

Патологическая репарация в зонах ниш стволовых клеток респираторных отделов легкого при идиопатическом легочном фиброзе

С.А.Демура¹, Е.А.Коган^{1,2}, В.С.Пауков¹

1 – ГБОУ ВПО "Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова" Минздрава России: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

2 – ФГБУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И.Кулакова" Минздрава России: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4

Pathologic reparation of the stem cell niche zones of respiratory acini in idiopathic pulmonary fibrosis

S.A.Demura¹, E.A.Kogan^{1,2}, V.S.Paukov¹

1 – State Institution "I.M.Sechenov First Moscow State Medical University", Healthcare Ministry of Russia: 8, build 2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia;

2 – Federal Institution "Academician V.I. Kulakov Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology", Healthcare Ministry of Russia: 4, Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russia

Резюме

Изучены морфологические и молекулярно-биологические особенности повреждения и репарации зон ниш стволовых клеток (НСК) респираторных отделов легких и значения возникших в них изменений в патогенезе идиопатического легочного фиброза (ИЛФ) или обычной интерстициальной пневмонии (ОИП). Работа выполнена на материале открытых трансторакальных ($n = 71$) и трансbronхиальных ($n = 47$) биопсий легких у пациентов ($n = 118$) с диагностированным бронхиолоальвеолярным раком легкого ($n = 13$), развившимся на фоне ИЛФ. Серийные парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону; при помощи иммуногистохимических реакций выявлялись антитела к матриксным металлопротеиназам (ММП)-1, -2, -7, ингибитору ММП (TIMP-4), маркеру пролиферации PCNA, тромбоцитарноподобному фактору роста (PDGF), эпидермальному фактору роста, фактору роста фибробластов типа *basic*, маркерам клеточного происхождения клеток, участвующих в репарации, – десмину, виментину, гладкомышечному актину (*LabVision*, 1 : 100), *Apo-Cas* (*Novocastra*, 1 : 100), трансдермальному фактору роста- β , фактору некроза опухоли- α , цитokerатину (ЦК)-7, -18, маркерам неоангиогенеза CD-34, маркерам стволовых клеток Oct-4 и CD-117 (*Dako*, 1 : 50), CD-68, (*Dako*, 1 : 100), ЦК-5 (*Biogenesis*, 1 : 200), ЦК-6, -19 (*Uni-Heidelberg*, 1 : 100). В качестве вторичных антител применялись биотинилированные антитела к иммуноглобулину мыши и кролика (*Dako* LSAB + KIT, *Peroxidase*). Все полученные количественные и полуквантитативные данные обработаны методом вариационной статистики. Показано, что в патогенезе и морфогенезе ИЛФ / ОИП важнейшую роль играет вовлеченность в процесс зон НСК легочной ткани, что приводит к последующей неполноценной репарации. Вероятно, что в основе неполноценной репарации при ОИП лежит нарушение процессов мезенхимально-эпителиальной (МЭТ) / эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ), о чем свидетельствует появление в зонах НСК клеток с миофибробластическим фенотипом, одновременно экспрессирующих маркеры мезенхимальной и эпителиальной дифференцировки, а также маркеры стволовых клеток. Вероятно, что клетки с миофибробластическим фенотипом, "латающие" разрушенные базальные мембраны и сохраняющиеся в зонах НСК, можно рассматривать в качестве маркерных, появление которых свидетельствует о патологической репарации легочной ткани в результате срыва программы МЭТ. При срыве программы МЭТ / ЭМТ в случае ОИП в последующем не только формируется "сотовое" легкое, но и развивается рак.

Ключевые слова: идиопатический легочный фиброз, обычная интерстициальная пневмония, бронхиально-альвеолярная переходноклеточная зона, мезенхимально-эпителиальная трансформация, пролиферация, склероз, рак легкого.

DOI: 10.18093/0869-0189-2015-25-3-350-356

Summary

The aim. Investigating morphological and molecular characteristics of injury and reparation of the stem cell niche (SCN) zones in the respiratory acini and determining a role of these changes for the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) / usual interstitial pneumonia (UIP). **Methods.** Surgical transthoracic ($n = 71$) and transbronchial ($n = 47$) lung biopsy specimen from 118 patients were investigated. Bronchiolar carcinoma occurring against the background of ILF was diagnosed in 13 cases. Serial paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin and Van Gieson picrofuchsin; immunohistochemical reactions were used to detect MMP-1, -2, -7, TIMP-4, PCNA, PDGF, EGF, FGF-b, desmin (Dsm), vimentin (Vimentin), SMA (LabVision, 1 : 100), Apo-Cas (Novocastra, 1 : 100), TGF- β , TNF- α , CD-34, CK-7, -18, Oct-4 and CD-117 (*Dako*, 1 : 50), CD68, (*Dako*, 1 : 100), CK-5 (Biogenesis, 1 : 200), CK-6, -19 (Uni-Heidelberg, 1: 100). Biotinylated antibodies against mouse and rabbit immunoglobulins (*Dako* LSAB + KIT, *Peroxidase*) were used as secondary antibodies. All quantitative and semi-quantitative data were analyzed with variational statistics. **Results.** Involvement of NSC zones of the lung tissue plays the key role in pathogenesis and morphogenesis of IPF/UIP. This leads to deficient reparation. Disorders of mesenchymal-epithelial transformation/epithelial-mesenchymal transformation (MET/EMT) are likely to be a basis for insufficient reparation in UIP. This is supported by appearance of cells with myofibroblast phenotype expressing both markers of mesenchymal and epithelial differentiation and stem cell markers in the SCN zones. **Conclusion.** Cells with myofibroblast phenotype could be considered as markers of pathologic reparation following MET program failure. Subsequently, MET program failure in UIP could lead to the development of "honey-comb" disorders in the lungs and also to lung carcinoma development.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis, usual interstitial pneumonia, stem cell niche zones, mesenchymal-epithelial transformation, proliferation, fibrosis, lung carcinoma.

