

РОЛЬ TGF β -ИНДУКЦИИ И ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ МИОФИБРОБЛАСТОВ В ПАТОМОРФОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ МАРФАНА И МАРФАНОПОДОБНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ

Урываев А.М., Рудой А.С.

Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск

Ключевые слова: хронический гастрит, синдром Марфана, трансформирующий фактор роста β (TGF β), наследственные нарушения соединительной ткани.

Резюме. Установлено, что фоновые наследственные нарушения соединительной ткани (синдром Марфана и марфаноподобные состояния) являются неблагоприятным фоновым фактором течения хронического гастрита в виде разнонаправленных прогредиентных атрофических и фибротических процессов в слизистой оболочке желудка. Доказана ключевая роль расторможенной TGF β активности в фиброгенез-зависимой активации субэпителиальных миофибробластов (α -SMA+) с развитием особого морфогенетического варианта (патоморфогенеза) раннего хронического атрофического мультифокального гастрита в молодом возрасте.

Summary. In patients with Marfan syndrome and marfan-like states chronic gastritis was an unfavorable factor for the progression of the background atrophic and fibrotic processes in the gastric mucosa. It proved a key role disinhibited to TGF β activity-dependent activation of fibrogenesis of subepithelial myofibroblasts (α -SMA +) with the development of a special morphogenetic variants of early chronic atrophic multifocal gastritis at a young age.

Актуальность. Синдром Марфана (СМ) является классической «моделью» расстройства структуры и функции соединительной ткани, являясь предметом пристального внимания научных исследований в области изучения патофизиологических и молекулярных нарушений соединительной ткани. В патогенезе СМ и родственных ему марфаноподобных состояний (МПС) («overlap»-фенотипов) ключевое значение придают белку фибриллин-1 (FBN-1), который выполняет не только структурную, но и функциональную роль во внеклеточном матриксе. Указанный коллагеноподобный белок регулирует TGF β -

сигнализирующие функции, играя важнейшую роль в модуляции и биодоступности трансформирующего фактора роста β (TGF β) [1], при этом TGF β регулирует пролиферацию, дифференцировку, миграцию клеток и апоптоз, является наиболее мощным стимулятором образования миофибробластов (МФБ) и рассматривается как ключевой стимулятор фиброгенеза. TGF β – является медиатором, концентрация которого в слизистой оболочке желудка при неопластических процессах линейно нарастает, совпадая со стадиями опухолевой трансформации [2]. Продуктом высокой экспрессии TGF β в слизистой оболочке желудка является увеличение числа МФБ при повреждениях и новообразованиях вследствие TGF β -опосредованной трансдифференцировки существующих (резидентных) фибробластов, либо из мигрирующих в слизистую оболочку циркулирующих фиброцитов. К семейству МФБ традиционно относят разновидность стромальных клеток мезенхимного происхождения, классическим маркером которых является α -актин гладких миоцитов (α -SMA) [3]. Считается, что МФБ (α -SMA+) имея неограниченную способность к репликации и обладая высокой способностью к инвазии и миграции, могут индуцировать и/или поддерживать неопластический процесс [4].

Учитывая, что количество α -SMA прямо пропорционально локальному уровню TGF β в тканях, возникает вопрос, как сказывается «TGF β - парадокс» при рассматриваемых наследственных нарушениях соединительной ткани на состоянии слизистой оболочки желудка. На предыдущих этапах исследования у пациентов с СМ в молодом возрасте ($33 \pm 9,3$ лет) нами была установлена крайне высокая и значимая частота обнаружения таких предраковых состояний в слизистой оболочке желудка, как атрофия и кишечная метаплазия в 39% и 26% соответственно с их мультифокальным характером распространения в 8,6% случаев [5].

Современные представления о развитии рака желудка базируются на модели Correa P. (1985) [6] и представляют собой каскад морфологических последовательных изменений слизистой оболочки желудка от нормального ее состояния до ракового фенотипа, включающих хронический активный гастрит, атрофический гастрит, метаплазию и дисплазию с высоким риском трансформации в рак. Учитывая известную высокую вероятность развития рака желудка (с относительным риском увеличения в 9-16 раз) при наличии атрофии как в антральном, так и в фундальном отделах желудка [7], встает вопрос о дальнейшем изучении патоморфогенеза хронического мультифокального атрофического гастрита (с высокой частотой метапластического типа атрофии) у пациентов с СМ и МПС.

Цель: осуществить иммуногистохимическую оценку и изучить особенности морфогенеза и эпителиального восстановления (репарации) слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите у пациентов с СМ и МПС.

