

С.В. Коваленко<sup>1</sup>, А.Е. Дорофєєв<sup>2</sup>, І.В. Василенко<sup>2</sup>, І.С. Давиденко<sup>1</sup>

## Особливості імуногістохімічних змін клітинного інфільтрату (вмісту муцинів MUC 2, 3, 4) в слизовій оболонці бронхів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень

<sup>1</sup>Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці,

<sup>2</sup>Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

**Ключові слова:** муцини, слизові оболонки бронхів, запалення.

Вперше проведено імуногістохімічне вивчення експресії муцинів за допомогою первинних моноклональних антитіл до антигенів протеїнів MUC-2, MUC-3, MUC-4 в покривному епітелії, келихоподібних клітинах, епітелії слизових залоз і веретеноподібних клітинах стромы слизової оболонки бронхів хворих на хронічне обструктивне захворювання легень під час інфекційного та неінфекційного загострення. Встановлено, що при загостренні хронічного обструктивного захворювання легень у різних типах епітеліальних клітин слизової оболонки бронхів відбувається різного ступеня вираженості зниження експресії антигенів MUC-2 і MUC-3. Виявлена експресія антигенів MUC-2 і MUC-3 у веретеноподібних клітинах стромы (фібробластах) при загостренні хронічного обструктивного захворювання легень дозволяє засвідчити факт епітеліально-мезенхімальної трансформації, зокрема зміну якості трансформованих епітеліальних клітин, у зв'язку з чим вони по-іншому, порівняно зі звичайними епітеліальними клітинами, реагують на молекулярні фактори, що відіграють роль у розвитку запального процесу та прогресуванні фіброзу при хронічному обструктивному захворюванні легень.

### Особенности иммуногистохимических изменений клеточного инфильтрата (содержание муцинов MUC 2, 3, 4) в слизистой оболочке бронхов больных хроническим обструктивным заболеванием легких

С.В. Коваленко, А.Э. Дорофеев, И.В. Василенко, И.С. Давиденко

Впервые проведено иммуногистохимическое изучение экспрессии муцинов с помощью первичных моноклональных антител к антигенам протеинов MUC-2, MUC-3, MUC-4 в покровном эпителии, бокаловидных клетках, эпителии слизистых желез и веретеноподобных клетках стромы слизистой оболочки бронхов больных хроническим обструктивным заболеванием легких во время инфекционного и неинфекционного обострения. Установлено, что при обострении хронического обструктивного заболевания легких в различных типах эпителиальных клеток слизистой оболочки бронхов происходит различной степени выраженности снижение экспрессии антигенов MUC-2 и MUC-3. Обнаружена экспрессия антигенов MUC-2 и MUC-3 в веретеноподобных клетках стромы (фибробластах) при обострении хронических обструктивных заболеваний легких позволяет засвидетельствовать факт эпителиально-мезенхимальной трансформации, а именно изменение качества трансформированных эпителиальных клеток, в связи с чем они по-другому, в сравнении с обычными эпителиальными клетками, реагируют на молекулярные факторы, играющие роль в развитии воспалительного процесса и прогрессировании фиброза при хронических обструктивных заболеваниях легких.

**Ключевые слова:** муцины, слизистые оболочки бронхов, воспаление.

*Патология.* – 2013. – №1 (27). – С. 31–34

### Specific characteristics of immunohistochemical changes of the cellular infiltrate (the content of mucins MUC 2, 3, 4) in the mucous tunic of the bronchi in patients with chronic obstructive pulmonary disease

S.V. Kovalenko, A.E. Dorofeev, I.V. Vasilenko, I.S. Davidenko

For the first time immunohistochemical study of the expression of mucins has been carried out using primary monoclonal antibodies to the antigens of proteins MUC-2, MUC-3, MUC-4 in the integumentary epithelium, goblet cells, the epithelium of the mucous glands and the fusiform cells of the stroma 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 the decrease of the expression of MUC2 and MUC3 antigens of various degree of manifestation occurs during an exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in different types of epithelial cells of the mucous tunic of the bronchi. Revealed expression of antigens MUC2 and MUC3 in the fusiform cells of the stroma (fibroblasts) during a COPD exacerbation enables to confirm the fact of an epithelial-mesenchymal transformation, namely, the change of transformed epithelial cells quality; as a result they react in another way in comparison with ordinary epithelial cells on molecular factors which play a certain role in the development of inflammatory process and progression of fibrosis in COPD.