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ), морфология которого сходна с обычной интерстициальной пневмонией (ОИП), относится к идиопатическим интерстициальным пневмониям (ИИП), характеризующимся преобладанием двустороннего диффузного хронического поражения легочного интерстиция респираторных отделов легких [1, 2]. ИЛФ / ОИП является наиболее частой формой ИИП и по данным ряда авторов составляет от 47 до 62 % всех случаев ИИП [3, 4]. ИЛФ отличается от других ИИП быстро прогрессирующим течением, развитием "сотового" легкого, резистентностью к проводимой терапии и очень плохим прогнозом. Пятилетняя выживаемость при ИЛФ / ОИП не превышает 40 % [5–8]. Кроме того, в 12–14 % случаев ИЛФ развивается рак легкого с преобладанием бронхиолоальвеолярного рака (31 %), который в общей группе различных типов рака легкого занимает всего 3 % [1, 9].

Несмотря на достаточно большое число работ по изучению ОИП, в литературе отсутствуют единое мнение относительно процессов патогенеза и морфогенеза данного заболевания, а также понимание механизмов такого быстрого бесконтрольного прогрессирования фиброза легкого с развитием "сотового" легкого и в ряде случаев – рака легкого.

Одновременно существуют воспалительная и репаративная теории патогенеза ОИП. Следуя воспалительной теории, ОИП является результатом иммунного воспаления. По результатам исследования показано, что ОИП – это результат патологической репарации стромы и эпителия в участках повреждения терминальных респираторных отделов легкого [10]. Однако остается нерешенным вопрос: почему в терминальных участках респираторного ацинуса развивается патологическая репарация стромы и эпителия?

Согласно современным представлениям, в репарации легочной ткани участвуют стволовые клетки (СК) тканевого и костномозгового происхождения, прежде всего мезенхимальные стромальные костномозговые клетки, располагающиеся в нишах стволовых клеток (НСК). [11, 12]. НСК обеспечивают СК физиологические условия существования в активном и дормантном состояниях и участие в репарации. Фактически НСК представлены экстрацеллюлярным матриксом с базальными мембранами [12]. В респираторных отделах легких выделяются несколько зон НСК, где можно обнаружить прогениторные клетки и истинно СК. К ним относятся бронхиолярная зона, где обнаруживаются клетки Клара, бронхиолярно-альвеолярная переходноклеточная зона (БАПЗ), где расположены клетки Клара и интерстициальные клетки, зона стыка альвеол, в которой расположены пневмоциты II порядка, и межальвеолярные капилляры [12].

В исследовании [13] описано повреждение НСК при ОИП. Молекулярные и морфологические особенности репарации зон НСК при ОИП не изучены. Вопрос о вовлеченности зон НСК в процесс патологической репарации, приводящей к прогрессирующему

фиброзу и аденоматозу при ОИП, остается открытым. Возможно, что именно этими данными можно было бы объяснить такие стремительные процессы фиброобразования при ОИП, приводящие к ремоделированию легочной ткани, не совместимому с жизнью человека.

Целью данного исследования явилось изучение морфологических и молекулярно-биологических особенностей процессов повреждения и репарации легочной ткани зон НСК респираторных отделов легких при ИЛФ и определение значения возникших в них изменений в патогенезе данного заболевания.

Материалы и методы

У пациентов, страдающих ОИП ($n = 118$), получавших лечение в клиниках ГБОУ ВПО "Первый МГМУ им. И.М.Сеченова" Минздрава России, проведен ретроспективный клинко-морфологический анализ открытых трансторакальных ($n = 71$) и трансбронхиальных ($n = 47$) биопсий легких. В качестве контроля исследованы открытые биопсии легких у пациентов ($n = 10$) с неподтвержденным диагнозом саркоидоза легких.

Серийные парафиновые срезы окрашивались гематоксилином, эозином и пикрофуксином по Ван Гизону и использовались для проведения иммуногистохимического (ИГХ) выявления антигенов иммунопероксидазным методом с двойными антителами по общепринятой методике.

