

УДК 616.24–002.5–54:616–002.155:612–014.462.8:616–07

© Т. Г. Филоненко, 2010.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУРФАКТАНТ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ С АКТИВНЫМ БАКТЕРИОВЫДЕЛЕНИЕМ

Т. Г. Филоненко

Кафедра патологической анатомии с секционным курсом (заведующий кафедрой – профессор А.К. Загоруйко), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», г. Симферополь.

DISTRIBUTING OF THE SURFACTANT-ASSOCIATED PROTEINS AT FIBROUS-CAVERNOUS TUBERCULOSIS WITH ACTIVE BACTERIUM EXCRETION

T. G. Filonenko

SUMMARY

Surfactant-associated proteins SP-A, SP-B and SP-C are sensible to the changes in the area of fibrous cavity. Analysis of immunohistochemical research with SP-A, SP-C, SP-B in lung tissue, taken for patients by fibrous-cavernous tuberculosis with active bacterium excretion allowed to designate localization and level of expression of the surfactant-associated proteins, proving their role in the system of local defence of lungs that is a pathogenetic substantiation for further application of replacement surfactant therapy.

РОЗПОДІЛ СУРФАКТАНТ-АСОЦІЙОВАНИХ БІЛКІВ ПРИ ФІБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОМУ ТУБЕРКУЛЬОЗІ ЛЕГЕНЬ З АКТИВНИМ БАКТЕРІОВИДІЛЕННЯМ

Т. Г. Філоненко

РЕЗЮМЕ

Сурфактант-асоційовані білки SP-A, SP-B і SP-C чутливі до змін, що розвиваються в зоні каверни. Аналіз імуногістохімічного дослідження з SP-A, SP-C, SP-B в тканині легень, узятих у хворих на фіброзно-кавернозний туберкульоз з активним бактеріовиділенням дозволив найбільш чітко позначити локалізацію і рівень експресії сурфактант-асоційованих білків, що доводить їх важливу роль в системі місцевого захисту легень, що є патогенетичним обґрунтуванням для подальшого вживання заміщувальної сурфактантної терапії.

Ключевые слова: фиброзно-кавернозный туберкулез, легкие, сурфактант-ассоциированные белки, бактерiovыделение.

Несмотря на прогресс и развитие научных направлений в различных сферах медицины, проблема туберкулеза и его морфологических проявлений остается одной из актуальной и до конца не раскрытой в патоморфологии и фтизиатрии в связи со сложным патогенезом, наличием разнообразных клинических форм, лечебным патоморфозом, торпидностью к терапии, наличием рецидивов [1, 5, 6, 8].

Несмотря на самую современную химиотерапию, лечение туберкулеза, как правило, бывает длительным и не всегда эффективным, приводящим к прогрессированию туберкулеза и формированию фиброзно-кавернозных форм, требующих оперативного лечения. Одной из причин безуспешного лечения данной инфекции по общепринятому мнению является недостаточная эффективность защитных механизмов макроорганизма, в значительной мере генетически обусловленных [1, 5, 6, 7, 8].

Известно, что особое место в системе местной защиты легких занимает сурфактант, который высту-

пает в качестве защитного барьера мембран альвеолярного эпителия, принимает участие в обволакивании пылевых частиц и хемотаксисе, поддерживает стабильность легочной альвеолы, препятствуя ее спадению на выдохе и чрезмерному растяжению на вдохе, способствует активации альвеолярных макрофагов (AM) и действует как опсонин бактерий. Одним из важных составляющих сурфактанта являются сурфактант-ассоциированные белки (САБ) представленные двумя группами: гидрофильные – SP-A и SP-D и гидрофобные – SP-B и SP-C [2, 3, 13, 15, 16].

SP-B и SP-C обеспечивают главную функцию сурфактанта - поддержание стабильности легочной альвеолы в процессе дыхания [11, 14, 17]. SP-A обладает иммуномодулирующей и макрофаг-стимулирующей функцией, антибактериальной активностью по отношению к некоторым грамм-положительным и грамм-отрицательным бактериям, вирусам и аллергенам. Недостаточность или поломка генома этих белков снижает функции местной защиты легких и

провоцирует действие вредоносных факторов [9, 10, 12, 13, 15, 18].

