

И.С.Платонова, И.В.Двораковская, Е.С.Лебедева, Н.А.Кузубова, Л.В.Качан

Влияние пептидной терапии на морфогенез легких на модели обструктивной патологии легких

НИИ пульмонологии ГБОУ ВПО "Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова" Минздрава России: 197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, 12

I.S.Platonova, I.V.Dvorakovskaya, E.S.Lebedeva, N.A.Kuzubova, L.V.Kachan

Effect of peptide therapy on lung morphogenesis in a model of obstructive pulmonary disease

Summary

We investigated effects of peptide therapy on the lung tissue remodeling in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) using histological, morphometric and immunohistochemical methods. The rats were exposed to nitrogen dioxide during 60 days. One-month course of peptide therapy has led to reduction in hyperplasia and muscle hypertrophy, recover of bronchial epithelium squamous metaplasia, and decrease in T- and B-lymphocyte number. In treated rats, foci of alveolar hyperextension and irregular emphysema, that were typical for untreated animals with COPD, were small and found only in subpleural areas. There results suggest therapeutic influence of low molecular peptides on the lung disease related to toxic inhalation.

Key words: rat model of chronic obstructive pulmonary disease, morphology, lung, nitrogen dioxide.

Резюме

На модели хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), формируемой у крыс в процессе 60-дневной экспозиции диоксидом азота, было исследовано влияние пептидной терапии на структурную перестройку легочной ткани с использованием гистологических, морфометрических и иммуногистохимических методов. После 1-месячного курса пептидной терапии отмечено снижение показателей гиперплазии и мышечной гипертрофии, отсутствие плоскоклеточной метаплазии бронхиального эпителия, уменьшение числа Т- и В-лимфоцитов. Типичные для нелеченных животных с ХОБЛ участки перерастяжения просветов альвеол и иррегулярной эмфиземы имели мелкоочаговый характер и сохранялись лишь в субплевральных отделах. Полученные данные являются объективным подтверждением положительного влияния, оказанного применением препарата класса низкомолекулярных пептидных биорегуляторов, на обратное развитие патологических процессов, возникающих в бронхолегочных структурах при длительном воздействии агрессивных факторов вдыхаемого воздуха.

Ключевые слова: модель хроническая обструктивная болезнь легких, морфология, легкие, диоксид азота.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) остается одним из наиболее социально значимых заболеваний, занимая 4-е место в ряду основных причин смерти в мире [1–3]. При ХОБЛ наблюдаются множественные структурные и функциональные повреждения бронхиального эпителия вследствие постоянного воздействия агрессивных факторов, присутствующих во вдыхаемом воздухе [1, 2]. Деструктивные изменения эпителия влекут за собой нарушения его иммунобарьерной функции, мукоцилиарного клиренса, способствуют присоединению инфекций, хронизации воспаления в бронхоальвеолярной ткани легких, инициируют процессы ремоделирования легочной паренхимы [4, 5]. Существует мнение, что восстановление структурно-функциональной целостности бронхиального эпителия путем стимулирования присущих организму механизмов физиологической репарации может прервать цепь патологических изменений [6]. В легочном эпителии присутствует пул мезенхимальных клеток-прогениторов с высоким регенерационным потенциалом [7, 8], однако вопросы регулирования их функции остаются открытыми. В качестве активатора резидентных клеток-предшественников трахео-

бронхиального тракта могут выступать низкомолекулярные хроматин-ассоциированные регуляторные пептиды, специфичные для легочной ткани, не обладающие иммуногенностью, способные из-за малого размера преодолевать любые поверхностные и внутриклеточные мембраны [9].

Целью исследования явилась оценка влияния регуляторной пептидной терапии на структурную перестройку бронхиального эпителия на модели ХОБЛ.

Материалы и методы

Объектом исследования служили крысы-самцы Вистар массой 150–170 г разводки питомника лабораторных животных "Рапполово" РАМН. Исследования проводились в соответствии с приказом Минздрава-соцразвития России от 23.08.10 № 708н "Правила лабораторной практики". Картина формирования ХОБЛ (от острой реакции на повреждение до хронического процесса) воспроизводилась с помощью ингаляционного воздействия диоксида азота (NO_2 , 30–40 мг / м³) [10]. Ингаляции проводились в прерывистом режиме (по 3 экспозиции в день в течение 30 мин с интервалом 0,5 ч) на протяжении 60 дней.

