

и септально-периацинарного внутридолькового фиброза также обнаруживается повышенное количество активированных α -SMA+ ПЗК

С помощью цифровой фотоморфометрии были установлены достоверные различия в экспрессии исследуемых маркеров между группами ПА и ХП. Так, относительная площадь экспрессии α -SMA в десмопластической строме ПА ПЖ определялась на уровне $28,54 \pm 6,09\%$, а аналогичный показатель в зонах тяжелого фиброза при ХП составил $18,69 \pm 6,67\%$ ($p < 0,05$). При этом показатели относительной площади фиброзного компонента, позитивно окрашенного методом Массон-трихром, в строме ПА ПЖ и зонах тяжелого фиброза при ХП составили $61,92 \pm 9,28$ и $57,54 \pm 7,03$ соответственно ($p > 0,05$). Таким образом, площадь α -SMA+ активированных ПЗК в десмопластической строме ПА ПЖ более чем в 1,5 раза статистически достоверно превышает аналогичный показатель в зонах тяжелого панкреатического фиброза при ХП. Увеличение количества α -SMA+ ПЗК коррелирует с увеличением Массон-позитивного соединительнотканного компонента стромы (коэффициент корреляции Пирсона r составил $+0,72$ в группе больных ПА ПЖ и $+0,65$ в группе больных ХП), что свидетельствует о наличии сильной прямой связи между количеством активированных ПЗК и площадью фиброза в строме при ПА ПЖ и средней силы прямой связи между этими показателями при ХП.

Выводы:

1. Результаты комплексного патогистологического, иммуногистохимического и фотоморфометрического исследования поджелудочной железы у больных протоковым раком и хроническим панкреатитом позволили установить, что развитию десмопластической реакции стромы протокового рака и прогрессии фиброза при панкреатите способствует пролиферация и увеличение количества α -SMA+ активированных панкреатических звездчатых клеток, синтезирующих избыток компонентов волокнисто-молекулярного матрикса.

2. Полученные результаты могут быть использованы в дифференциальной диагностике протокового рака и хронического панкреатита с тяжелым фиброзом в небольших по размеру трепанобиоптатах поджелудочной железы, представленных преимущественно стромой.

Литература

1. Туманский В.А. Тяжелый фиброз поджелудочной железы при хроническом панкреатите: основные патоморфологические составляющие, иммунофенотип фиброгенных клеток и коллагена / В.А. Туманский, И.С. Коваленко // Патология. – 2013. – №1(27). – С. 27–30.
2. Tumansky V.A. Heavy fibrosis of pancreas at chronic pancreatitis: main patomorphologic components, immunophenotype of fibrogenic cells and collagen / V.A. Tumansky, I.S. Kovalenko // Patology. – 2013. – № 1(27). – P. 27–30.
3. α -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study / M. Sinn, C. Denkert, J.K. Striefler [et al.] // British

Journal of Cancer. – 2014. – Vol. 111. – P. 1917–1923.

3. Brimienė V. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: a prospective study of 156 patients / V. Brimienė, G. Brimas, K. Strupas // Medicina (Kaunas). – 2011. – Vol. 47, N. 3. – P. 154–162.

4. Dabbs D.J. Diagnostic Immunohistochemistry / D.J. Dabbs. – 3rd ed. – New York: Ch. Livingstone, 2010. – 941 p.

5. Desmoplastic Reaction in Pancreatic Cancer. Role of Pancreatic Stellate Cells / M.V. Apte, S. Park, P.A. Phillips [et al.] // Pancreas. – 2004. – Vol. 29. – P. 179–187.

6. Korc M. Pancreatic cancer associated stroma production / M. Korc // American Journal of Surgery. – 2007. – Vol. 194, Iss. 4, Suppl. 1. – P. 84–86.

7. Pancreatic Cancer / J.P. Neoptolemos, R. Urrutia, J.L. Abbruzzese, M.W. Bschler (eds.). – Springer Science+Business Media, LLC, 2010. – 1390 p.