В связи с этим, целью настоящего исследования является определение иммуногистохимических особенностей экспрессии сурфактант-ассоциированных белков SP-A, SP-B и SP-C в ткани легких при фиброзно-кавернозном туберкулезе в зависимости от активности бактериовыделения и определение его роли в нарушении местной защиты легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для иммуногистохимического (ИГХ) исследования явились участки ткани легких, взятые у 21 больного, оперированных по поводу фиброзно-кавернозного туберкулеза (ФКТ) легких с активным бактериовыделением. ИГХ исследование проводили в парафиновых срезах ткани легкого по методике Noguee L.M. et al. [35, 83, 84, 85] с использованием кроличьих поликлональных антител к SP-A, SP-B, SP-C и системой визуализации StreptABComplex/AP DakoCytomation, chromogen substrate: Fast Red.

Контролем явились участки ткани легких, взятые у 10 больных, умерших от патологии, не связанной с заболеванием легких (инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, рак желудка).

Техническую часть этих исследований без интерпретации результатов осуществляли в соответствии с протоколами для каталожных №№ АВ3420 и АВ3428 указанных антител в Институте молекулярной биологии и ультраструктурной патологии клетки Венс

кого Национального университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ иммуногистохимического исследования с поликлональными кроличьими антителами к сурфактант-ассоциированным белкам SP-A, SP-C, SP-B позволил наиболее четко определить морфофункциональный характер гистологических изменений в ткани легкого при фиброзно-кавернозном туберкулезе с активным бактериовыделением (БК+).

Оценку экспрессии сурфактант-ассоциированных белков проводили полуколичественным методом с учетом интенсивности окраски и с учетом их локализации.

В срезах ткани легких контрольной группы лиц цитоплазматическая экспрессия всех белков в той или иной степени обнаруживается в основном в альвеолах II типа (АII типа), в которых и синтезируется сурфактант. Учитывая тот факт, что в процессе элиминации сурфактанта активное участие принимают и альвеолярные макрофаги (АМ), то какое-то количество сурфактант-ассоциированных белков определяется и в цитоплазме АМ.

Считывается развивающаяся красная окраска в виде полосок по апикальной поверхности цитоплазмы клеток и/или слабая диффузная интенсивность окрашивания цитоплазмы; в виде красных зерен, которые располагались диффузно или очагово в цитоплазме клеток; диффузной красной цитоплазматической окраски и/или с наличием гомогенной красной выстилки альвеолы (табл. 1).

Таблица 1.

Оценка интенсивности экспрессии сурфактант-ассоциированных белков

Окраска	Обозначения	Степень реакции
Отсутствует	–	Отсутствует
Красные полоски по краю цитоплазмы и слабая интенсивность окраски цитоплазмы	+	Слабая (низкий уровень экспрессии)
Красные зёрна в цитоплазме	++	Умеренная (средний уровень экспрессии)
Диффузная красная цитоплазматическая окраска и сплошная полоска, выстилающая поверхность альвеолы	+++	Выраженная (высокий уровень экспрессии)

В легких контрольной группы лиц подавляющее число этих белков в виде полосок, зерен и диффузной красной окраски разной интенсивности отмечается практически повсеместно, во всех обнаруживаемых АII типа. Причем чем выше степень функциональной активности этих клеток, тем более выраженная диффузная окраска обнаруживается в цитоплазме этих клеток.

Вторым характерным местом для обнаружения

САБ является их присутствие в цитоплазме АМ. При этом практически не имело значение, в каких именно АМ присутствовали красные гранулы SP-A, SP-C, SP-B. В тех единичных клетках, которые находились в нишах альвеол или тех, которые свободно находились в просвете альвеол.

Кроме того, в ряде случаев нам удавалось обнаружить спиралевидные или решетчатые красноватые образования, которые также были расценены нами

как образования, содержащие САБ. И эти образования на наш взгляд тоже представляют собой отработанный сурфактант, поскольку чаще всего они находятся в просвете альвеол и обнаруживаются также в просвете респираторных бронхиол.

При анализе иммуногистохимических микропрепаратов с белком SP-B в ткани легких контрольной группы экспрессия наблюдается в той или иной степени выраженности практически во всех АП типа, локализуемая на альвеолярной стенке. При этом большинство АП типа имеют выраженную позитивную реакцию, т.е. преобладают АП типа, активно синтезирующие сурфактант, обеспечивающие стабильность легочной альвеолы в процессе дыхания.

