиогенеза в этой зоне. Пролиферация клеток и неоангиогенез обеспечиваются экспрессией MMPs как в эпителии бронхиол, так и в тельцах Массона.

При НСИП наблюдается низкая активность всех изученных маркёров, экспрессия которых преимущественно регистрируется в интерстициальных макрофагах зоны межальвеолярной интерстициальной ткани.

Таким образом, ИЛФ в отличие от других нозологических вариантов ИИП характеризуется ремоделированием легочной ткани преимущественно в области БАПЗ. Полученные данные позволяют высказать предложение, что при ИЛФ страдает в первую очередь БАПЗ, являющаяся нишей стволовых клеток, где происходит созревание клеток и стыкуются разные виды

эпителия. Смена структур приводит к тому, что такая зона становится «locus minoris resistenciae». Это наблюдается и в пищеводе, и в шейке матки, и в других местах, в том числе и в БАПЗ. Выраженная экспрессия MMP-2 в области БМ эпителия и сосудов переходной зоны свидетельствует о способности MMP-2 разрушать коллаген IV типа в БМ. Повреждение БМ эпителия и сосудов и нарушение ее цельности является ключевым моментом в инициации ремоделировании легочной ткани при ИЛФ, так как из общей патологии известно, что если страдает базальная мембрана, то, как правило, репарация носит характер субституции и при этом развивается дисрегенерация эпителия. Это наблюдается и в бронхиоло-альвеолярной переходной зоне. Гиперплазия эпителия является проявлением дисрегенерации в связи с повреждением базальной мембраны, а гетерогенная повышенная васкуляризация придает гиперплазии аденоматозный характер.

#### **Сравнение особенностей ремоделирования легочной ткани на ранней и поздней стадиях ИЛФ**

В ходе проведенного исследования установлено, что степень экспрессии MMP-1, 2, 7 и TIMP-4 в эпителиальных клетках, макрофагах, фибробластах и миофибробластах на ранней стадии ИЛФ была выше, чем на поздней стадии (рис.4). Данное повышение более заметно в эпителиальных клетках со статистически достоверным повышением экспрессии MMP-1 ( $43,33\% \pm 6,09\%$  окрашенных клеток), MMP-2 ( $41,67\% \pm 6,59\%$ ) (рис.1д), MMP-7 ( $44,44\% \pm 7,95\%$ ) и TIMP-4 ( $46,30\% \pm 6,35\%$ ) в гиперплазированном эпителии на ранней стадии по сравнению с поздней стадией заболевания.

Поздняя стадия ИЛФ характеризуется повышенным уровнем экспрессии PCNA, PDGF, EGFR во всех клетках легочной ткани по сравнению с ранней стадией заболевания. Данное повышение более заметно в клетках стромы переходной зоны со статистически достоверным повышением экспрессии PCNA ( $24,00\% \pm 0,75\%$  vs  $8,50\% \pm 0,65\%$ ) (рис.1г), PDGF ( $80,00\% \pm 7,64\%$  vs  $55,56\% \pm 7,95\%$ ) в миофибробластах на поздней стадии по сравнению с ранней стадией заболевания (рис. 4).