**Key words:** mucins, mucous tunic of the bronchi, inflammation.

*Pathologia.* 2013; №1 (27): 31–34

**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 [6].

Дослідження функції муцинів можуть пояснити деякі клітинні механізми прогресування запалення дихальних шляхів (ДШ) [9]. Зміни виробництва муцинів і 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 [1,5].

Нині відомо, що запальні медіатори імунної відповіді активують генну регуляцію муцину і ремодуляцію ДШ, в тому числі клітинну гіперплазію [11]. Вивчення функціональної ролі муцинів на молекулярному рівні має важливе значення для подальших досліджень, що впливатимуть на запобігання прогресування та лікування таких захворювань, як ХОЗЛ і БА [12].

#### Мета роботи

Комплексне вивчення імуногістохімічних змін клітинного інфільтрату за вмістом муцинів MUC 2, 3, 4 у слизовій оболонці (СО) бронхів при ХОЗЛ.

#### Матеріали і методи дослідження

Виконано аналіз 30 історій хвороби пацієнтів із загостренням ХОЗЛ, які перебували на стаціонарному лікуванні у пульмонологічному відділенні обласної клінічної лікарні м. Чернівці. З метою визначення ступеня та характеру запалення бронхів всім хворим проводили фібробронхоскопію (ФБС) за допомогою фібробронхоскопа Olympus. У зв'язку з необхідністю збереження для імуногістохімічних досліджень цілісності антигенів у структурах бронхів виконували прижиттєву біопсію СО бронхів за загальноприйнятною методикою.

Рівень біопсії – шпори сегментарних бронхів. Під час фібробронхоскопії спеціальними щипцями забирали шматочки стінки бронху з макроскопічно змінених ділянок. Висікали шматочки тканини, що містив лише слизову та підслизову оболонки, не травмуючи хрящові кільця. Свіжий матеріал фіксували протягом 22 годин у нейтральному забуференому 10% водному розчині формаліну, після чого здійснювали зневоднювання у висхідній батареї етанолу і заливку в парафін. З парафінових блоків на санному мікросомі виготовляли зрізи

5 мкм завтовшки. Парафінові зрізи монтували на неімунногенні 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 і системи візуалізації Dako EnVision+System, Peroxidase (AEC).

Інтенсивність забарвлення (оптична густина) оцінено 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).

Обстежені хворі розподілені на 2 групи: I група – 14 пацієнтів з ХОЗЛ III стадії без ознак інфекційного загострення; II група – 16 хворих на ХОЗЛ та з ознаками інфекційного загострення I типу за Антонісеном та стадії III [4]. Серед хворих I групи жінок було 6 (42,8%), II групи – 7 (43,75%). За ставленням до тютюнокуріння хворі I групи розподілись так: 11 – активні курці в минулому, 3 – залишились ними і дотепер, стаж куріння – 41,2±5,1 роки. Індекс «пачка/рік» становив 29,5±2,4 роки. Середній показник ОФВ<sub>1</sub> у пацієнтів I групи становив 38,9±4,3% до належної величини. Другу групу склали 16 хворих на ХОЗЛ, середній вік 65,4±4,3 роки. Середня тривалість захворювання – 18,3±1,7 роки. Активних курців – 5 осіб, у минулому – 15. Середній показник ОФВ<sub>1</sub> у пацієнтів I групи складав 37,6±2,7% від належних.

#### Результати та їх обговорення

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

Таблиця 1

**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 ( $X \pm s$ )**

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±0,010	Не визначається	P не обраховано
MUC-2 / келихоподібні клітини	0,247±0,016	0,196±0,015	P<0,05
MUC-2 / епітелій слизових залоз	0,212±0,018	0,103±0,008	P<0,01
MUC-2 / MUC-2-позитивні веретеноподібні клітини строми	0,208±0,025	0,206±0,028	P>0,05
MUC-3 / покривний епітелій	0,201±0,021	0,049±0,006	P<0,001
MUC-3 / келихоподібні клітини	Не визначається	Не визначається	P не обраховано
MUC-3 / епітелій слизових залоз	0,192±0,009	0,065±0,007	P<0,001
MUC-3 / MUC-3-позитивні веретеноподібні клітини строми	0,286±0,024	0,289±0,028	P>0,05
MUC-4 / будь-які структури	Не визначається	Не визначається	P не обраховано

Експресію антигену MUC-3 відзначено в покривному епітелії бронхів з вираженістю від середньої до слабкої з середніми цифрами оптичної густини забарвлення  $0,201 \pm 0,021$  ум.од.опт.густини. Максимальну експресію антигену MUC-3 в покривному епітелії бронхів показано на *рис. 3, кольор. вкладка 2*.