Кроме того, имеет место слабо позитивная реакция в цитоплазме АМ, локализующихся как в нишах альвеолярной выстилки так и в просвете альвеол.

Иногда встречалась слабая позитивная экспрессия SP-B в мерцательном эпителии бронхов, что, по-видимому, свидетельствует об элиминации отработанного сурфактанта бронхиальным путем при выдохе.

Экспрессия SP-C имеет умеренно-выраженную позитивную реакцию, так как большинство АП типа содержит небольшое количество гранул SP-C, располагающихся в виде зерен в цитоплазме. В АМ отмечается слабая экспрессия белка.

В количественном отношении содержание SP-B в норме значительно превышает количество SP-C. И это свидетельствует о том, что именно SP-B является наиболее важным в смысле поддержания функции

стабильности легочных альвеол с точки зрения обеспечения поверхностно активных свойств сурфактанта.

В препаратах легкого контрольной группы отмечается в основном низкий уровень экспрессии SP-A в виде очаговой или диффузной, слабо интенсивной, окраски цитоплазмы АП типа и АМ. Следует отметить, что в количественном отношении позитивных клеток отмечалось гораздо меньше, чем с SP-B и SP-C, что, по-видимому, связано с отсутствием необходимости активного синтеза АП типа данной фракции белков, учитывая описанные в литературе функции SP-A [9, 10, 12, 13].

Несколько иные результаты были получены нами при иммуногистохимическом исследовании срезов при ФКТ (БК+). При этом наблюдалась высокая степень экспрессии высокомолекулярного белка SP-A, обладающего иммуномодулирующей, бактерицидной и макрофаг-стимулирующей функцией в участках дистелектаза вблизи фиброзной стенки каверны в виде интенсивного цитоплазматического окрашивания АП типа и АМ, которые очень плотно группировались в дистелектатических альвеолярных просветах, располагались в два ряда на поверхности альвеолярной стенки.

Можно предположить, что в этом случае имеет место компенсаторно-приспособительная реакция проявляющаяся пролиферацией альвеолоцитов и повышенной их синтетической активностью, способствующей поддержанию жизнедеятельности и функционирования альвеолы (рис.1).

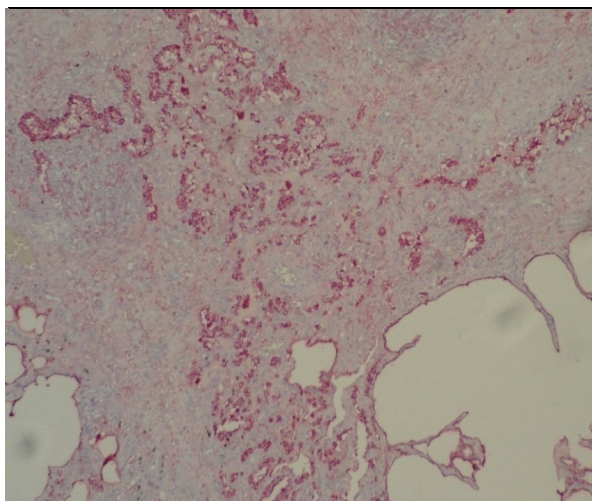


Рис.1. ФКТ, зона дистелектаза вблизи каверны. Выраженная экспрессия SP-A, локализуемая в АП и АМ. ИГХ. Визуализация в системе StreptABCComplex/AP. Ув.100.

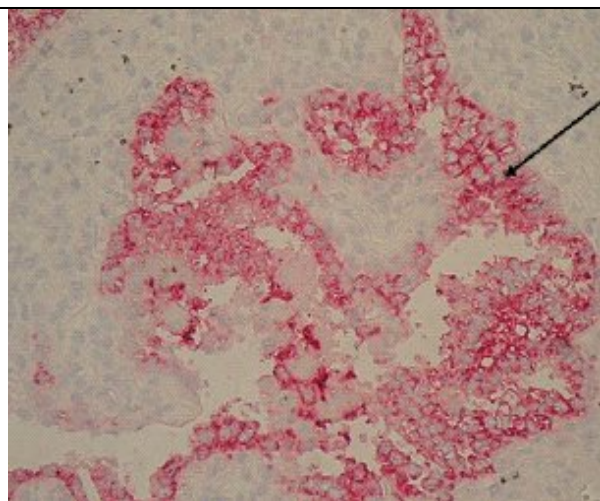


Рис.2. ФКТ, зона дистелектаза вблизи каверны и дренирующего бронха. Выраженная экспрессия SP-B, локализуемая в АП и АМ в зоне дистелектаза (стрелка). ИГХ. Визуализация в системе StreptABCComplex/AP. Ув.400.