В качестве первичных антител использовались моноклональные антитела к матриксным металлопротеиназам (ММР)-1, -2, -7, ингибитору матриксных металлопротеиназ (ТИМР-4), маркеру пролиферации (PCNA), тромбоцитоподобному фактору роста (PDGF), эпидермальному фактору роста (EGF), фактору роста фибробластов типа *basic* (FGF-b), маркерам клеточного происхождения клеток, участвующих в репарации – десмину (Dsm), виментину (Vim), гладкомышечному актину (SMA) (*LabVision*, концентрация 1 : 100), *Apo-Cas* (*Novocastra*, концентрация 1 : 100), фактору некроза опухоли- α (TNF- α), трансформирующему фактору роста- β (TGF- β), маркеру неоангиогенеза CD-34, цитokerатину (ЦК) -7, -18, маркерам СК Oct-4 и CD-117 (*Dako*, концентрация 1 : 50), CD-68, эпителиальному мембранному антигену (EMA) (*Dako*, концентрация 1 : 100), цитokerатину (ЦК) -5 (*Biogenesis*, концентрация 1 : 200), ЦК-6, -19 (*Uni-Heidelberg*, концентрация 1 : 100). В качестве вторичных антител применялись биотинилированные антитела к иммуноглобулинам мыши и кролика (*Dako* LSAB + KIT, *Peroxidase*). Рабочая концентрация составила 1 : 200. Ядра докрасивались гематоксилином. Проводились позитивные и негативные контрольные реакции. Результаты ИГХ-реакций оценивались в процентах клеток с позитивными реакциями, а также с применением полуколичественного метода в баллах. Уровень ангиогенеза рассчитывался по количеству микрососудов с CD-34 положительным эндотелием в 10 полях зрения при 400-кратном увеличении.

По морфологической картине и экспрессии ИГХ-маркеров изучались процессы повреждения, репарации, склероза и дисрегенераторные изменения. Повреждение респираторных отделов легкого изучалось по активности апоптоза, некроза, агрессивности альвеолярных макрофагов и выраженности воспалительного ответа, что подтверждалось данными ИГХ-реакций (MMP-1, -2, -7; *Apo-Cas*; TNF- α ; TGF- α). При этом учитывались локализация и выраженность этих процессов в зонах НСК. Процессы репарации и склероза респираторных отделов оценивались по локализации процесса, типу хронического воспаления, гистологической и ИГХ-активности воспалительного процесса и репарации по экспрессии следующих маркеров: маркера пролиферации PCNA, факторов роста (PDGF, EGF, FGF-b, EMA), маркеров клеточного происхождения клеток, участвующих в репарации – SMA, Dsm, Vim и ЦК, маркеров СК Oct-4 и CD-117, CD-34, СК-19. Дифференцировались тип склероза по морфологической картине (карнификация, септальный, "сотовое" легкое, диффузный интерстициальный). Активность ангиогенеза и фиброза определялась с помощью маркеров CD-34, PDGF, EGF, FGF-b, MMP-2, TIMP-4, PCNA.

Статистическая обработка данных выполнялась на персональном компьютере с помощью электронных таблиц *Microsoft Excel* и пакета прикладных программ *Statistica for Windows 7.0* (*StatSoft Inc.*, США). Все полученные количественные анamnестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные обработаны методом вариационной статистики. Все количественные показатели были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для каждого количественного параметра были определены: среднее значение (M), среднеквадратическое отклонение (δ), ошибка среднего (m), медиана (Me), 95%-ный доверительный интервал, для качественных данных – частота (%). Данные приведены в виде $M \pm m$. Для сравнения числовых данных (после проверки количественных данных на нормальное распределение) использовался t -критерий Стьюдента для 2 независимых выборок. Для сравнения непараметрических данных применялся критерий Манна–Уитни (для 2 групп) для несвязанных совокупностей. Связь между изучаемыми показателями оценивалась по результатам корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции Пирсона (r) или Спирмена (R) и последующим установлением его значимости по критерию t .

Результаты и обсуждение

Морфологическая характеристика ОИП

При ОИП отмечалось наличие мозаичности поражений, представленных сочетанием интерстициального воспаления с грубыми склеротическими изменениями, миофибробластическими фокусами и участками непораженной ткани. Патологические изменения респираторных отделов легких часто ло-

кализировались в зонах НСК: в БАПЗ и зоне стыка альвеол, проявляясь в отсутствии эпителиальной выстилки с разрушением базальной мембраны. В ткани легкого обнаруживался выраженный воспалительный инфильтрат с большим содержанием альвеолярных и интерстициальных макрофагов (экспрессирующих CD-68) с примесью полиморфно-ядерных лейкоцитов и лимфоцитов с образованными в легочной ткани лимфоидными фолликулами. В просвете альвеол определялись полиморфно-ядерные лейкоциты. В ОИП обнаруживался тромбоз микрососудов, сопровождающийся ишемией ацинарных отделов, что усиливало повреждение. Повреждение распространялось на несколько зон НСК: стык альвеол, БАПЗ и микрососуды интерстиция.

ИГХ-характеристика

Клетки с иммунофибробластическим фенотипом, "латающие" разрушенные базальные мембраны и замещающие эпителиальную выстилку в поврежденных зонах НСК, были SMA- (рис. 1), Dsm- и Vim-позитивными и экспрессировали маркеры, характерные для мезенхимальных СК: Oct-4 и CD-117