По окончании этого срока животные ($n = 22$) были разделены случайным образом на 2 группы. Ежедневно в течение последующих 30 дней животные 1-й группы ($n = 13$) получали пептидный препарат Бронхоген® (ООО ХБО при РАН, "Фирма Вита") в виде взвеси через пищеводный зонд. Доза препарата рассчитывалась, исходя из суточной дозы, рекомендованной для человека, с учетом межвидового пересчета. Животным ($n = 9$) 2-й группы (контрольной) аналогичным способом вводился 0,9%-ный раствор натрия хлорида. Интактную группу составили 9 особей. Эвтаназия осуществлялась методом ингаляции диоксида углерода.

Легкие расправлялись введением через трахею 10%-ного раствора нейтрального формалина. После стандартной фиксации в растворе формалина и обезживания в спиртах возрастающей крепости (70–96 %) образцы легочной ткани заливались в парафин. Из парафиновых блоков на микротоме изготавливались срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивались гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Полученные препараты оценивались по стандартным гистологическим критериям с подробным описанием стенки бронхов и альвеол. Затем гистологические срезы фотографировались с помощью микроскопа *Nikon* и цифровой фотокамеры *Progres CF*.

Морфометрический анализ осуществлялся с помощью аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Морфология 5.2. Каждый препарат фотографировался с увеличением в 4, 20 и 40 раз. При увеличении в 4 раза проводилась оценка стенки бронхов: измерялись площади бронха, клеточного инфильтрата, просвета бронха и суммарная площадь других компонентов стенки бронха (слизистая и мышечная оболочки, соединительная ткань). Измерения осуществлялись с помощью программ ручной обработки путем выделения указанных структур и автоматического определения их площади (мм²) и периметра (мм). Полученные данные передавались в *Microsoft Excel*, где создавался архив данных по анализу каждого изучаемого препарата. В дальнейшем полученные результаты в программе *SPSS 15,0 for Windows* сводились в таблицы, затем вычислялся процент площадей инфильтрата и просвета бронхов.

Толщина мышечного слоя стенки бронха оценивалась при 20-кратном увеличении (шаг измерений – 10–12 мкм). С помощью программ ручной обработки производилось до 30 последовательных измерений каждого препарата. На этом же увеличении по той же методике определялась толщина стенки артерии, расположенной рядом с бронхом. Толщина межальвеолярных перегородок (мкм) и площадь альвеол (мкм²) определялись при 40-кратном увеличении. В каждом препарате с помощью программ ручной обработки осуществлялось до 30 последовательных измерений толщины межальвеолярных перегородок. В программе автоматических измерений путем бинаризации выделялся просвет альвеол и определялась их площадь. Полученные при морфометрическом анализе данные по каждому препарату сводились в таблицы *Microsoft Excel*.

Статистическая обработка проводилась при помощи программы *SPSS 15.0 for Windows*. Результаты исследуемых групп сравнивались по непараметрическим критериям для нескольких независимых выборок с использованием критерия Крускала–Уоллиса. Если этот анализ давал достоверные различия между группами, то далее оценка производилась попарно для 2 независимых выборок (t-тест). В завершение исследования была сформирована база всех анализируемых препаратов, состоящая из фотографии среза, таблиц морфометрического анализа и статистических данных.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполнялось с использованием моноклональных антител для выявления Т-лимфоцитов (CD3) и макрофагов (CD163).

Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании бронхов крупного калибра у интактных животных определялась слизистая оболочка, покрытая цилиндрическим эпителием без видимых повреждений, вокруг стенки бронхов выявлялась слабая инфильтрация лимфоцитами (рис. 1). Мышечная оболочка прослеживалась на всем протяжении стенки бронха. Бронхиальные железы с незначительной гиперплазией эпителия. Межальвеолярные перегородки тонкие, просветы альвеол не расширены.

Эпителиальная выстилка крупных бронхов у контрольных животных характеризовалась наличием участков с гиперплазией бокаловидных клеток (рис. 2), увеличенным числом рядов клеток (рис. 3), дистрофией и атрофией эпителия. Встречались единичные поля плоскоклеточной метаплазии, фиброз собственного слоя. Бронхиальные железы – с дистрофическими и атрофическими изменениями эпителия (см. рис. 3). Преимущественно субплеврально имелись участки иррегулярной эмфиземы. В мелких и крупных сосудах отмечались умеренно выраженные