8. Overexpression of COL11A1 by Cancer-Associated Fibroblasts: Clinical Relevance of a Stromal Marker in Pancreatic Cancer / C. Garcha-Pravia, J.A. Galv6n, N. Guti6rrez-Corral [et al.] // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, Iss. 10. – e78327. doi:10.1371/journal.pone.0078327.

9. Rucki A.A. Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies / A.A. Rucki, L. Zheng // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – Vol. 20, Iss. 9. – P. 2237–2246.

10. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer / A. Neesse, P. Michl, K.K. Frese [et al.] // Gut. – 2011. – Vol. 60. – P. 861–868.

11. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications / M. Erkan, S. Hausmann, C.W. Michalski [et al.] // Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. – 2012. – Vol. 9. – P. 454–467.

12. Tumours of the exocrine pancreas / G. Kluppel, R.H. Hruban, D.S. Longnecker [et al.] // In: World Health Organization Classification of Tumours-Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System / S. Hamilton, L.A. Aaltonen (eds.). – Lyon: IARC Press, 2000. – P. 219–305.

ВОПРОСЫ ГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ И АДАПТАЦИИ: ИНФЕКЦИИ

Л.С. Быхалов, А.В. Смирнов

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ АПОПТОЗА BCL-2 И BAX В ЛЕГКИХ ПРИ ВИЧ/ТБ КОИНФЕКЦИИ

УДК 616.98.-097-022:616-002.5-091

В настоящем исследовании выявлено увеличение экспрессии Bcl-2 в зонах гранулематозного воспаления и в паренхиме легких, а также возрастание количества Bax-позитивных клеток с изменением соотношения экспрессии Bcl-2/Bax (коэффициент апоптоза). Баланс про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 определяет чувствительность клетки к проапоптотическим стимулам, что свидетельствует об активации в инфицированных клетках антиапоптотических механизмов при коинфекции ВИЧ/ТБ.

In this study increase of expression Bcl-2 in zones of granulomatous inflammation and in lung parenchyma is revealed as well as an increasing rate of Bax-positive cells with change in the ratio of expression Bcl-2/Bax (coefficient of apoptosis). The balance pro- and antiapoptotic proteins of Bcl-2 family defines sensitivity of the cell to proapoptotic incentives that indicates activation of anti-apoptotic mechanisms in infected cells at VICH/TB coinfection.

БЫХАЛОВ Леонид Сергеевич – к.м.н., ассистент кафедры патологич. анатомии Волгоградского государственного медицинского ун-та, докторант, leonby-vgd@yandex.ru; **СМИРНОВ Алексей Владимирович** – д.м.н., проф., зав. кафедрой ВГМУ, alexey-smirnov@rambler.ru.

Введение. Глобальные медико-социальные проблемы, касающиеся ВИЧ-инфекции и туберкулёза, до на-

стоящего времени остаются нерешенными и несут угрозу всему человечеству. Заболеваемость туберкулёзом

среди ВИЧ-инфицированных лиц существенно увеличилась в последние несколько лет, что позволяет предположить ряд общих социальных и патогенетических закономерностей и механизмов развития коинфекции ВИЧ/ТБ, а также взаимное влияние друг на друга инфекционных агентов [2,8]. Особенностью клинико-морфологической картины сочетанной коинфекции ВИЧ/ТБ является генерализация туберкулёзного процесса с множественной гематогенной диссеминацией микобактерий туберкулёза (МБТ) с образованием фокусов казеозного некроза, инфильтратов в различных органах, при этом поражение легких отмечается в 100% случаев [1]. Одним из ведущих механизмов гибели клеток при сочетании туберкулёза и ВИЧ-инфекции является апоптоз [5]. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные регуляции апоптоза [5-7], роль белков Bcl-2 и Bax при коинфекции ВИЧ/ТБ остается малоизученной.