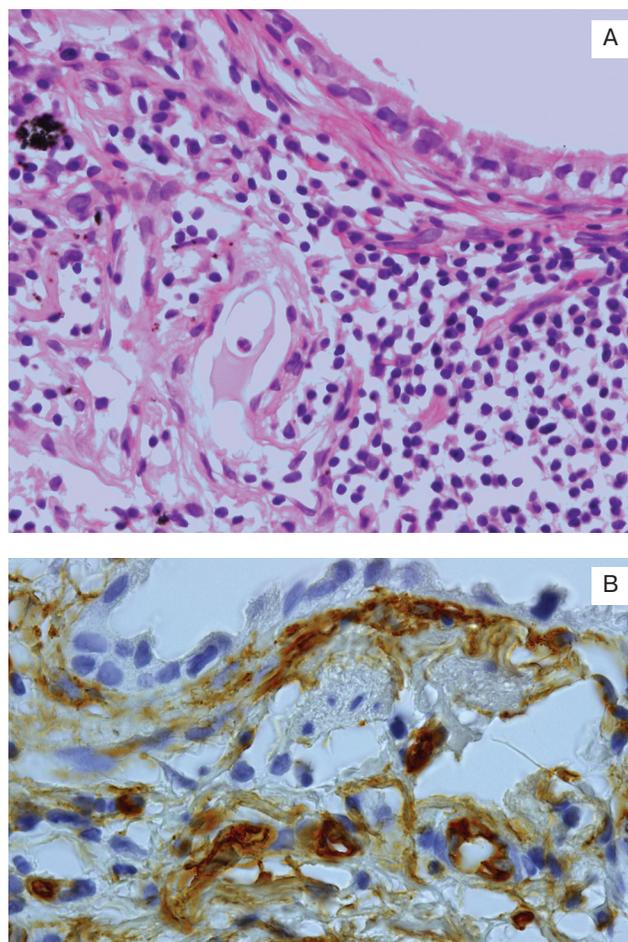


Рис. 1. ОИП: А – клетки с иммунофенотипом миофибробластов, "латающие" разрушенные мембраны; уплощение эпителия, гиперплазия эпителия; $\times 200$; В – экспрессия CD-34, в т. ч. клетками с иммунофенотипом миофибробластов; $\times 400$
 Figure 1. UIP: (A), cells with myofibroblast phenotype repairing destroyed cell membranes; epithelium flattening, epithelium hyperplasia; magnification $\times 200$; (B), CD34 expression by cells with myofibroblast phenotype and other cells, magnification $\times 400$

Таблица
ОИП. Экспрессия ЦК-7, -18, -19, CD-34, CD-117 и Oct-4 клетками зон НСК, %
Table

Usual Interstitial pneumonia. Expression of CK-7, CK-18, CK-19, CD 117 and Oct-4 in the SCN zones, %

	Клетки					
	ЦК-7	ЦК-18	ЦК-19	CD-34	CD-117	Oct-4
АЭ	48	17,5	17,5	0	0	0
АдЭ	66	66,8	75,6	2,1	0	3,5
БЭ	13,1	0	0,7	0	0	0
МФБ	0	3,5	3,5	4,2	1	7,2
Энд	0	0	0	100	0	4,6

Примечание: АЭ – альвеолярный эпителий; АдЭ – эпителий аденоматозных структур; БЭ – бронхиолярный эпителий; МФБ – клетки с иммунофибробластическим фенотипом; Энд – эндотелий.

(цитогенетические маркеры СК и клетки Коха) [6, 14–16], CD-34 (маркер эндотелия, перицитов и мезенхимальных СК) [15], а с другой стороны – маркеры эпителиальных клеток – ЦК-7, экспрессия которого характерна для бронхиолярного, альвеолярного, а также железистого эпителия [17], ЦК-18, который экспрессируется неороговевающим плоским эпителием [17–21], и ЦК-19, характерный для гиперпролиферирующего эпителия и прогениторных эпителиальных СК [17] (см. таблицу).

Патологическая репарация в зонах НСК была представлена не только фокусами клеток с миофибробластическим фенотипом, "латающими" разрушенные базальные мембраны респираторного ацинуса, но и участками с уплощением эпителия и фокусами гиперплазией пневмоцитов II порядка. Вместе с воспалительными и репаративными процессами обнаруживались выраженный склероз в сочетании с аденоматозом (аденоматозными структурами без и с атипией эпителия) и деформацией альвеол и бронхиол с формированием "сотового" легкого. Эпителиальные клетки аденоматозных структур экспрессировали ЦК-19, CD-34 и Oct-4, что, возможно, говорит о нарушенном созревании этих клеток и сохранении в них признаков СК, которые у 13 (11 %) больных ОИП в данном исследовании имели выход в бронхиолоальвеолярный рак.

Вероятно, что экспрессия маркеров мезенхимальной и эпителиальной дифференцировки в клетках с миофибробластическим фенотипом и в некоторых эпителиальных клетках альвеолярного эпителия, эпителия аденоматозных структур и бронхиолярного эпителия наделяет их свойствами прогениторных СК, появление которых описано при феноменах мезенхимально-эпителиальной трансформации / трансдифференцировки (МЭТ) и эпителиально-мезенхимальной трансформации / трансдифференцировки (ЭМТ). МЭТ характеризуется трансдифференцировкой мезенхимальной СК в прогениторную эпителиальную, и, наоборот, ЭМТ характеризуется трансдифференцировкой эпителиальной клетки в прогениторную мезенхимальную [22–23]. МЭТ характеризуется экспрессией в прогениторных СК маркеров мезенхимальных клеток (SMA, Vim и Dsm), и маркеров эпителиальных клеток (ЦК). Впервые МЭТ и ЭМТ были описаны при канцерогенезе,

при котором они активно участвуют в процессе опухолевой инвазии и метастазирования [9, 23]. Однако оказалось, что МЭТ относится к основополагающим процессам развития тканей и органов в эмбриогенезе [24–27]. Вероятно, что срыв дифференцировки клеток в процессе МЭТ или ЭМТ имеет огромное значение при репарации, особенно в тканях с небольшим пролиферативным потенциалом. И вероятно, что на срыв этого механизма оказывают влияние уровень и глубина повреждения зон, где этот процесс наиболее выражен – зон НСК.