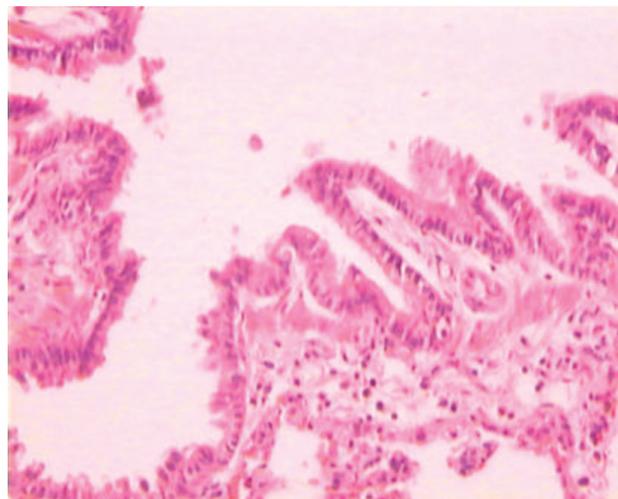


Рис. 1. Стенка бронха, покрытая цилиндрическим многоядным эпителием. Умеренная плазмощиттарно-лимфоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 160$

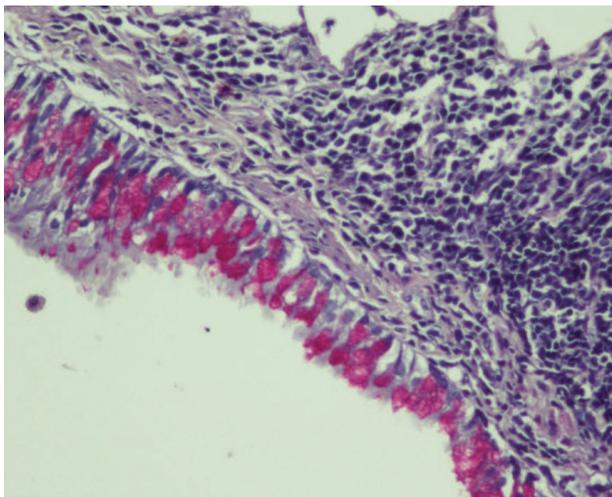


Рис. 2. Эпителиальная выстилка крупных бронхов. Участки с гиперплазией бокаловидных клеток. Окраска мушикармином; $\times 240$

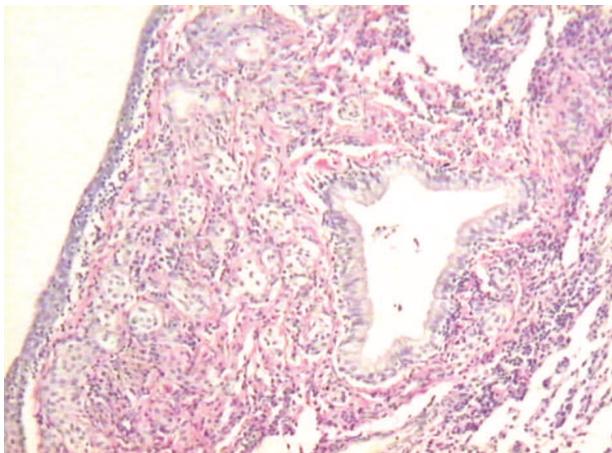


Рис. 3. Увеличение числа рядов клеток, плоскоклеточная метаплазия эпителия. Бронхиальные железы с дистрофическими и атрофическими изменениями эпителия. Окраска по Ван-Гизону; $\times 160$

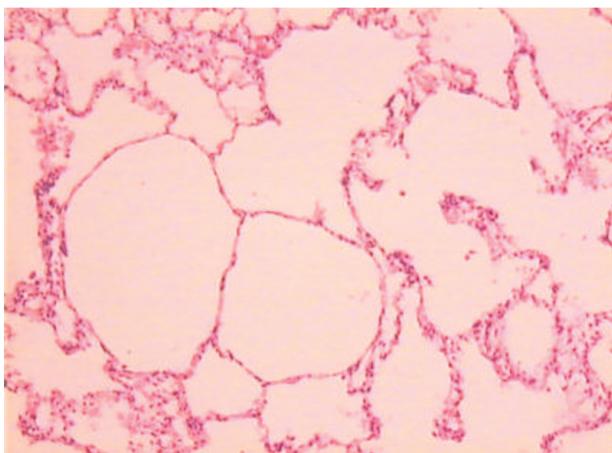


Рис. 4. Участки эмфиземы. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$

дисциркуляторные нарушения кровообращения, перикалибровка сосудов (рис. 4).