А в некоторых участках, где рядом с зоной перикавернозного фиброза и дистелектаза имеют место эмфизематозные изменения альвеол, наблюдается непрерывная тонкая полоска красного цвета, выстилающая альвеолярную стенку, что можно объяснить распространением избыточно синтезированной фракции САБ SP-A, которая, по-видимому, имеет защитный характер в условиях грубых деструктивных изменений ткани легких.

Слабая позитивная реакция в виде красноватой полоски локализуется на апикальной поверхности мерцательного эпителия (МЭ) дренирующего бронха и в бронхиальном экссудате. Появление SP-A в этих участках может быть связано с выведением избыточного отработанного сурфактанта, в котором преобладающей фракцией белков является SP-A.

При активном фиброзно-кавернозном туберкулезе экспрессия SP-B в зоне дренирующего бронха была отрицательная, но в зоне дистелектаза вблизи фиброзной стенки каверны отмечалась высокая экспрессия SP-B, что свидетельствует о пролиферации

АП типа и скопления АМ в суженых дистелектатических альвеолах.

В этой ситуации происходит повышенная синтетическая активность АП типа и активации функции сурфактанта, что расценивается как компенсаторно-приспособительный процесс в ответ на деструктивные и фибропластические реакции, происходящие в зоне каверны (рис.2). Низкое содержание белка SP-C сохраняется в околокавернозных участках дистелектаза, локализующихся только в АП типа.

Таким образом, анализируя степень выраженности экспрессии и локализацию САБ, мы установили, что в контрольных срезах белки локализуются в основном в АП типа и АМ. При фиброзно-кавернозном туберкулезе с активным бактериовыделением наблюдаются изменения не только экспрессии сурфактант-ассоциированных белков, но и их локализации. Распределение SP-A, SP-B и SP-C белков в ткани легкого в контроле и больных ФКТ с учетом локализации и интенсивности экспрессии отображено в таблице 2.

Таблица 2.

Распределение SP-A, SP-B и SP-C белков в ткани легкого больных ФКТ

Локализация	SP-A		SP-B		SP-C	
	Контроль	ФКТ	Контроль	ФКТ	Контроль	ФКТ
Альвеолоциты II типа	+		+++		++	
Зона дистелектаза		+++		+++		+
Зона эмфиземы		+		+		—
Альвеолярные макрофаги	+		++		+	
Зона дистелектаза		+++		+++		—
Зона эмфиземы		—		—		—
Эпителий бронхов	—	+	+	—	—	—
Бронхиальный секрет		++		—		—

ВЫВОДЫ

1. Сурфактант-ассоциированные белки SP-A SP-B и SP-C чувствительны к изменениям, развивающимся в зоне каверны.

2. Резкое усиление и перераспределение экспрессии SP-A в зоне прогрессирующей каверны свидетельствует о включении этого белка в систему местной защиты легких, выполняющего при этом иммуномодулирующую, противовоспалительную, макрофаг-стимулирующую и стабилизирующую гомеостаз сурфактанта функции.

3. Перераспределение SP-B в патологические, но сохраняющие способность газообмена, альвеолы зоны дистелектаза, также является особенностью изменений данного белка при фиброзно-кавернозном туберкулезе, что сопровождается компенсаторно-приспособительной реакцией альвеолоцитов II типа к активному синтезу сурфактанта для обеспечения повышения стабильности альвеолы при сниженной функции сурфактанта в целом, что может являться маркером активности системы местной защиты легких.

4. Особенности перераспределения сурфактант-ассоциированных белков SP-A SP-B и SP-C могут являться патогенетическим обоснованием для дальнейшего применения заместительной сурфактантной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асмолов О.К. Організація боротьби з туберкульозом в Україні на сучасному етапі / О.К. Асмолов, О.А. Бабуріна, Н.А. Герасимова, І.М. Смольська та ін. // Одес. мед. журнал. — 2007. — №1. — С. 3-5.