У келихоподібних клітинах експресію антигену MUC-3 не визначено. У слизових залозах експресія MUC-3 відсутня у більшості клітин, а в тих клітинах, в яких вона є (*рис. 4, кольор. вкладка 2*), її можна оцінити як помірну з середніми показниками оптичної густини забарвлення  $0,192 \pm 0,009$  ум.од.опт.густини.

У строми бронхів експресія MUC-3 визначається у веретеноподібних клітинах під субепітеліальною базальною мембраною (*рис. 3, кольор. вкладка 2*) з вираженістю від помірної до сильно вираженої з середніми показниками оптичної густини забарвлення  $0,286 \pm 0,024$  ум.од.опт.густини.

Щодо MUC-4 слід зазначити, що в здійснених дослідженнях експресія цього антигену, як правило, не визначено в жодній структурі. Лише у двох пацієнтів експресію антигену MUC-4 виявлено 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 у покривному епітелії майже не визначається. Отже, продукція цього білка в покривному епітелії при інфекційному загостренні ХОЗЛ порушена. Крім того, за інтенсивністю забарвлення слід констатувати зниження експресії антигену MUC-2 у келихоподібних клітинах та епітелії слизових залоз (*табл. 1*).

У покривному епітелії та епітелії слизових залоз також знижена експресія антигену MUC-3 (*табл. 1*). У келихоподібних клітинах при інфекційному загостренні ХОЗЛ, так само як і при неінфекційному, експресію антигену MUC-3 не визначено.

На відміну від зазначених епітеліальних клітин, у веретеноподібних клітинах строми бронха зниження експресії антигенів MUC-2 і MUC-3 при інфекційному загостренні ХОЗЛ не визначено. Отже, продукція зазначених молекул у клітинах, що, вірогідно, піддалися так званій епітеліально-мезенхімальній трансформації (ЕМТ), не змінена при інфекційному загостренні ХОЗЛ у порівнянні з ХОЗЛ без інфекційного загострення. Імовірно, це додатково підтверджує зміну якості даних трансформованих епітеліальних клітин, в зв'язку з чим вони по-іншому, порівняно зі звичайними епітеліальними клітинами, реагують на молекулярні фактори, що відіграють роль у розвитку запального процесу й прогресуванні фіброзу при ХОЗЛ.

При оцінці специфічного забарвлення структур бронхів на антигени MUC-2, MUC-3, MUC-4 встановлено їхню експресію у покривному епітелії бронхів та епітелії слизових залоз, у келихоподібних клітинах, веретеноподібних клітинах строми (фібробластах) різного ступеня

вираженості при інфекційному та неінфекційному загостренні ХОЗЛ. Так, у покривному епітелії бронхів експресію MUC-2 визначено у хворих без ознак інфекційного загострення ХОЗЛ та не визначено у хворих з інфекційним загостренням ХОЗЛ; експресія MUC-2 в келихоподібних клітинах була найвищою і на 31% меншою при інфекційному загостренні ХОЗЛ порівняно з неінфекційним; експресія MUC-2 в епітелії слизових залоз у хворих з інфекційним загостренням була двічі меншою порівняно з хворими без ознак інфекційного загострення; експресія MUC-2 у веретеноподібних клітинах строми (фібробластах) була однакового ступеня вираженості у хворих I і II груп.

Спостерігали зменшення експресії у покривному епітелії бронхів хворих з інфекційним загостренням ХОЗЛ на 75,7% порівняно з неінфекційним; в епітелії слизових залоз на 66,1% менше; у веретеноподібних клітинах експресія MUC-3 не залежала від варіанту загострення ХОЗЛ –  $0,286 \pm 0,024$  та  $0,289 \pm 0,028$  ( $p > 0,05$ ) відповідно. У келихоподібних клітинах експресію MUC-3 не спостерігали у хворих обох груп.