При гистологическом анализе микропрепаратов легких крыс, получавших после воздействия диоксида азота пептидный препарат, выявлены изменения преимущественно в стенках крупных бронхов, вокруг

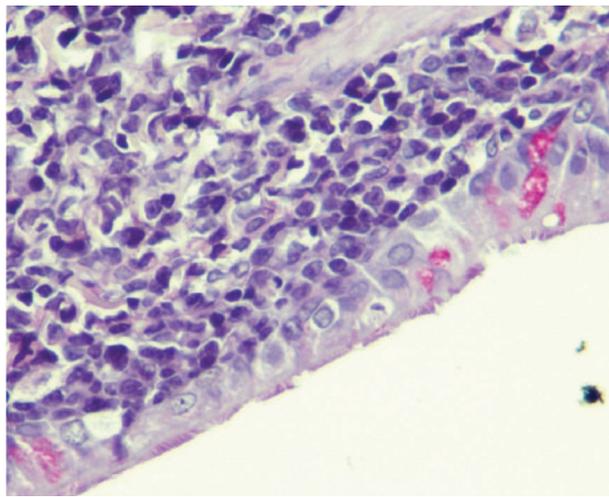


Рис. 5. Бронхиальный эпителий преимущественно цилиндрический, небольшое количество бокаловидных клеток. Окраска мушикармином; $\times 240$

которых определялась меньшая, чем в контрольной группе животных, инфильтрация лимфоцитами. Бронхиальный эпителий преимущественно цилиндрический, количество бокаловидных клеток уменьшалось (рис. 5). Мышечная оболочка прослеживалась на всем протяжении. Межальвеолярные перегородки тонкие, встречались участки перерастяжения альвеол. Полнокровные сосуды, стенки сосудов местами незначительно утолщены.

В отличие от интактной группы, в части лимфоцитов, содержащихся в стенке бронхов и легочной ткани контрольных животных (рис. 6, 7), при ИГХ-исследовании выявлялась экспрессия Т-клеточного антигена CD3 ($61,61 \pm 1,59$; в интактной группе — $28,12 \pm 2,36$; $p < 0,05$), а также выраженная экспрессия макрофагального антигена CD163 ($8,93 \pm 2,33$; в интактной группе — $2,30 \pm 0,43$; $p < 0,05$). В группе крыс, получавших пептидный препарат, наблюдалось снижение экспрессии Т-клеточного антигена CD3 ($37,81 \pm 2,03$; $p < 0,05$) и экспрессии антигена CD163 ($4,15 \pm 1,65$; $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (рис. 8, 9).

Результаты морфометрического анализа препаратов легочной ткани у исследованных животных всех групп представлены в таблице. В легких контрольных животных отмечалось достоверное увеличение толщины мышечной оболочки бронхиальной стенки, утолщение межальвеолярных перегородок, а также увеличение почти в 2 раза процента площади, занимаемой клеточным инфильтратом. Отмечалась тенденция к увеличению площади просвета альвеол. После курса пептидной терапии все морфометрические показатели существенно и достоверно улучшались по сравнению с контролем, однако не достигали интактных значений.

Заключение

Проведенное исследование позволяет дать морфологическую и ИГХ-характеристику формирования экспериментальной модели ХОБЛ, индуцированной

