

А.М. Урываев, А.С. Рудой

**РОЛЬ ТФРβ-ИНДУКЦИИ И ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ МИОФИБРОБЛАСТОВ
В ПАТОМОРФОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГАТРИТА ПРИ СИНДРОМЕ
МАРФАНА И МАРФАНОПОДОБНЫХ СОСТОЯНИЯХ.**

Белорусский государственный медицинский университет

Кафедра военно-полевой терапии

Актуальность. Знания о синдроме Марфана (СМ) за последние несколько лет претерпели ряд изменений [1]. В патогенезе СМ и родственных ему марфаноподобных состояний (МПС) ключевое значение придается белку фибриллин-1, который выполняет не только структурную, но и функциональную роль во внеклеточном матриксе (ВКМ). Указанный белок играет важнейшую роль в модуляции биодоступности трансформирующего фактора роста β (ТФР β). ТФР β - это полипептидный фактор роста, который регулирует пролиферацию, дифференцировку, миграцию клеток, апоптоз, являясь наиболее мощным стимулятором фиброгенеза, участвующим в дифференцировке миофибробластов (МФБ) слизистой оболочки желудка (СОЖ). В тоже время ТФР β – является медиатором, концентрация которого в СОЖ линейно нарастает на последовательных стадиях опухолевой трансформации [2].

Большинство работ направлено на изучение сывороточных уровней / локализации и экспрессии ТФР β 1 в зависимости от контаминации СОЖ инфекцией *H.pylori* [3]. Вместе с тем, влияние такой патологии соединительной ткани (ННСТ), как СМ, ведущим звеном патогенеза при которых является нарушение регуляции ТФР β 1 на процессы в СОЖ в доступной литературе не описано.

Как в случае с воспалением [4] так и неопластическими процессами [5] в собственной пластинке СОЖ нарастает количество α -актина гладких миоцитов (α АГМ+)МФБ. Это увеличение числа МФБ при повреждениях и новообразованиях происходит в следствие ТФР β опосредованной трансдифференцировки фибробластов (ФБ) либо из мигрирующих в СОЖ циркулирующих фиброцитов (ЦФ). При этом количество α АГМ прямо пропорционально локальному уровню ТФР β [6]. Воздействие ТФР β на интерстициальные клетки сопровождается увеличением экспрессии компонентов ВКМ, в частности коллагена I, III [7].

На предыдущем этапе исследования было проведено микроскопическое исследование гистологических препаратов СОЖ у 23 пациентов с синдромом Марфана (СМ) в возрасте от 17 до 41 года. Отмечено нарастание частоты встречаемости структурных нарушений в виде атрофии и кишечной метаплазии [8].

Цель исследования – провести иммуногистохимическую оценку слизистой оболочки желудка у пациентов с синдромом Марфана; проверить гипотезу, что фоновая патология (СМ), проявляющаяся избыточной сигнальной активностью и экспрессией – ТФРβ, способствует избыточной активации ФБ, увеличению количества клеток с миофибробластической дифференцировкой (+αАГМ) и ремоделированию ВКМ при ХГД в виде накопления в экстрацеллюлярном матриксе коллагена III с ранним формированием специфического патоморфогенетического варианта атрофического процесса.

Материал и методы. При когортном одномоментном исследовании по типу «случай-контроль» обследовано 89 пациентов, находящихся на лечении в гастроэнтерологическом отделении ГУ «432 Главный военный клинический медицинский центр» (ГВКМЦ). В исследование включены пациенты с СМ, МПС и пациенты без признаков ННСТ с различными вариантами хронического гастродуоденита (ХГД). Сформированы три группы: 1-я - СМ (n=23; 33±9,3 лет; Ж:М / 7:16), 2-я группа - МПС (n=28; 29±9,0 лет; Ж:М / 6:22), 3-я группа – группа контроля (n=38; 30,2±8,8 лет; Ж:М / 10:28) - пациенты с минимальной частотой клинических проявлений ННСТ, не превышающих таковую в популяции.

Предметом исследования было состояние слизистой оболочки желудка, окрашенных с применением иммуногистохимических методов с применением моноклональных антител к αАГМ (Abcam, ab7817), коллагену III (Biogenex, MU167-UC), поликлональных антител к трансформирующему фактору роста β-1 (Abcam, ab66043) с использованием системы визуализации (Biogenex, QD630-ХАКЕ). Предварительно были отработаны методики окрашивания с модификацией и подбором оптимального режима демаскировки антигена и концентрации первичных антител в соответствующих разведениях (табл. 1)

Таблица 1. – Рекомендуемые разведения для первичных антител.