Експресію MUC-4 у покривному епітелії бронха визначено тільки у 2 хворих з загостренням ХОЗЛ I групи. Імовірно, це пов'язано з низьким порогом чутливості методики до антигену MUC-4 та слабкою його секрецією при ХОЗЛ. Мембрано-зв'язаний MUC-4, наявний на апікальній поверхні війчастих клітин, імовірно, разом з епітелієм піддається десквамації і не потрапляє в поле зору досліджуваного матеріалу.

Отже, при загостренні ХОЗЛ спостерігають експресію секреторних муцинів MUC-2 і MUC-3, що сприяють утворенню гелевого компоненту слизу. Синтез MUC-2 і MUC-3 зменшується в ДШ при інфекційному загостренні ХОЗЛ III порівняно з їх експресією при неінфекційному загостренні ХОЗЛ III в усіх структурах, крім веретеноподібних клітинах строми – фібробластах. На нашу думку, зменшення експресії муцинів при інфекційному загостренні ХОЗЛ найбільше виражене в покривному епітелії, епітелії слизових залоз, менше – у келихоподібних клітинах, що можна пояснити впливом патогенних мікроорганізмів, у великій кількості наявних на слизових оболонках і покривному епітелії бронхів при інфекційному загостренні ХОЗЛ. Деякі дослідження показали, що синьогнійна паличка зв'язується з вуглеводними структурами муцину, погіршуючи склад нормального слизу та мукоциліарний кліренс [7].

Рівномірна експресія MUC-2,3, що з'являється у фібробластах строми і не залежить від варіанту загострення ХОЗЛ, імовірно, пов'язана з явищами ЕМТ, коли нормальні епітеліальні клітини (наприклад, слизової оболонки залоз) під впливом певних факторів, наприклад TGF- $\beta 1$  [3,10,11], набувають рис міофібробластних клітин. Внаслідок ЕМТ епітеліальні клітини, втрачаючи міжклітинні зв'язки, переміщуються в інтерстицій, де, отримуючи повний мезенхімальний фенотип, беруть участь у синтезі фіброзної матриці [2,8].

Хоча остаточна роль муцинів у ДШ не відома, вони можуть функціонувати в якості рецепторів або рецептор-

них лігандів й активувати внутрішньоклітинні сигнальні каскади, що впливають на функції епітеліальних клітин, сприяючи також розвитку ЕМТ [10,12].

#### Висновки

При інфекційному загостренні хронічного обструктивного захворювання легень у різних типах епітеліальних клітин слизової оболонки бронхів знижується експресія антигенів MUC-2 і MUC-3. Імуногістохімічне дослідження антигенів MUC-2 і MUC-3 у веретеноподібних клітинах строми дозволяє засвідчити факт так званої епітеліально-мезенхімальної трансформації в слизовій оболонці бронхів при загостренні хронічного обструктивного захворювання легень.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у встановленні можливого терапевтичного впливу на експресію антигенів MUC-2 і MUC-3 в клітинах слизової оболонки бронхів при загостренні хронічного обструктивного захворювання легень.

#### 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-Міськів // Укр. пульмон. журнал. – 2009. – №3. – С. 49–54.
2. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis / E.M. Zeisberg // *Nat Med.* – 2007. – V. 13 (8). – P. 952–961.
3. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway

remodelling after human lung transplantation / L.A. Borthwick // *Thorax.* – 2009. – V. 64 (9). – P. 770–777.

4. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) / Workshop report, global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD. – Update 2011. Bethesda, National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute (2007) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.goldcopd.com.
5. 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. 122–133.
6. *Linden S.K.* MUCins in the MUCosal barrier to infection / S.K. Linden // *MUCosal Immunology.* – 2008. – Vol. 1. – P. 183–197.
7. *Mitchell E.* Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung of cystic fibrosis patients / E. Mitchell // *Nat. Struct. Biol.* – 2002. – Vol. 9. – P. 918–921.
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. 865–871.
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. 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.
12. *Voynow J.A.* Mucins, mucus and sputum / J.A. Voynow, B.K. Rubin // *Chest.* – 2009. – Vol. 135. – P. 505–512.