Вероятно, что при ОИП клетки с иммунофибробластическим фенотипом и эпителиальные клетки, располагающиеся в зонах разрушенных НСК, позитивные по экспрессии SMA, Dsm, Vim, ЦК-19, маркеров СК – Oct-4, CD-34 и -117 – являются маркерными клетками процесса "патологической репарации" и срыва программ МЭТ и ЭМТ, что, с одной стороны, является результатом повреждения зон НСК (БАПЗ, зона стыка альвеол и микрососудов), а с другой – приводит к ремоделированию легочной ткани, которое проявляется в выраженном склерозе легочного интерстиция с образованием "сотового" легкого с аденоматозными структурами и высокой активностью альвеолярных макрофагов и процессов ангиогенеза с выходом в рак. Показатели морфологического исследования подтверждены данными анализа уровней экспрессии ИГХ-маркеров.

ОИП характеризовался высокими уровнями экспрессии ИГХ-маркеров повреждения и репарации в зонах НСК: в БАПЗ, зонах стыка альвеол и вокруг микрососудов (капилляров и венул) (рис. 2).

Средний уровень экспрессии *Apo-Cas* в этих зонах в АЭ составил $0,7 \pm 0,2$ %, в АдЭ – $12,7 \pm 1,6$ %, в БЭ – $8,2 \pm 1,6$ %, в альвеолярных макрофагах (АМФ) – $4,5 \pm 0,8$ %, в клетках с иммунофибробластическим фенотипом – $2,0 \pm 0,6$ % (см. рис. 2А). ОИП достоверно отличался от контроля высокими уровнями экспрессии *Apo-Cas* ($p \leq 0,05$) (см. рис. 2В).

Средний уровень экспрессии $TGF-\beta$ в НСК в АЭ составил $3,4 \pm 0,1$ %, в АдЭ – $5,2 \pm 0,1$ %, в БЭ – $5,4 \pm 0,1$ %, в АМФ – $4,5 \pm 0,1$ %, в фибробластах (ФБ) – $4,4 \pm 0,2$ %, в МФБ – $5,2 \pm 0,1$ % и в Энд – $5,2 \pm 0,1$ % (см. рис. 2А).

Экспрессия $TNF-\alpha$ при ОИП обнаруживалась в тех же зонах и клетках, что и *Apo-Cas* и $TGF-\beta$.