Цель исследования: оценить степень экспрессии Bcl-2 и Bax в очагах гранулематозного воспаления в легких больных, умерших от генерализованного туберкулёза на фоне ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы. Исследован аутопсийный материал (n=30) умерших пациентов с ВИЧ/ТБ генерализованной коинфекцией, стадия 4 (группа 1). В группу сравнения (группа 2) вошли аутопсийные случаи (n=30) с моноинфекцией, с остро прогрессирующими формами туберкулёза легких. Образцы легких извлекались из трупов по общепринятым методикам в ранние сроки после смерти больного, фиксировались в 10%-ном растворе забуференного формалина в течение суток при комнатной температуре, промывались и подвергались стандартной гистологической проводке. Из парафиновых блоков были изготовлены гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с целью определения экспрессии биомаркеров Bcl-2 и Bax проводили с использованием кроличьих моноклональных антител фирмы Spring Bioscience. Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с высокотемпературной демаскировкой антигенов, исследование микропрепаратов проводили на микроскопе «Micros» (Austria), производили микрофотосъемку цифровой фотокамерой «Olympus» (Japan), выраженность экспрессии биомаркеров оценивали с применением про-

граммы Image Analysis с последующим морфометрическим анализом. Статистическую обработку материалов осуществляли с помощью прикладной программы Statistica 6.0, разработанной для медико-биологических исследований, за величину уровня статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При исследовании микропрепаратов легких, окрашенных гематоксилином и эозином, в 1-й группе исследования наблюдались полиморфные изменения. В паренхиме легких отмечались участки эмфиземы, чередовавшиеся с ателектазами. Наблюдалось утолщение межальвеолярных перегородок. В альвеолах присутствовали слушечные эпителиальные клетки, макрофаги, большая часть которых была со светлой цитоплазмой, и различное количество серозного, геморрагического и смешанного экссудата. Кроме того, в просветах альвеол наблюдались казеозные массы, а также тканевый детрит.

В отличие от изменений, обнаруженных во 2-й группе (моноинфекции ТБ), характеризовавшихся наличием в легких эпителиоидно-клеточных гранулем туберкулоидного типа с гигантскими многоядерными клетками Пирогова-Лангханса, значительным количеством малых лимфоцитов и различных по величине фокусов казеозного некроза, в 1-й группе выявлялись зоны формирующегося продуктивного воспаления, представленные очагами лимфоцитарной инфильтрации, локализованными чаще в периваскулярных отделах. Отмечались очаги слабо выраженного фиброза и продуктивного воспаления в субплевральных отделах с незначительной гистиоцитарной инфильтрацией и участки формирующихся пневмонийогенных каверн с различными по выраженности инфильтративными явлениями от умеренных до выраженных.

При ИГХ-исследовании легких с использованием моноклональных антител к Bcl-2 в 1-й группе (ВИЧ/ТБ) исследования вне зон воспалительного инфильтрата отмечалась выраженная и резко выраженная (3-4 балла) цитоплазматическая экспрессия иммунореактивного материала (ИРМ) в лимфоцитах, альвеолярных макрофагах, гранулоцитах, эпителиальных и эндотелиальных клетках. В зонах специфического воспаления отмечена слабо выраженная (1 балл) экспрессия ИРМ. При проведении ИГХ с использованием моноклональных антител к Bax в 1-й группе исследования (ВИЧ/ТБ) вне зон воспалительного инфильтрата отмечалась умеренная и выраженная (2-3 балла) цитоплазматическая экспрессия ИРМ, а в фокусах специфического воспаления – выраженная и резко выраженная экспрессия ИРМ (3-4 балла).

При ИГХ-исследовании легких во 2-й группе (при моноинфекции ТБ) с использованием моноклональных антител к Bcl-2 в большинстве случаев вне зон воспаления была обнаружена слабая и умеренная степень (1-2 балла) цитоплазматической экспрессии ИРМ и слабая (0-1 балл) экспрессия – в гранулематозных инфильтратах. При ИГХ-исследовании с использованием моноклональных антител к Bax отмечалась умеренная и выраженная (2-3 балла) экспрессия ИРМ вне зон специфического воспаления, а в зонах казеозно-пневмонических очагов она была слабо выраженная (1 балл).