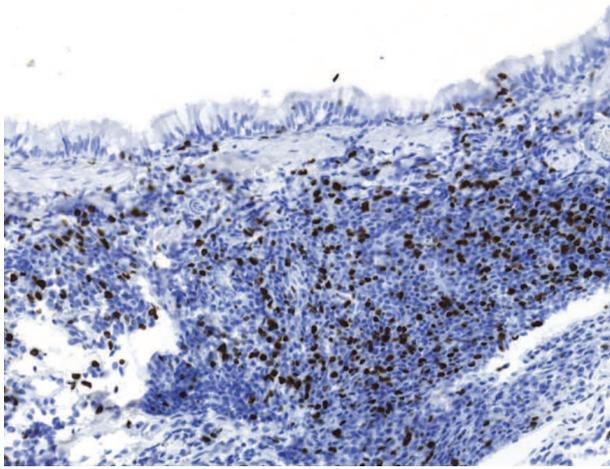


Рис. 6. Экспрессия Т-клеточного антигена CD3 в стенке бронха; $\times 160$

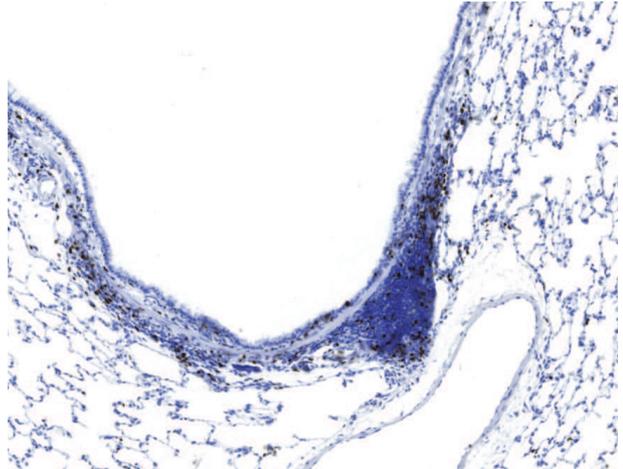


Рис. 8. Экспрессия Т-клеточного антигена CD3 в стенке бронха крысы после лечения; $\times 90$

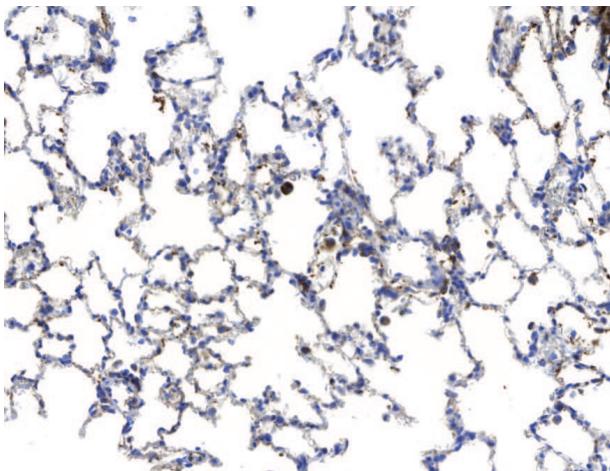


Рис. 7. Экспрессия макрофагального антигена CD163 в интерстиции; $\times 120$

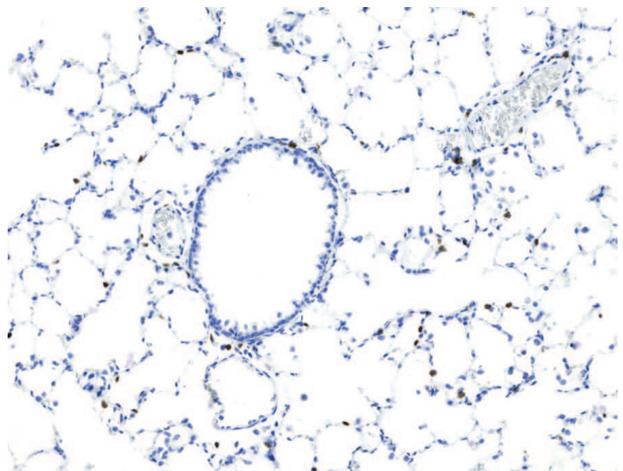


Рис. 9. Экспрессия макрофагального антигена CD163 в интерстиции после лечения; $\times 140$

ингаляционным воздействием диоксида азота. Наиболее выраженные изменения после 60-дневного воздействия диоксида азота происходили в бронхиальном эпителии. Выявлена гиперплазия эпителии в сочетании с метаплазией различной степени выраженности. Метапластический процесс характеризовался преимущественно преобладанием бокаловидных клеток в бронхиальном эпителии, редко встречающейся плоскоклеточной метаплазией. Перестройка эпителии с большим постоянством коррелировала с гиперплазией мышечного слоя, очаговой дилатацией альвеол и очаговой эмфиземой. Характерным и постоянным проявлением повреждения

крупных бронхов была стромальная клеточная реакция без признаков деструктивного повреждения с преобладанием выраженной инфильтрации Т- и В-лимфоцитов, что подтверждено ИГХ-исследованием.

После 60-дневной экспозиции диоксида азота и 1-месячного курса пептидной терапии отмечены отчетливое уменьшение проявлений гиперплазии бронхиального эпителии, редкость сохранения метапластических процессов и отсутствие плоскоклеточной метаплазии; снижение показателей мышечной гипертрофии; уменьшение числа Т- и В-лимфоцитов. Типичные для контрольной группы животных,

Таблица
Результаты морфометрического исследования препаратов легочной ткани

Показатели	Интakтная группа	Модель ХОБЛ (контроль)	Модель ХОБЛ + пептид
Площадь инфильтрата, %	12,83 \pm 1,09	21,34 \pm 0,63*	15,12 \pm 0,60**
Толщина мышечной оболочки стенки бронха, мм	9,94 \pm 0,30	14,37 \pm 0,29*	12,87 \pm 0,43**
Толщина межальвеолярных перегородок, мм	4,18 \pm 0,19	4,84 \pm 0,12*	4,29 \pm 0,08**
Площадь просвета альвеол, мкм ²	416,2 \pm 47,0	458,9 \pm 30,9	421,6 \pm 37,1

Примечание: * – различие с интактной группой достоверно, $p < 0,05$; ** – различие с группой "Модель ХОБЛ (контроль)" достоверно, $p < 0,05$.