#### Відомості про авторів:

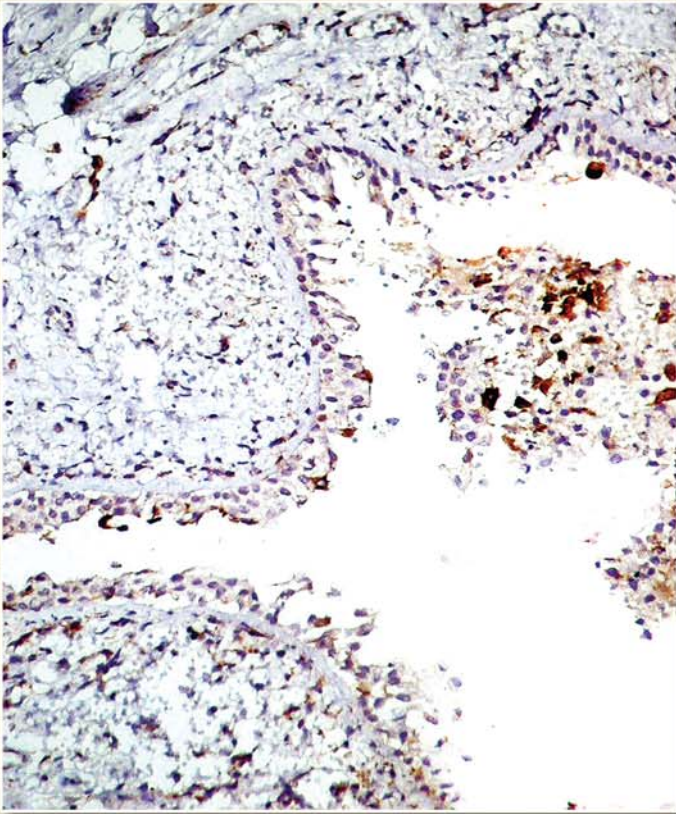
Коваленко С.В., доцент каф. внутрішньої медицини БДМУ.

Дорофєєв А.Е., д. мед. н., професор, зав. каф. внутрішньої медицини №2 ДонНМУ ім. М. Горького.

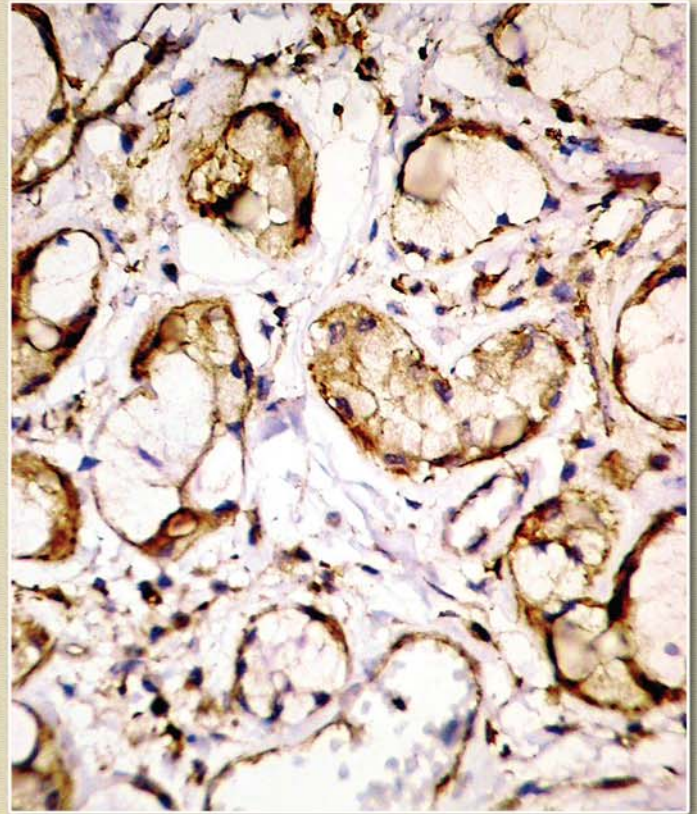
Василенко І.В., професор, зав. каф. патоморфології ДонНМУ ім. М. Горького.

Давиденко І.С., професор, зав. каф. патоморфології БДМУ.