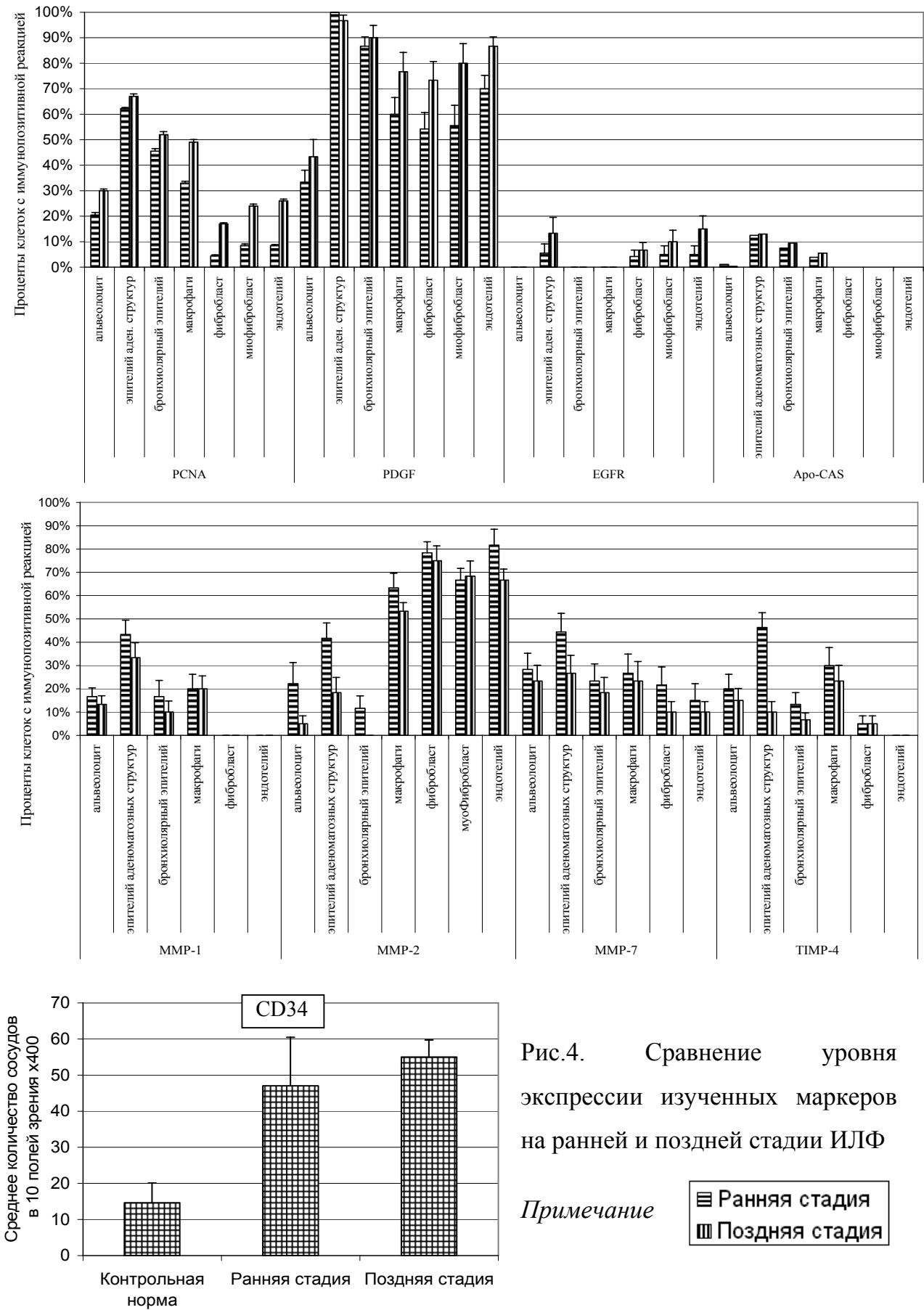


Рис.4. Сравнение уровня экспрессии изученных маркеров на ранней и поздней стадии ИЛФ

Примечание ▨ Ранняя стадия  
▩ Поздняя стадия

Полученные данные свидетельствуют о том, что коллагенсекретирующие  $\alpha$ -SMA-позитивные миофибробласты вместе с гиперплазированными эпителиальными и эндотелиальными клетками на ранней стадии ИЛФ продуцируют MMPs, которые разрушают базальную мембрану и дополнительно привлекают клетки воспалительного инфильтрата к месту повреждения. Клетки воспалительного инфильтрата активируются и начинают секрецию профиброгенных цитокинов и факторов роста, в том числе PDGF, что приводит к активации макрофагов и фибробластов. Активированные фибробласты трансформируются в  $\alpha$ -SMA-положительные миофибробласты по мере миграции вдоль фибриновой сетки к месту повреждения, где становятся центральными клетками, продуцирующими дополнительные профиброгенные факторы (факторы роста, ангиогенные факторы, протеазы, включая MMPs). Эти факторы, с одной стороны, приводят к продолжающему повреждению и хроническому персистирующему воспалению, а с другой стороны, вызывают чрезмерное накопление компонентов ВКМ и избыточный синтез коллагена миофибробластами. В результате этого нормальная ткань легкого замещается постоянной рубцовой тканью. Интерстициальный склероз приводит к нарушению регенерации эпителия в респираторных отделах легкого и может способствовать развитию дисплазии эпителия, а в дальнейшем и рака легкого.

Анализируя экспрессию Aro-CAS, необходимо отметить, что признаки готовности альвеолярного и бронхиолярного эпителия БАПЗ к апоптозу обнаружены как на ранней, так и на поздней стадии ИЛФ, в тоже время экспрессия Aro-CAS в SMA-положительных миофибробластах отсутствует (рис.4). Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе повреждения и репарации легочной ткани миофибробласты приобретают апоптоз-резистентный фенотип и способность к персистенции в ткани легких. Статистически достоверная прямая корреляция между уровнем экспрессии PCNA в миофибробластах и уровнем экспрессии Aro-CAS в

гиперплазированных альвеолоцитах как на ранней ( $r_s = 0,7$ ;  $P < 0,05$ ), так и на поздней стадии ИЛФ ( $r_s = 0,67$ ;  $P < 0,05$ ), косвенно свидетельствует о том, что миофибробластические фокусы, участвуя в апоптозе рядом лежащих альвеолоцитов, могут быть ключевым фактором в прогрессировании фиброза легких от ранней до поздней стадии ИЛФ.