Название антитела	Производитель	Происхождение антител	Разведение антитела
Anti-alpha smooth muscle Actin	Abcam	Моноклональные	1:400
Anti-Collagen III	Biogenex	Моноклональные	1:500
Anti-ТФРbeta - 1 antibody	Abcam	Поликлональные	1:1000

В качестве позитивного контроля для каждого из использованных иммуногистохимических маркеров, использовали ткани и органы, рекомендованные фирмой-производителем, в качестве негативного контроля – исключение первичного антитела. Положительным результатом иммуногистохимической реакции являлось наличие специфического окрашивания ядер клеток, цитоплазмы, внеклеточного матрикса при выявлении антигена.

Оценка морфологических параметров проводилась с использованием микроскопа фирмы «Leica», с цифровой камерой «Leica» с разрешением 1920*1536 пикселей.

Микропрепараты фотографировали в 5 полях зрения. Оценка проводилась с использованием программного обеспечения для морфометрии AperioImageScore, автоматически измеряющего распространенность и интенсивность коричневой окраски ДАБ. В дальнейшем рассчитывался показатель экспрессии (ПЭ), равный отношению числа позитивных пикселей к их общему числу на микрофотографии. Статистическая обработка полученных данных произведена при помощи стандартного пакета программ «Statistica 11.0». Полученные результаты обработаны статистически с вычислением медианы, 25-ого и 75-ого перцентилей, средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m). Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Колмогоров-Смирнова. Для оценки взаимосвязи между показателями использовали метод непараметрического корреляционного анализа с вычислением коэффициента ранговых корреляций по Кендаллу (Kendalltau, τ ; Спирмену, ρ). Для сравнительной характеристики признаков использовали методы: сравнение двух независимых выборок U-критерия Манна-Уитни, двух зависимых выборок Z-критерий Вилкоксона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В целом позитивное окрашивание с антителами к ТФР β 1 было выявлено во всех исследованиях. Экспрессия ТФР β 1 в изучаемых микропрепаратах СОЖ была представлена окрашиванием различной степени интенсивности в эпителии и интерстициальной ткани в виде гомогенного или мелкогранулярного окрашивания в коричневый цвет, а также в виде преимущественного умеренного цитоплазматического окрашивания интерстициальных МФБ.

Таблица 2 – Иммуногистохимическая характеристика ТФР β 1, α АГМ, коллагена III в СОЖ при СМ и МПС

Группы сравнения		Значение ПЭ			U критерий Манна-Уитни
ТФРβ1					
		25%-й перцентиль	Медиана	75%-й перцентиль	
СМ	n = 23	0,07	0,09	0,13	72, p<0,05
МПС	n = 27	0,04	0,06	0,1	330, p=0,09
Контроль	n = 36	0,03	0,05	0,07	
αАГМ					
СМ	n = 23	0,16	0,22	0,29	265, p=0,04
МПС	n = 27	0,11	0,15	0,27	112, p=0,12
Контроль	n = 36	0,1	0,14	0,22	
Коллаген III					
СМ	n = 23	0,26	0,27	0,39	272, p<0,05
МПС	n = 27	0,21	0,23	0,37	121, p=0,1
Контроль	n = 36	0,15	0,17	0,27	

Примечание: значимые результаты отмечены жирным шрифтом.

Сокращения: СМ – синдром Марфана, МПС – марфаноподобные состояния

Выявлены достоверные различия в экспрессии ТФРβ1 при различных клинко-морфологических вариантах ХГ. Обнаружен достоверно более высокий показатель экспрессии ТФРβ1 в группе с СМ и, в меньшей степени, с МПФ по сравнению с контролем (72, $p < 0,05$ и 330, $p = 0,09$ соответственно) (табл. 2). В группе с СМ и МПС отмечено более интенсивное, а также большее по площади окрашивание структур межклеточного вещества у пациентов ($Z = 6,123$, $p < 0,01$) в субэпителиальной зоне и собственной пластинке. Выявленные закономерности свидетельствуют об избыточной активности ТФРβ1 при СМ и МПФ в стенке желудочно-кишечного тракта в сравнение с контролем.

К семейству МФБ традиционно относят разновидность стромальных клеток мезенхимного происхождения, классическим маркером которых является αАГМ [9]. Целью исследования αАГМ, было качественное и количественное подтверждение трансформации ФБ в МФБ - клеточной линии считающихся главными эффекторными клетками грануляции и стимуляторами эпителиальной реституции [10]. Экспрессия αАГМ была представлена в виде умеренноцитоплазматического окрашивания клеток сосудов стромы СОЖ и интенсивного – МФБ в собственной пластинке и субэпителиальной зоне.

Выявлены достоверные различия в экспрессии αАГМ, которые представлены в таблице 2 в группе пациентов с СМ. В группе с МПФ ПЭ αАГМ статистических различий не имели, хотя также были более высокими (112, $p = 0,12$). Отмечена линейная связь между ПЭ αАГМ и ПЭ ТФРβ ($r = 0,74$, $p < 0,05$), что соответствует уже имеющимся научным данным, полученным в эксперименте на слизистой толстой кишки [6] (табл.3).