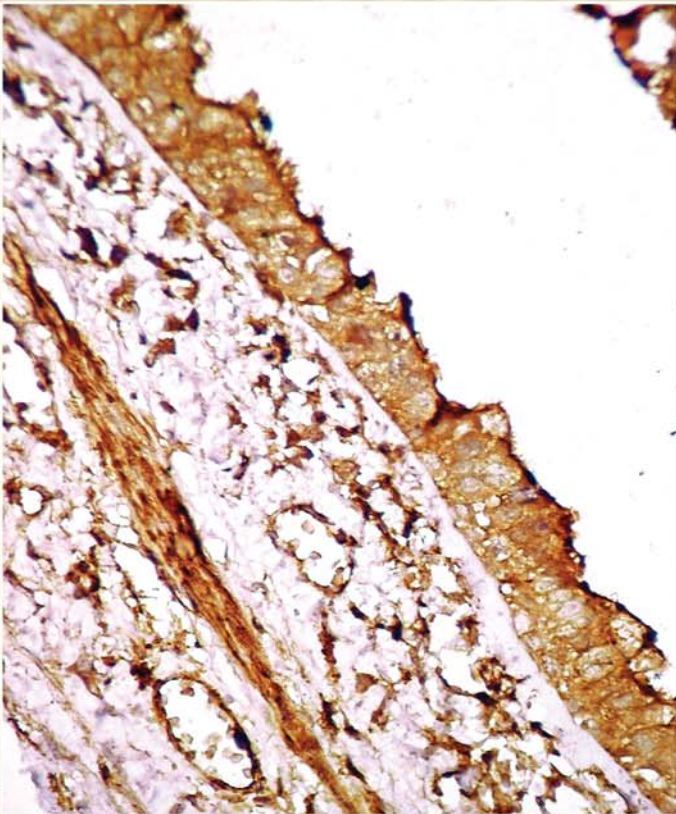
Надійшла в редакцію 07.02.2013 р.



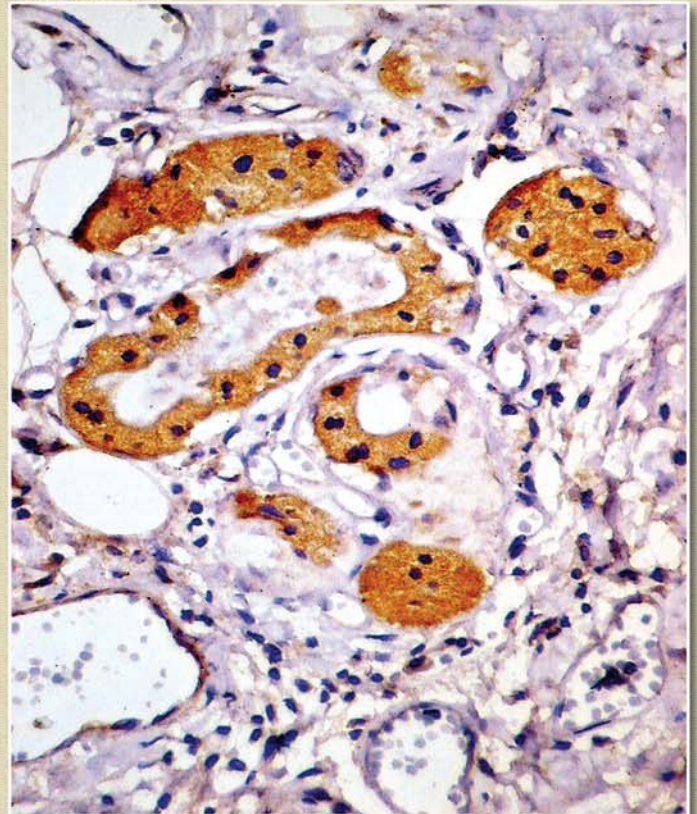
*Рис. 1.* Експресія антигену MUC-2 у десквамованому епітелії бронха у хворих на ХОЗЛ І групи. Імуногістохімічний метод, візуалізація з діамінобензидином. Об.20х.Ок.10х.



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



*Рис. 3.* 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. 4.* Експресія антигену MUC-3 у слизових залозах бронха у хворих на ХОЗЛ І групи. Імуногістохімічний метод, візуалізація з діамінобензидином. Об.20х.Ок.10х.

*(Рис. 1–4 до статті С.В. Коваленко, А.Е. Дорофєєва, І.В. Василенко, І.С. Давиденка «Особливості імуногістохімічних змін клітинного інфільтрату (вмісту муцинів MUC 2, 3, 4 в слизовій оболонці бронхів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень», с. 31–34)*