Для объективизации оценки морфологических изменений в различных областях легких проведен программный морфометрический анализ (табл.1-2). При ИГХ-исследовании легких с использованием моноклональных антител к Bcl-2 отмечены различия в значениях морфометрических параметров: вне зон воспаления в 1-й группе

Таблица 1

Морфометрические параметры при исследовании экспрессии Bcl-2 в легких умерших с моноинфекцией ТБ и с коинфекцией ВИЧ/ТБ

Моноинфекция ТБ (группа 2)				Кoineкция ВИЧ/ТБ (группа 1)			
Пл.	Пер.	Отн. пл.	ИО, УЕ	Пл.	Пер.	Отн. пл.	ИО, УЕ
вне зон воспаления							
0,71±0,05	1,97±0,09	5,4±0,79	101,6 [107;128]	0,49±0,07	1,56±0,1	11,45±0,55	89,55 [79;105,5]
в фокусе воспаления							
0,42±0,14	1,78±0,41	0,26±0,01	100 [52;125]	1,06±0,35	2,0±0,37	1,29±0,07	106,8 [60;128]

Примечание. В табл. 1–2 Пл – средняя площадь иммунопозитивных областей, мкм², Пер – средний периметр иммунопозитивных областей, мкм, Отн. пл. – относительная площадь иммунопозитивных областей, %, ИО, УЕ – интенсивность окрашивания, условные единицы.

Таблица 1

Морфометрические параметры при исследовании экспрессии Вах в легких умерших с моноинфекцией ТБ и с коинфекцией ВИЧ/ТБ

Моноинфекция ТБ (группа 2)				Коинфекция ВИЧ/ТБ (группа 1)			
Пл.	Пер.	Отн. пл.	ИО, УЕ	Пл.	Пер.	Отн. пл.	ИО, УЕ
вне зон воспаления							
0,56±0,05	1,99±0,11	11,5±0,76	141 [104;152]	0,6±0,05	2,24±0,16	11,5±0,7	86,8 [88;109]
в фокусе воспаления							
0,64±0,05	2,4±0,14	3,18±0,13	133,4 [97;151]	0,26±0,02	1,27±0,04	12,1±0,9	152 [196;133]

относительная площадь иммунопозитивных объектов была в 2 раза выше ($p<0,001$) по сравнению с группой сравнения (группа 2), а в фокусе воспаления этот параметр увеличился в 5 раз ($p<0,001$) по сравнению с моноинфекцией ТБ.

При ИГХ-исследовании легких с использованием моноклональных антител к Вах выявлено изменение морфометрических параметров: увеличение относительной площади иммунопозитивных областей в фокусе воспаления в 4 раза ($p<0,001$) в группе 1 при ВИЧ/ТБ коинфекции при уменьшении средней площади иммунопозитивных объектов почти в 3 раза ($p<0,001$).

Таким образом, нами выявлено увеличение уровня Вc1-2 в различных зонах легких при ВИЧ/ТБ коинфекции с максимальной экспрессией в фокусах воспаления, а также возрастание уровня экспрессии Вах в казеозно-некротических очагах. Различная экспрессия белков Вc1-2 и Вах при моноинфекции туберкулеза и при коинфекции ВИЧ/ТБ, возможно, свидетельствует об изменении регуляции механизмов клеточной гибели при сочетанной инфекции, что приводит к большей инициации апоптоза и наиболее выражено в фокусах продуктивного воспаления.

Отмеченное увеличение Вах как в макрофагах, содержащих ядра, так и в гибнущих эпителиоидных клетках в очагах казеозного некроза рассматривается как фактор, способствующий расширению зон тканевой деструкции. Альвеолярные макрофаги относят к быстро гибнущим клеткам моноцитарного происхождения, и при отсутствии их активации Т-лимфоцитами, количество которых резко снижено на поздних стадиях ВИЧ-инфекции, процесс запуска апоптоза наступает раньше

[4–6], что, возможно, ведет к гибели незрелых макрофагов в формирующихся очагах казеозного некроза. Данная гипотеза подтверждает полученные нами ранее результаты, демонстрирующие расширение площади фокусов казеозного некроза в очагах продуктивного воспаления при ВИЧ/ТБ у лиц с наркотической зависимостью и низкими показателями CD 4(+) лимфоцитов по данным морфометрического исследования [3].