не получавших лечения, участки перерастяжения просветов альвеол и иррегулярной эмфиземы имели мелкоочаговый характер и сохранялись лишь в субплевральных отделах.

Результатом применения тетрапептида бронхогена в настоящем исследовании стало восстановление морфологической структуры бронхиального эпителия и легочной ткани, нарушенной в процессе формирования модели ХОБЛ: гиперплазии бокаловидных клеток, плоскоклеточной метаплазии, лимфоцитарной инфильтрации и эмфиземы. Механизм действия коротких пептидов основан на комплементарном связывании с определенными сайтами генома, что ведет к модулированию функции взаимодействующих с ДНК регуляторных факторов, участвующих в сигнальных системах активации репаративных процессов [9]. В культуре ткани слизистой оболочки бронхов крыс было показано, что тетрапептид бронхоген обладает способностью стимулировать пролиферативную и функциональную активность основных клеточных элементов, снижать уровень спонтанной гибели клеток, усилить регенераторно-адаптационные процессы в пролиферирующих и дифференцирующихся клетках [11]. Полученные данные являются объективным подтверждением положительного действия препарата класса низкомолекулярных пептидных биорегуляторов на обратное развитие патологических процессов, возникающих в бронхолегочных структурах под влиянием длительного воздействия агрессивных оксидантных факторов вдыхаемого воздуха.

Литература

1. Чучалин А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких. М.: Атмосфера; 2011.
2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (update 2014). www.goldcopd.com
3. Decramer M., Janssens W., Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2012; 379 (9823): 1341–1351.

4. Polosukhin V.V., Lawson W.E., Milstone A.P. et al. Association of progressive structural changes in the bronchial epithelium with subepithelial fibrous remodeling: A potential role for hypoxia. *Virchows Arch.* 2007; 451 (4): 793–803.
5. Tuder R.M., Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 2012; 122 (8): 2749–2755.
6. Coraux C., Roux J., Jolly T., Birembaut P. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008; 5 (6): 689–694.
7. Konigshoff M., Saglani S., Marsland B.J., Eickelberg O. Rebuilding a diseased lung: repair and regeneration. *Eur. Respir. J.* 2013; 41 (3): 497–499.
8. Liu X., Engelhardt J.F. The glandular stem/progenitor cell niche in airway development and repair. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008; 5 (6): 682–688.
9. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. СПб: Наука; 2009.
10. Лебедева Е.С., Кузубова Н.А., Данилов Л.Н. и др. Воспроизведение в эксперименте хронической обструктивной болезни легких. *Бюл. exper. биол.* 2011; 152 (11): 596–600.
11. Закуцкий А.Н., Чалисова Н.И., Рыжак Г.А. и др. Тканеспецифическое влияние синтетических биорегуляторных пептидов в органотипической культуре тканей молодых и старых крыс. *Успехи геронтол.* 2006; 19: 93–96.

Информация об авторах

Платонова Ирина Семеновна – к. м. н., ст. научный сотрудник НИИП ПСПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 499-68-90; e-mail: is_platonova@mail.ru

Двораковская Иветта Владиславовна – д. м. н., ведущий научный сотрудник НИИП ПСПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 499-68-90; e-mail: i_dvorakovskaya@mail.ru

Лебедева Елена Сергеевна – к. б. н., зав. лабораторией экспериментальной пульмонологии и патоморфологии НИИП ПСПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 499-68-20; e-mail: osmelena@mail.ru

Кузубова Наталия Анатольевна – д. м. н., зам. директора НИИП ПСПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 234-17-69; e-mail: kuzubova@mail.ru

Качан Людмила Владимировна – к. м. н., ст. научный сотрудник НИИП ПСПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 499-68-90; e-mail: ele3260@yandex.ru

Поступила 03.03.14
© Коллектив авторов, 2014
УДК 616.24-036.12-085-092.9