Результаты нашего исследования показали, что хотя различие в плотности новообразованных сосудов на ранней и поздней стадии ИЛФ статистически не достоверно, имеется тенденция к повышению плотности новообразованных сосудов на поздней стадии заболевания по сравнению с ранней (57 и 47, соответственно) (рис. 4). Уровень ангиогенеза на более поздней стадии ИЛФ повышается в области аденоматозных структуры и снижается в очагах фиброза и миофибробластических фокусах. Интенсивный неоангиогенез в области аденоматозных структур при ИЛФ, с одной стороны является ответом на гипоксию ткани легких вследствие прогрессирующего фиброгенеза, а с другой стороны, способствует возникновению аденоматозных структур из гиперплазированного эпителия БАПЗ путем их кровоснабжения.

### **Корреляционный анализ экспрессии матриксных металлопротеиназ и маркеров апоптоза и неоангиогенеза при ИЛФ**

С помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена была обнаружена статистически достоверная прямая корреляция между уровнями экспрессии MMP-7 и Apo-CAS в гиперплазированном эпителии аденоматозных структур при ИЛФ как на ранней ( $r_s = 0,8$ ;  $P < 0,01$ ), так и на поздней стадии ( $r_s = 0,92$ ;  $P < 0,001$ ), что может свидетельствовать об участии MMP-7 в активации апоптоза альвеолоцитов.

Мы также установили, что на поздней стадии ИЛФ количество CD34-положительных новообразованных сосудов прямо коррелирует с уровнями экспрессии MMP-2 в фибро/миофибробластах ( $r_s = 0,95$ ;  $P < 0,001$ ), гиперплазированном эпителии ( $r_s = 0,71$ ;  $P < 0,05$ ), макрофагах ( $r_s = 0,66$ ;  $P < 0,05$ ) и эндотелиоцитах ( $r_s = 0,67$ ;  $P < 0,05$ ). Однако данных корреляций не было

установлено на ранней стадии заболевания. Наши результаты соответствуют данным литературы о роли MMPs в ангиогенезе. Протеазы, включая MMP-2, посредством протеолитической активности, участвуют в деградации эндотелиальной базальной мембраны, миграции эндотелиальных клеток, и создании пространства для формирования просвета сосудов, которые необходимы для ангиогенеза.

**Выводы:**

1. Морфологическим маркером ремоделирования легочной ткани при ИЛФ, в отличие от других вариантов идиопатических интерстициальных пневмоний, является наличие миофибробластических фокусов, располагающихся преимущественно в области бронхиоло-альвеолярной переходной зоны и построенных из пролиферирующих SMA-положительных миофибробластов, экспрессирующих PCNA, PDGF, EGFR и MMP-2.
2. Ремоделирование легочной ткани при прогрессировании ИЛФ от ранней до поздней стадии заболевания включает в себя хроническое воспаление с репаративной реакцией, неоангиогенезом, апоптозом и пролиферацией респираторного эпителия, а также миофибробластов, развивающееся преимущественно в бронхиоло-альвеолярной переходной зоне.
3. Ранняя стадия морфологических изменений при ИЛФ характеризуется наличием деструктивно-пролиферативных изменений в области бронхиоло-альвеолярной переходной зоны, включающих повышенный уровень апоптоза альвеолярного и бронхиолярного эпителия, интенсивный неоангиогенез, пролиферацию миофибробластов, а также высокую экспрессию матриксных металлопротеиназ в клетках стромы и гиперплазированном эпителии.
4. Поздняя стадия морфологических изменений при ИЛФ характеризуется нарастанием пролиферативных изменений респираторного эпителия и миофибробластов с высоким уровнем экспрессии PCNA, PDGF, EGFR во всех клетках легочной ткани, особенно в переходной зоне, а также высоким уровнем неоангиогенеза. Усиление склеротических изменений легочной ткани на этой стадии происходит не только за счет пролиферации клеток

стромы и синтеза коллагена, но и в связи с относительным снижением уровня деградации внеклеточного матрикса, судя по экспрессии матриксных металлопротеиназ.

5. Миофибробласты как центральные клетки прогрессирования фиброза легких при ИЛФ отличаются апоптоз-резистентным фенотипом, что обеспечивает их персистенцию в легочной ткани, продукцию коллагена и регуляторное воздействие на другие клетки легочного ацинуса, включая респираторный эпителий.

6. Прямые корреляции между уровнем экспрессии MMP-7 и маркером апоптоза Apo-CAS в гиперплазированном эпителии, а также между MMP-2 в клетках стромы и гиперплазированном эпителии и количеством CD34-положительных новообразованных сосудов позволяют выдвинуть предположение о том, что матриксные металлопротеиназы также участвуют в ремоделировании легочной ткани при ИЛФ.