Таблица – 3. Взаимосвязь экспрессии ТФРβ1 с другими ИГХ-маркерами

ИГХ-маркеры		г	р
ТФРβ1	αАГМ	$r = 0,74$,	$p < 0,007$
	Коллаген III	$r = 0,23$,	$p < 0,05$

Примечание: * – $p < 0,05$, достоверность различий; г – коэффициент корреляции

Позитивное окрашивание с антителами к коллагену III типа было обнаружено во всех исследованных случаях в виде окрашивания структур межклеточного вещества в субэпителиальной зоне, а также в собственной пластинке. Выявлены достоверные различия ПЭ коллагена III типа: максимальная экспрессия отмечалась у пациентов с СМ и МПФ, однако статистические различия выявлены только в I группев сравнении с группой контроля (272, $p < 0,05$), тогда как во второй группе обнаружена только тенденция (табл. 2).

Выводы:1. Степень эпителиальной реституции (ПЭ αАГМ) и выраженность фиброза стромального матрикса СОЖ (ПЭ коллагена типа III) нарастающие с фенотипической выраженностью ННСТ (в большей степени при СМ, в меньшей – МПС), в сочетании с

увеличением ПЭ ТФРβ1 могут выступать в качестве морфологических предикторов предраковых состояний СОЖ;

2. В группе пациентов с СМ установлено значимое увеличение степени и распространенности фиброза собственной пластинки СОЖ с высокой экспрессией коллагена III ($U=272$, $p<0,05$). Подобные изменения объясняются сочетанным действием двух факторов – увеличением числа субэпителиальных МФБ ($+αAGM$, $p=0,04$) и усилением их синтетической активности под влиянием экспрессии ТФРβ ($p<0,05$). Результирующим эффектом влияния обоих показателей является накопление белков ВКМ и в собственной пластинке, что объясняет ранее установленный нами факт высокой частоты атрофии СОЖ (до 39,4%) [8];

3. В группе с МПС ремоделирование межклеточного вещества также характеризуется тенденцией ($p=0,09$) к повышению профиброгенной экспрессии ТФРβ с увеличением количества клеток с миофибробластической дифференцировкой и накоплением в экстрацеллюлярном матриксе коллагена III типа ($p<0,1$).

Благодарности. Работа проведена при поддержке грантов Белорусского фонда фундаментальных исследований (БФФИ) - М13У-001 и М13М-048. Кафедре патологической анатомии УО «БГМУ» - к.м.н., доценту кафедры Летковской Т.А., ГУ «432 ГВКМЦ» - Врачу-эндоскописту – заведующий эндоскопическим отделением Реуцкому И.П.

Литература:

1 Loeys B. L. et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome //Journal of medical genetics. – 2010. – Т. 47. – №. 7. – С. 476-485.

2 Kim S. H. et al. Extensive alteration in the expression profiles of TGFβ pathway signaling components and TP53 is observed along the gastric dysplasia-carcinoma sequence //Histology and histopathology. – 2008. – Т. 23. – №. 10. – С. 1439.

3 Li Z., Li J. Local expressions of TGF-β1, TGF-β1RI, CTGF, and Smad-7 in Helicobacter pylori-associated gastritis //Scandinavian journal of gastroenterology. – 2006. – Т. 41. – №. 9. – С. 1007-1012.

4 Simmons J. G. et al. IGF-I and TGF-β1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2002. – Т. 283. – №. 3. – С. G809-G818.

5 Adegboyega P. A. et al. Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps //Archives of pathology & laboratory medicine. – 2002. – Т. 126. – №. 7. – С. 829-836.

6 Brenmoehl J. et al. Transforming growth factor- β 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration //World journal of gastroenterology: WJG. – 2009. – Т. 15. – №. 12. – С. 1431.

7 Geirsson A. et al. Modulation of transforming growth factor- β signaling and extracellular matrix production in myxomatous mitral valves by angiotensin II receptor blockers //Circulation. – 2012. – Т. 126. – №. 11 suppl 1. – С. S189-S197.

8 НИР: Молекулярные механизмы прогрессирования хронического атрофического гастрита у лиц молодого возраста с марфаноподобным фенотипом (заключ.) /БГМУ; рук.темы А.С.Рудой – Минск, 2015. – 89 с. – №ГР 20132073.

9 Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept // Cardiovasc. – 1998. – Vol. 38. – P. 545–548.

10 Aguilar D., Skrabanek L. Beyond tissue Info: functional prediction using tissue expression profile similarity searches // Nucleic Acids Res. – 2008. – Vol. 36, N 11. – P. 3728–3737.