Материал и методы. Дизайн работы представлял когортное одномоментное исследование по типу «случай-контроль». Обследовано 89 пациентов с верифицированным хроническим гастритом, находящиеся на лечении в гастроэнтерологическом отделении ГУ «432 Главный военный клинический медицинский центр» (ГВКМЦ). Сформированы три группы: 1-я - пациенты с СМ

($n=23$; $33\pm 9,3$ лет; Ж:М / 7:16), 2-я - пациенты с МПС ($n=28$; $29\pm 9,0$ лет; Ж:М / 6:22) и 3-я группа контроля ($n=38$; $30,2\pm 8,8$ лет; Ж:М / 10:28) - пациенты с минимальными клиническими проявлениями нарушений соединительной ткани, не превышающими таковые в популяции.

Иммуногистохимическая оценка включала окрашивание препаратов с применением моноклональных антител к α актину гладких миоцитов (Abcam, ab7817), коллагену 3 (Biogenex, MU167-UC), поликлональных антител к трансформирующему фактору роста β -1 (Abcam, ab66043) с использованием системы визуализации (Biogenex, QD630-ХАКЕ)

Оценку иммуногистохимической реакции всех вышеперечисленных маркеров проводили с использованием программного обеспечения для морфометрии Argeo Image Score, с использованием алгоритма автоматически измеряющего распространенность и интенсивность коричневой окраски ДАБ и разделяющего интенсивность окрашивания на 3 уровня (желтые поля – слабовыраженная экспрессия, оранжевые – умеренное, красные поля – выраженная экспрессия). В дальнейшем рассчитывался показатель экспрессии (ПЭ), равный отношению числа позитивных пикселей к их общему числу (ПЭ=число позитивных пикселей/общее число пикселей на микрофотографии).

Статистическая обработка полученных данных произведена при помощи Correspondence Analysis ППП «Statistica 11.0». Полученные результаты обработаны статистически с вычислением медианы, 25-ого и 75-ого перцентилей. Для сравнительной характеристики признаков использовали методы: сравнение двух независимых выборок с помощью U-критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $p<0,05$. Для оценки взаимосвязи вычислялся коэффициент ранговых корреляций Спирмена.

Результаты и обсуждение. В целом при иммуногистохимическом исследовании микропрепаратов слизистой оболочки желудка позитивное окрашивание с антителами к TGF- β 1 было выявлено во всех случаях. Экспрессия TGF- β 1 была представлена окрашиванием различной степени интенсивности в эпителии и интерстициальной ткани в виде гомогенного или мелкогранулярного окрашивания в коричневый цвет, цитоплазматического окрашивания интерстициальных МФБ.

Выявлены достоверные различия в экспрессии TGF- β 1 при различных клинико-морфологических вариантах хронического гастрита (таблица 2). Обнаружен более высокий показатель экспрессии TGF- β 1 в группе с СМ и, в меньшей степени, с МПС по сравнению с контролем (72, $p<0,05$ и 330, $p=0,09$ соответственно). Второй закономерностью стало выявление у пациентов 1-й и 2-й групп более интенсивного, а также большего по площади окрашивания структур межклеточного вещества ($Z = 6,123$, $p < 0,01$) в субэпителиальной зоне, а также в собственной пластинке. Выявленные закономерности свидетельствуют об избыточной расторможенной активности TGF- β 1 в стенке желудка у пациентов с СМ и МПС.

Экспрессия α -SMA отмечалась в виде четкого (гомогенного или мелкогранулярного) цитоплазматического окрашивания интерстициальных МФБ, гладкомышечных клеток сосудов и отдельных клеток желудочного эпителия в коричневый цвет различной интенсивности (рис. 2).

Таблица 2. Иммуногистохимическая характеристика (экспрессия) TGF- β 1, α SMA, коллагена III в слизистой оболочке желудка при СМ и МПФ.

Группы сравнения		Показатели экспрессии			U критерий Манна-Уитни
		25%-й перцентиль	Медиана	75%-й перцентиль	
TGFβ1					
СМ	n = 23	0,07	0,09	0,13	72, p<0,05
МПФ	n = 27	0,04	0,06	0,1	330, p=0,09
Контроль	n = 36	0,03	0,05	0,07	
αSMA					
СМ	n = 23	0,16	0,22	0,29	265, p=0,04
МПФ	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
МПФ	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, МПФ – марфаноподобный фенотип

В целом при иммуногистохимическом исследовании микропрепаратов слизистой оболочки желудка позитивное окрашивание с антителами к α SMA также, как и в случае с TGF β -1, выявлялось во всех оцениваемых случаях и было представлено в виде умеренного цитоплазматического окрашивания клеток сосудов стромы слизистой оболочки и интенсивного – МФБ в собственной пластинке вблизи поверхностного эпителия и субэпителиальной зоне.

Выявлены достоверные различия в экспрессии α SMA, которые представлены в таблице 2. Морфогенетический вариант хронического гастрита у пациентов 1-й группы характеризовался различиями в виде увеличения экспрессии α SMA по сравнению с группой контроля (265, p=0,04), тогда как во 2-й группе обнаружена только тенденция к аналогичным проявлениям (112, p=0,12).