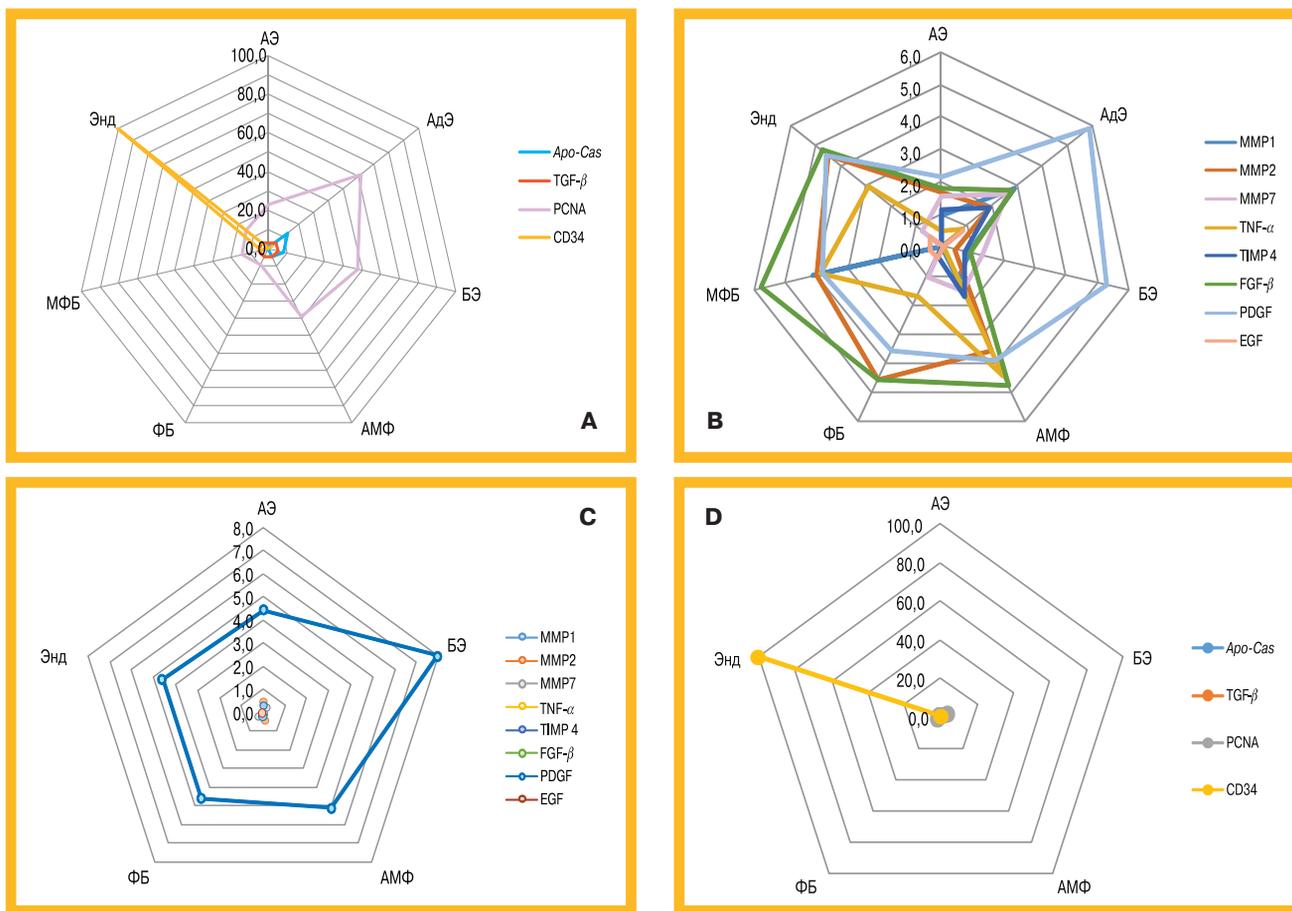


Рис. 2. Средние значения экспрессии маркеров повреждения и репарации в различных клетках: А, В – при ИЛФ (ОИП); С, D – в контроле

Figure 2. Mean expression levels of markers of injury in different cells in idiopathic pulmonary fibrosis

Были зафиксированы следующие средние уровни экспрессии $TNF-\alpha$ в клетках зон НСК: в АЭ – $0,4 \pm 0,1$ балла, в АдЭ – $0,8 \pm 0,1$ балла, в БЭ – $5,4 \pm 0,1$ балла, в АМФ – $4,5 \pm 0,2$ балла, в ФБ – $1,7 \pm 0,2$ балла, в МФБ – $3,9 \pm 0,2$ балла и в Энд – $2,9 \pm 0,2$ балла (см. рис. 2В).

MMP-7, экспрессировалась в тех же зонах НСК, что и *Aro-Cas*, $TGF-\beta$ и $TNF-\alpha$. Она обнаруживалась в следующих клетках зон НСК: АЭ ($1,6 \pm 0,2$ балла), АдЭ ($2,6 \pm 0,3$ балла), БЭ ($1,3 \pm 0,2$ балла), АМФ ($1,5 \pm 0,3$ балла), ФБ ($1,0 \pm 0,2$ балла) (см. рис. 2В).

MMP-2 обнаруживалась в участках разрушения базальных мембран в зонах НСК как в экстрацеллюлярном матриксе, так и в АЭ ($1,7 \pm 0,2$ балла), АдЭ ($2,0 \pm 0,3$ балла), БЭ ($0,4 \pm 0,1$ балла), АМФ ($3,6 \pm 0,2$ балла), ФБ ($4,6 \pm 0,2$ балла), МФБ ($4,0 \pm 0,2$ балла), Энд ($4,5 \pm 0,2$ балла) (см. рис. 2В).

Экспрессия MMP-1 обнаруживалась в АЭ ($0,9 \pm 0,1$ балла), АдЭ ($2,9 \pm 0,2$ балла), БЭ ($0,9 \pm 0,2$ балла), АМФ ($1,2 \pm 0,2$ балла), МФБ ($4,1 \pm 0,2$ балла) (см. рис. 2В).

Высокая пролиферативная активность альвеолярного, бронхиолярного эпителия, клеток с иммунофибробластическим фенотипом и эндотелиоцитов при ОИП подтверждалась высокой экспрессией PCNA: в АЭ – $23,1\% (\pm 2,6)$, БЭ – $47,4\% (\pm 3,2)$, АдЭ – $61,4\% (\pm 2,3)$, МФБ – $14,3\% (\pm 2,3)$, Энд –

$15,5 (\pm 1,8)$, ФБ – $9,2\% (\pm 1,3)$, АМФ – $38,7\% (\pm 2,7)$. PCNA-позитивные клетки обнаруживались в большом количестве в зонах НСК.

Экспрессия PDGF наблюдалась в АЭ ($2,2 \pm 0,2$ балла), АдЭ ($5,9 \pm 0,01$), БЭ ($5,3 \pm 0,1$ балла), АМФ ($3,9 \pm 0,2$ балла), ФБ ($3,6 \pm 0,2$ балла), МФБ ($3,8 \pm 0,2$ балла), Энд ($4,6 \pm 0,2$ балла) (см. рис. 2В).

Экспрессия EGF, отвечающего в легочной ткани за созревание пневмоцитов II порядка и репарацию эпителия [28], практически полностью отсутствовала в клетках зон НСК при ОИП (см. рис. 2В).

FGF-b обнаруживался в клетках зон НСК с наиболее высоким уровнем экспрессии в интерстициальных и АМФ, ФБ и МФБ: АЭ ($1,82 \pm 0,1$ балла), АдЭ ($2,8 \pm 0,02$), БЭ ($0,9 \pm 0,1$ балла), АМФ ($4,8 \pm 0,1$ балла), ФБ ($4,6 \pm 0,2$ балла), МФБ ($5,8 \pm 0,1$ балла), Энд ($4,8 \pm 0,1$ балла).