2. Ерохин В.В.. Сурфактант и инфекция/В.В. / Ерохин, Л.Н. Лепеха. — Москва, 2004. — 131с.

3. Загоруйко А.К. Сурфактантная система легких и заместительная сурфактантная терапия/ А.К. Загоруйко, А.А. Биркун, Н.Ю. Новиков. — Симферополь.:Издат. центр КМИ, 1995. — 73с.

4. Корж Е.В. Роль системы гемостаза в формировании деструкции при туберкулезе легких/ Е.В. Корж, Л.Н. Родимова, Е.В. Дмитриенко и др. // Український пульмонологічний журнал. — 2006. — №2. — С. 70—72.

5. Ліскіна І. В. Морфологія стінки хронічної ригідної тришарової каверни у випадках фіброзно-кавернозного туберкульозу легень з різним ступенем активності його перебігу/ С. Д. Кузовкова, Л. М. Загаба, С. О. Кравченко, В. Г. Лук'янчук/ Український пульмонологічний журнал. — 2010. — №1. — С. 49—53.

6. Петренко В.М. Туберкульоз із розширеною резистентністю до протитуберкульозних препаратів: ситуація в Україні / В.М. Петренко, С.О. Черенко, Н.А. Литвиненко та ін. // Український. пульмонологічний. журнал. — 2007. — № 3. — С. 35-39.

7. Суслов Є.І. Ефективність патоморфологічної діагностики туберкульозу / Є.І. Суслов, Т.П. Підгаєвська, С.Д. Кузовкова та ін. // Український. пульмонологічний. журнал. - 2007. — № 3. — С. 52-55. —

8. Эллиниди В.Н. Иммуногистохимический метод в диагностике туберкулеза / В.Н. Эллиниди, Б.М. Ариэль, И.А. Самусенко, Л.В. Туголукова // Архив патологии. — 2007. — Т. 69, № 5. — С. 36-38.

9. Batenburg J.J. Surfactant Proteins SP-A and SP-D: interactions with pathogens/ J.J. /Batenburg E.M.Avery, T.A. Merritt // *App. cardiopulmonary pathophysiology* — 2004. — Vol.13. — P. 14—16.

10. Crouch E. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. / E Crouch, J. R. Wright // *Annu Rev. Physiol.* — 2001. — Vol.63. — P.521-554.

11. Epaud R. Surfactant protein B inhibits endotoxin-induced lung inflammation/ R. Epaud, M. Ikegami, J.A. Whitsett // *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* — 2003. — Vol. 28(3). — P.373-378.

12. Gaynor C. D. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages / C. D Gaynor F. X. McCormack, D. R. Voelker, S. E. McGowan, L. S. Schlesinger // *J. Immunol.* — 1995. — №55 — P.5343-5351.

13. Haagsman A.P. SP-A and lung defence // Sixty-six years of surfactant research / A.P Haagsman. — Rotterdam. — 1995. — P. 50—53.

14. Hamvas A. Inherited surfactant protein-B (SP-B) deficiency: Effects of surfactant replacement/ A Hamvas, F.S Cole, D. Mello, et al // *Pediatr. Res.* — 1993. — P. 323-328.

15. Martin W. J. Role of surfactant protein A in the pathogenesis of tuberculosis in subjects with human immunodeficiency virus infection/ W. J Martin, J. F. Downing, M. D. Williams, R. Pasula, H. L. Twigg // *Proc. Assoc. Am. Physicians.* — 1995. — №107. — P. 340-345.

16. Mayer C.K. Inflammation and surfactant / C.K Mayer, L.J. Zimmerman // *Peadiatr resp. Rew.* — 2002. — Vol.3. — P.308-314.

17. Weaver T.E. Functions of surfactant proteins B and C / T.E. Weaver. J.J Conkright // *Annu Rev. Physiol.* — 2001. — Vol. 63. — P.555-578.

18. Wright J.R. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of veolar rophage / J.R. Wright., D.C. Youmans // *Am. J. Physiol.* — 1993. — Vol.264. — P.L338 — L344.