Позитивное окрашивание с антителами к коллагену III типа было обнаружено во всех исследованных случаях в виде окрашивания структур межклеточного матрикса субэпителиального слоя и собственной пластинки слизистой оболочки

желудка. Оценку экспрессии коллагена-III в препаратах проводили также с помощью программы Aregio Image Score с последующим расчетом ПЭ (таблица 2).

Выявлены различия в ПЭ коллагена III типа. Максимальная экспрессия коллагена-III отмечалась у пациентов 1-й и 2-й групп, однако, статистические различия выявлены только в 1-й группе в сравнении с группой контроля (272, $p < 0,05$), тогда как во 2-й группе обнаружена только тенденция к увеличению коллагена-III (121, $p = 0,1$).

Выявлена линейная связь между экспрессией α SMA и TGF β 1 ($r = 0,74$, $p < 0,05$), что соответствует уже имеющимся научным данным, полученным в эксперименте на слизистой оболочке толстой кишки (табл. 3). Учитывая известный факт увеличения экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса, в частности, коллагена I, III типа, под воздействием TGF β на интерстициальные клетки, была выявлена аналогичная взаимосвязь между экспрессией TGF β 1 и коллагеном III типа в слизистой оболочке желудка ($p < 0,05$).

Таблица 3. Взаимосвязь экспрессии TGF- β 1 с коллагеном III типа и α -SMA.

Иммуногистохимические маркеры		r (коэф-т корреляции)	p
TGF- β 1	α -SMA	$r = 0,74$,	$p < 0,007$
	Коллаген III	$r = 0,23$,	$p < 0,05$

Таким образом, у пациентов с СМ и с МПС происходит формирование специфического патоморфогенетического варианта хронического атрофического гастрита, что обусловлено избыточной сигнальной активностью и повышенной экспрессией ключевого стимулятора фиброгенеза – TGF β 1, способствующего избыточной активации субэпителиальных МФБ в слизистой оболочке желудка, раннему ее развитию атрофии/метаплазии.

Выводы:

1. Степень активации субэпителиальных МФБ (показатели экспрессии α SMA) и выраженность фиброза стромального матрикса слизистой оболочки желудка (показатели экспрессии коллагена типа III), нарастающие с фенотипической выраженностью наследственных нарушений соединительной ткани (в большей степени при СМ, в меньшей – при МПС), в сочетании с увеличением показателя экспрессии трансформирующего фактора роста- β 1 могут выступать в качестве морфогенетических предикторов предраковых состояний в слизистой оболочке желудка.

2. В 1-й группе пациентов с СМ установлено значимое увеличение степени и распространенности стромальной пролиферации / фиброза собственной пластинки слизистой оболочки желудка с высокой экспрессией коллагена III типа ($U = 272$, $p < 0,05$). Подобные изменения у пациентов с СМ объясняются сочетанным действием двух факторов – увеличением числа субэпителиальных МФБ (с высокой экспрессией α SMA, $U = 265$, $p = 0,04$) и усилением их синтетической активности под влиянием выраженной экспрессии TGF β ($U = 72$, $p < 0,05$). Результирующим эффектом

влияния обоих показателей является накопление белков ЭЦМ и нарастание степени стромального фиброза с разрастанием соединительной ткани в собственной пластинке, что ассоциировано с развитием атрофии как неметапластического, так и метапластического типа.

3. Во 2-й группе у пациентов с МПС ремоделирование межклеточного вещества в виде стромальной пролиферация в субэпителиальной зоне, а также собственной пластинки также характеризуется тенденцией ($p=0,09$) к повышению профиброгенной экспрессии $TGF\beta$ с увеличением количества клеток с миофибробластической дифференцировкой и накоплением в экстрацеллюлярном матриксе коллагена III типа ($p<0,1$).

Литература

1 Рудой А. С. TGF-beta-зависимый патогенез синдрома Марфана и родственных наследственных нарушений соединительной ткани //Артериальная гипертензия. – 2009. – Т. 15. – №. 2. – С. 223-226.

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

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

4 Powell D. W. et al. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2005. – Т. 289. – №. 1. – С. G2-G7.

5 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.

6 Рудой, А.С. Хронический гастрит при синдроме Марфана / А.М. Урываев, А. В. Полянская // Военная медицина. 2015. – № 2. – С. 41 – 44.

7 Correa P. (1985) Clinical implications of recent developments in gastric cancer pathology and epidemiology. Semin. Oncol.; 12: 2–10

8 Sipponen P. и соавт. Importance of atrophic gastritis in diagnostics and prevention of gastric cancer: Application of plasma biomarkers / P. Sipponen, D.Y. Graham // Scand. J. Gastroenterol. – 2007. – Vol.42. – N 1. – P.2-10.