Экспрессия CD-34 обнаружена в зонах НСК в миофибробластических фокусах и в сосудах (см. табл. 1). Высокая экспрессия CD-34 в сосудах является отражением усиленного неоангиогенеза и соответствует и выраженному фиброзу при ОИП, что уже описано в литературе [29].

Экспрессия TIMP-4 обнаруживалась в клетках зон НСК: АЭ ($1,1 \pm 0,2$ балла), АдЭ ($1,9 \pm 0,02$), БЭ ($0,7 \pm 0,1$ балла), АМФ ($1,7 \pm 0,2$ балла), ФБ ($0,3 \pm 0,1$ балла). Однако уровни его экспрессии были не-

сколько ниже, чем уровни экспрессии металлопротеиназ.

Морфологическая картина и высокие уровни экспрессии маркеров повреждения и репарации, локализующиеся в клетках зон НСК при ОИП, свидетельствуют в первую очередь о глубоком вовлечении зон НСК (БАПЗ, зона стыка альвеол, капилляров) на всех уровнях респираторных отделов легкого в процессы повреждения с развитием тромбоза микрососудов, разрушением базальных мембран всего ацинуса, выраженным апоптозом эпителиоцитов и высоким уровнем экспрессии металлопротеиназ и репарации с развитием неоангиогенеза и "миофибробластических" фокусов при высокой активности факторов роста, вызывающих пролиферацию эпителиоцитов и клеток с иммунофибробластическим фенотипом в этих зонах. АМФ, МФБ, ФБ, вероятно, играют ключевые роли в процессе повреждения и последующей репарации. Репарация носит неполноценный характер, что подтверждается появлением в зонах НСК репарирующих клеток с иммунофибробластическим фенотипом, экспрессирующих при этом маркеры, присущие СК, – CD-34, -117, ЦК-19, что уже было описано при сравнительной характеристике ОИП с другими ИИП [13]. При этом обнаруживаются отсутствие или следы экспрессии EGF, что также свидетельствует о нарушении трансдифференцировки клеток в процессе репарации при МЭТ или ЭМТ, поскольку в норме EGF отвечает не только за стимуляцию пролиферации некоторых клеток, в т. ч. кератиноцитов и фибробластов, но и за процессы дальнейшей их дифференцировки [29]. Вследствие такого глубокого вовлечения в процесс зон НСК при ОИП он характеризуется развитием "сотового" легкого с аденоматозной гиперплазией с атипией и без таковой с последующим развитием бронхиолоальвеолярного рака легкого (13 (11 %) случаев).

Заключение

Таким образом, согласно данным проведенного исследования показано, что в патогенезе и морфогенезе ОИП важнейшую роль играет вовлеченность в процесс зон НСК легочной ткани. Глубина повреждения с захватом нескольких зон одновременно, с разрушением эпителиальных базальных мембран в последующем определяют ход репаративных процессов, структурные перестройки и в конечном счете – исход заболевания. Вероятно, что в основе неполноценной репарации при ОИП лежит нарушение процессов МЭТ / ЭМТ, о чем свидетельствует появление в зонах НСК клеток с иммунофибробластическим фенотипом, одновременно экспрессирующих маркеры мезенхимальной и эпителиальной дифференцировки, а также маркеры СК. Вероятно, что эти клетки, "латающие" разрушенные базальные мембраны в зонах НСК, можно рассматривать как маркерные, появление которых свидетельствует о патологической репарации легочной ткани в результате срыва программы МЭТ.

Литература / References

1. Коган Е.А. Фиброзирующий альвеолит – современные аспекты проблемы. *Архив патологии*. 1995; 1 (4): 5–11. / Kogan E.A. Idiopathic pulmonary fibrosis: current aspects. *Arkhiv patologii*. 1995; 1 (4): 5–11 (in Russian).
2. American Thoracic Society / European Respiratory Society. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165: 277–304. www.atsjournals.org
3. Bouros D., Nicholson A.C., Polychronopoulos V., du Bois R.M. Acute interstitial pneumonia. *Eur. Respir. J.* 2000; 15 (8): 412–418.
4. Nicholson A.G. Classification of idiopathic interstitial pneumonias: making sense of the alphabet soup. *Histopathology*. 2002; 41: 381–391.
5. Коган Е.А., Корнев Б.М., Попова Е.Н. и др. Интерстициальные болезни легких: Практическое руководство. М.: *Lummeppa*; 2007. / Kogan E.A., Kornev B.M., Popova E.N. et al. Interstitial lung disease: Practical handbook. Moscow: *Litterra*; 2007 (in Russian).
6. Guschall W., Liebertau G., Dittrich I., Schirpke C. Erkrankungsdauer und Todesursachen bei Patienten mit fibrosierender Alveolitis. *Lungenfibrose. Atem.-Lungenkrkh.* 1998; 24 (3): 10–116.
7. Johnson M.A., Kwan S., Snell N.J.C. et al. Randomized controlled trial comparing prednisolone alone with cyclophosphamide and low dose prednisolone in combination in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax*. 1989; 44: 280–288. DOI: 10.1136/thx.44.4.280.
8. Selman M., Ruiz V., Cabrera S. et al. TIMP-1, -2, -3 & -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279: 562–574.
9. Turner-Warwick M., Burrows B., Luburich P. et al. Cryptogenic fibrosing alveolitis: response to corticosteroid treatment and its effect on survival. *Thorax*. 1980; 35 (4): 593–599.
10. Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis challenges for the future. *Am J. Chest*. 2001; 120: 8–10.
11. Bilder D., O'Brien L.E. Beyond the niche: Tissue-level coordination of stem cell dynamics. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2013; 29: 107–136.
12. Polak J., ed. Cell Therapy for Lung Disease. London: *Imperial College Press*; 2010.
13. Демуря С.А., Коган Е.А., Пауков В.С. Морфология и молекулярные основы повреждения ниши стволовых клеток респираторного ацинуса при идиопатических интерстициальных пневмониях. *Архив патологии*. 2014; 76 (6): 28–36. / Demura S.A., Kogan E.A., Paukov V.S. Morphology and molecular basis of injury of the stem cell niches of respiratory acinus in idiopathic interstitial pneumonias. *Arkhiv patologii*. 2014; 76 (6): 28–36 (in Russian).
14. Andre C., Hampe A., Lachaume P. et al. (January 1997). Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes. *Genomics*. 1996; 39 (2): 216. DOI: 10.1006/geno.1996.4482. PMID 9027509.
15. Atlasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A.M. et al. OCT4 Spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *J. Stem Cells*. 2008; 26 (12): 3002–3267. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0530.
16. Yarden Y., Kuang W.J., Yang-Feng T. et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987; 6 (11): 3341–3351. PMID 2448137.
17. Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A. et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J. Cell. Biol.*