Заключение. Таким образом, выявленное в нашем исследовании увеличение экспрессии Вc1-2 в зонах гранулематозного воспаления и в паренхиме легких при коинфекции ВИЧ/ТБ и возрастающее изменение соотношения экспрессии Вc1-2/Вах (коэффициент апоптоза) свидетельствует об активации в инфицированных клетках антиапоптозных механизмов [5].

Обнаружено, что при коинфекции ВИЧ/ТБ увеличивается интенсивность и количество Вc1-2- и Вах-позитивных клеток. Выраженность апоптоза, зависящая от баланса про- и антиапоптозных белков семейства Вc1-2, определяющих чувствительность клетки к проапоптозным стимулам, выше в фокусах продуктивного воспаления в легких при коинфекции ВИЧ/ТБ.

Литература

1. Быхалов Л.С. Причины смерти и патоморфологическая характеристика органов при туберкулезе, ассоциированном с ВИЧ-инфекцией / Л.С. Быхалов, Н.Н. Седова, В.В. Деларю // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – № 3. – С. 64–68.
2. Быхалов Л.С. Causes of death and pathomorphological characteristics of organs in tuberculosis associated with HIV infection / L.S. Bykhalov, N. N. Sedova, V. V. Delaryu // Bulletin of Volgograd state medical University. – 2013. – № 3. – P. 64–68.

3. Быхалов Л.С. Характеристика патоморфологических изменений в легких умерших лиц при ко-инфекции ВИЧ/туберкулез на фоне инъекционной наркомании / Л.С. Быхалов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7–5. – С. 916–920.

Bykhalov L.S. Characteristic pathological changes in lungs from deceased persons with co-infection HIV/TB injectable drug / L.S. Bykhalov // Fundamental research. – 2014. – № 7–5. – P. 916–920.

4. Быхалов Л.С. Морфометрическая характеристика специфического продуктивного воспаления в легких у лиц, умерших от ко-инфекции ВИЧ/туберкулез, с учетом прижизненных девиаций / Л.С. Быхалов, А.В. Смирнов, П.А. Хлопонин // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – №4. – С. 98–101.

Bykhalov L.S. Morphometric characteristics of specific productive inflammation in the lungs of patients who died from co-infection HIV/TB subject to lifetime deviations / L.S. Bykhalov, A.V. Smirnov, P.A. Khloponin // Bulletin of Volgograd state medical University. – 2014. – №4. – P. 98–101.

5. Быхалов Л.С. Миелопероксидазная иммунопозитивная реакция в легких умерших больных при генерализованном туберкулезе в сочетании с ВИЧ-инфекцией / Л.С. Быхалов // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – №2. – С. – 130 – 131.

Bykhalov L.S. Myeloperoxidase immunopositive reaction in the lungs of deceased patients with generalized tuberculosis combined with HIV infection / L.S. Bykhalov // International journal of experimental education. – 2015. – №2. – P. – 130 – 131.

6. Пичугина А.В. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции / А.В. Пичугина, А.С. Апт // Туберкулез и болезни легких. – 2005. – №12. – С. 3 – 7.

Pichugina A.V. Apoptosis of immune cells during tuberculosis infection / A.V. Pichugina, A.S. Apt // Tuberculosis and lung disease. – 2005. – №12. – P. 3 – 7.

7. Лепеха Л.Н. Макрофаги и дендритные клетки легких / Л.Н. Лепеха // Респираторная медицина: Руководство под ред. акад. РАМН А.Г. Чучалина. Том 1. – М., 2007. – С.75–79.

Lepekha L.N. Macrophages and dendritic cells of the lungs / L.N. Lepekha // Respiratory medicine. Guide edited by academicians of the Russian Academy of medical Sciences AG. Chuchalina. Vol 1,– M., 2007 – P. – 75–79.

8. Downing J.Z., Pasula R., Wright J.R., Twigg H.L. Surfactant protein a promotes attachment of Mycobacterium to alveolar macrophages during infection high human immunodeficiency virus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – 11. – P. 4848 – 4852.

9. Rodriguez M.E., Loyd C.M., Ding X., [et al.]. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside 6 (PIM6) up-regulates TCR-triggered HIV-1 replication in CD4+ T cells. PLoS One. 2013;8(11):e80938.