7. Полученные данные морфологических и иммуногистохимических характеристик ремоделирования легочной ткани, включая бронхиоло-альвеолярную переходную зону при ИЛФ могут быть использованы в проведении ранней морфологической дифференциальной диагностики ИЛФ с другими нозологическими вариантами идиопатических интерстициальных пневмоний на биопсийном и аутопсийном материале легких, а также в разработках новых подходов в прогнозировании течения, профилактики и таргетной терапии ИЛФ.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Коган Е. А., Тьонг Ф. В., Демура С.А. Молекулярные основы формирования вариантов идиопатического фиброзирующего альвеолита // Архив патологии. – 2009. – №1, том 71. – Стр. 12-18.
2. Тьонг Ф.В., Демура С.А.. Идиопатический легочный фиброз: патогенетический обоснования новых методов лечения / Материалы Итоговой научной студенческой конференции и международным участием / Москва:2007, с.2
3. Тьонг Ф. В., Коган Е. А., Демура С. А. Роль матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в патогенезе идиопатического фиброзирующего альвеолита. Сборник тезисов Анналы факультета подготовки научно-педагогических кадров ММА им. И. М. Сеченова – Москва 2007.
4. Тьонг Ф. В. Роль ремоделирования легочной ткани в бронхиоло-альвеолярной переходной зоне в патогенезе идиопатического легочного фиброза./ Материалы Итоговой научной студенческой конференции и международным участием / Москва:2009, с.139.
5. Tuong Vuong, Demoura Sophia, Kogan Evguenia. Markers of cell proliferation, apoptosis and angiogenesis in Remodeling of bronchoalveolar duct junctions/ Polish Histochemical et Cytological Society. Folia Histochemica et Cytobiologica,2008: Vol 46.Suppl.2: S62: P2.10.
6. Kogan E. , Tuong V. , Demoura S. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in Remodeling of bronchoalveolar duct junctions // Polish Histochemical et Cytological Society. Folia Histochemica et Cytobiologica,2008: Vol 46.Suppl.2: S98: P3.44.
7. Kogan E, Tuong V, Demoura S. Initiating morphological and molecular events at bronchoalveolar duct junctions in progression of idiopathic pulmonary fibrosis// Histopathology, 2008, Vol. 53 (Suppl. 1):P : 350-351.
8. Tuong V, Demoura S, Kogan E. Relationship between metalloproteinases, their tissue inhibitors and markers of apoptosis, proliferation, neoangiogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis.// Histopathology, 2008, Vol. 53 (Suppl. 1): P: 365.
9. Kogan E., Tuong V., Demoura S. MMPs and TIMP- 4 in remodeling of extracellular matrix, fibrosis, cell proliferation in different variants of idiopathic chronic interstitial pneumonias// Virchows archive, 2007, Vol. 451, №2: OP21-5.



10. Kogan E., Tuong V., Demoura S. Matrix metalloproteinases and angiogenesis in lung tissue remodeling in different variants of idiopathic interstitial pneumonia// European Respiratory journal, 2007, Vol.30, Suppl.51: P905.
11. Demoura S., Tuong V., Kogan E. Apoptosis, cell proliferation and angiogenesis in progression of different variants of idiopathic interstitial pneumonia // European Respiratory journal, 2007, Vol.30, Suppl.51: P3405.
12. Kogan E., Tuong V., Demoura S. Mechanism of bronchoalveolar duct junction (BADJ) remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) as base for new pathogenetic therapy//European Respiratory journal, 2008, Vol.32, Suppl.52:P:3489.
13. Tuong, V. P.; Demoura, S.; Kogan, E. Molecular events at early and late stages of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)// Virchows archive, 2009, Vol. 455 (suppl 1): OP1.

### **Список сокращений**

PCNA — ядерный антиген пролиферирующих клеток

PDGF — тромбоцитарный фактор роста

EGFR — рецептор эпидермального фактора роста

Аро-CAS — аро-протеин, кодируемый геном клеточной апоптотической чувствительности

MMPs — матриксные металлопротеиназы

TIMPs — тканевые ингибиторы металлопротеиназ

SMA — актин гладкой мышцы

БАПЗ — бронхиоло-альвеолярная переходная зона

БМ — базальная мембрана

ВКМ — внеклеточный матрикс

ИИП — идиопатические интерстициальные пневмонии

ИЛФ — идиопатический легочный фиброз

ОИП — обычная интерстициальная пневмония

ДИП — десквамативная интерстициальная пневмония

НСИП — неспецифическая интерстициальная пневмония

ОБОП — облитерирующий бронхиолит с организующейся пневмонией

ТФР-β — трансформирующий фактор роста β