- 2006; 174 (2): 169–74. DOI: 10.1083/jcb.200603161. PMC 2064177. PMID 16831889.
18. Suga H., Matsumoto D., Eto H. et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem / progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009; 18 (8): 1201–1210. DOI: 10.1089/scd.2009.0003. PMID: 19226222.
 19. Nakaya Y., Kuroda S., Katagiri Y.T. et al. Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *J. Dev. Cell.* 2004; 7 (3): 425–438.
 20. Aho S., Uitto J. (March). 180-kD bullous pemphigoid antigen / type XVII collagen: tissue-specific expression and molecular interactions with keratin 18. *J. Cell. Biochem.* 1999; 72 (3): 356–367. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19990301)72:3<356::AID-JCB5>3.0.CO;2-M. PMID 10022517.
 21. Ueda Y., Fujita J., Bandoh S. et al. Expression of cytokeratin 19 mRNA in human lung cancer cell lines. *Int. J. Cancer.* 1999; 81 (6): 939–943.
 22. Zvaifler N.J. Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2006; 8 (3): 210.
 23. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 442–454.
 24. Thiery J.P., Sleeman J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006; 7: 131–142.
 25. Auersperg N., Pan J., Grove B.D et al. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 6249–6254.
 26. Baum B., Settleman J., Quinlan MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2008; 19 (3): 294–308.
 27. Davies J.A. Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta. Anat.* 1996; 156 (3): 187–201.
 28. Herbst R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 59 (Suppl. 2): 21–26. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2003.11.041. PMID 15142631.
 29. Коган Е. А., Тьонг Ф.В., Демура С.А. Молекулярные основы формирования вариантов идиопатического фиброзирующего альвеолита. *Архив патологии.* 2009; 71 (1): 12–18. / Коган Е. А., Тьонг Ф.В., Демура С.А. Molecular basis of different patterns of idiopathic pulmonary fibrosis. *Архив патологии.* 2009; 71 (1): 12–18. (in Russian).

Поступила 13.05.15
УДК 616.24-004-091.8
 Received May 13, 2015
UDC 616.24-004-091.8

Информация об авторах

Демура Софья Александровна – к. м. н., ассистент кафедры патологической анатомии им. А.И.Струкова ГБОУ ВПО "Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова" Минздрава России, тел.: (499) 708-37-65; e-mail: sarah3618@gmail.com
Коган Евгения Алтаровна – д. м. н., профессор кафедры патологической анатомии имени А.И. Струкова ГБОУ ВПО "Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова" Минздрава России, зав. отделением патоморфологии ФГБУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова" Минздрава России; тел.: (499) 708-37-65; e-mail: koganevg@gmail.com
Пауков Вячеслав Семенович – д. м. н., профессор, академик РАЕН, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой патологической анатомии им. А.И.Струкова ГБОУ ВПО "Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова" Минздрава России; тел.: (499) 708 37 65; e-mail: paukov@mma.ru

Authors information

Demura Sof'ya Aleksandrovna, PhD, Assistant Lecturer at the A.I.Strukov Department of Pathological Anatomy, State Institution "I.M.Sechenov First Moscow State Medical University", Healthcare Ministry of Russia; tel.: (499) 708-37-65; e-mail: sarah3618@gmail.com
Kogan Evgeniya Altarovna, MD, Head of Division of Pathomorphology, Federal Institution "Academician V.I.Kulakov Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology", Healthcare Ministry of Russia; Professor at the A.I.Strukov Department of Pathological Anatomy, State Institution "I.M.Sechenov First Moscow State Medical University", Health care Ministry of Russia; tel.: (499) 708-37-65; e-mail: koganevg@gmail.com
Paukov Vyacheslav Semenovich, MD, Academician of the Russian Academy of Natural Science, Professor, Head of A.I.Strukov Department of Pathological Anatomy, State Institution "I.M.Sechenov First Moscow State Medical University", Healthcare Ministry of Russia; Honored Scientist of Russian Federation; tel.: (499) 708-37-65; e-mail: paukov@mma.ru