

УДК 616-002-036.1-039.35-008.8-092.18-092.9

© С. В. Татарко, 2010.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТАРНОЙ РЕАКЦИИ ОЧАГА ВТОРИЧНО ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

С. В. Татарко*Харьковский национальный медицинский университет г. Харьков.*

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTIC REACTION OF SECONDARY CHRONIC INFLAMMATORY FOCUS

S.V. Tatarko

SUMMARY

According to immunohistochemical studies, at secondary chronic inflammation pronounced lymphocytic reaction with considerable prevalence of cellular over humoral component is observed. This is manifested by pronounced increase of the number of T-cells comparing to B-cells. Intensive synthesis of IgE and, comparing to this, lower synthesis of IgM and IgG are observed. At the same time at early terms of inflammation (up to 5 days) T-helpers predominate over T-suppressors, while in later terms it is vice versa.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІМФОЦИТАРНОЇ РЕАКЦІЇ ВОГНИЩА ВТОРИННО ХРОНІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ

С. В. Татарко

РЕЗЮМЕ

За даними імуногістохімічного дослідження, при вторинно хронічному запаленні у вогнищі спостерігається виражена лімфоцитарна реакція з переважанням клітинної імунної ланки над гуморальною. Останнє проявляється вираженим перевищенням кількості Т-лімфоцитів над В-лімфоцитами. Відбувається інтенсивний синтез ІgЕ і, порівняно з цим, більш низький – ІgМ і ІgG. В той же час серед популяції Т-лімфоцитів в ранні строки запалення (до 5-ї доби) переважають Т-хелпери над Т-супресорами, а в більш пізні – навпаки.

Ключевые слова: вторично хроническое воспаление, лимфоциты, иммуногистохимия.

Воспаление продолжает оставаться одной из ключевых проблем современной теоретической и практической медицины.

Особое значение имеет проблема затяжного – подострого и вторично хронического воспаления, поскольку осложнения воспаления и необычные по течению воспалительные процессы, в том числе хронизация воспаления, характеризуются утратой воспалительной реакцией своей эволюционно-биологической защитно-приспособительной сущности и превращением ее в самостоятельный патогенный фактор [1-3].

В то же время, острые воспалительные процессы чаще, чем раньше, принимают затяжное течение, и возрастает количество первично хронических воспалительных заболеваний, что, по-видимому, связано с ухудшением экологической ситуации и снижением общей и иммунологической реактивности под неблагоприятным воздействием факторов внешней среды [4, 5]. Поиск и понимание причин и механизмов хронизации воспаления являются ключевыми

вопросами в изучении хронических воспалительных заболеваний [6, 7].

Ранее на нашей кафедре были изучены в подробной динамике лимфоцитарная реакция очага вторично хронического воспаления [8, 9], а также морфофункциональное состояние, в том числе иммуногистохимическими методами, центральных (тимус) [10] и периферических (селезенка) [11] органов иммунной системы при этом виде воспаления.

Цель исследования – иммуногистохимическая характеристика лимфоцитарной реакции очага вторично хронического воспаления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты поставлены на 66 крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г. Все процедуры с животными, а также выведение животных из эксперимента путем декапитации проводили под анестезией с использованием диэтилового эфира.

Воспаление вызывали подкожным введением в область бедра 5 мг 1-карагинена (“Sigma”, США) в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия [12].

Исследования проводили, начиная с 6-го ч и по 28-е сут воспаления. Кусочки тканей очага фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем подвергали стандартной проводке через спирты возрастающей концентрации, после чего заливали парафином и делали серийные срезы толщиной 5-6 мкм.

Иммуногистохимические исследования проводили прямым методом Кунса по методике Brosnan [13]. Иммунные клетки дифференцировали с помощью крысиных моноклональных антител ("Serotec", Великобритания) к различным типам клеток. Использовали антитела к CD3-антигену (общие Т-лимфоци-

ты), CD4 (Т-лимфоциты-хелперы), CD8 (Т-лимфоциты-супрессоры), CD45RA (В-лимфоциты), а также к клеткам-продуцентам иммуноглобулинов (IgE, G и M).

Идентификацию клеток проводили в люминесцентном микроскопе Jenaval (Karl Zeiss, Йена, Германия) с использованием светофильтра $\lambda = 480/520$ нм, при увеличении $\times 400$.

Сначала проводили подсчет общего количества клеток в световом поле, затем микроскоп переводили в режим флуоресценции и подсчитывали количество "светящихся" клеток. На основании этого рассчитывали процентное содержание данного вида клеток по формуле:

$$\frac{\text{Число флуоресцирующих клеток в режиме отраженного света}}{\text{Общее число клеток в режиме проходящего света}} \times 100\%$$

Неспецифическое свечение определяли по окрашиванию соответствующими изоспецифическими контролями. Контролем служили интактные крысы, у которых после забоя забирали кусочки тканей в области бедра, соответствующей очагу воспаления.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента на ПЭВМ «Pentium-4», а также с помощью пакетов прикладных программ для ПЭВМ (S-Plus 2000), «Excel» [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При иммуногистохимическом выявлении клеток установлено, что в контроле они не обнаруживались.

Экспрессия CD3⁺-клеток обнаруживалась на 6-й ч, быстро повышалась и к 3-м сут достигала максимума, после чего постепенно снижалась вплоть до 28-х сут (таблица).

Количество CD4⁺-клеток постепенно увеличивалось с 6-го ч до 3-х сут, когда достигало максимума, и затем медленно снижалось до конца эксперимента.

Число CD8⁺-клеток повышалось в период с 6-го ч до 3-х сут, когда достигало пика, снижалось на 5-е сут, вновь возрастало на 10-е–14-е, когда их число было максимальным, и далее уменьшалось на 21-е–28-е сут. Экспрессия CD45RA⁺-клеток постепенно повышалась с 6-го ч до 10-х сут, когда достигала пика, и далее постепенно уменьшалась до 28-х сут.

Количество IgE⁺-клеток постепенно увеличивалось в период с 6-го ч до 3-х сут, когда их число было максимальным, снижалось на 5-е сут, вновь повышалось на 7-е сут, падало на 10-е сут, вновь увеличивалось на 14-е–21-е сут, а на 28-е сут они не обнаруживались.

IgG⁺-клетки отсутствовали на 6-й ч и обнаруживались на 1-е сут, их количество повышалось до 3-х сут, достигая своего пика, снижалось на 5-е–10-е сут и вновь повышалось на 14-е и 21-е сут с последующим снижением к 28-м сут.

Число IgM⁺-клеток также постепенно возраста-

ло с 6-го ч до 7-х сут, когда оно было максимальным, и далее постепенно уменьшалось до 21-х сут, а на 28-е сут они не обнаруживались.

Таким образом, при вторично хроническом воспалении в очаге обнаруживалось значительное количество Т-лимфоцитов, которое достигало максимума на 3-и сут.

При этом появлялись как Т-хелперы, так и Т-супрессоры с пиком на 3-и сут. Содержание Т-хелперов было значительно выше, чем Т-супрессоров, в период с 6-го ч до 2-х сут и на 5-е сут, тогда как на 3-и сут и с 7-х до 28-х сут происходило наоборот.

Число В-лимфоцитов было гораздо ниже, чем Т-лимфоцитов практически во все сроки, и пик их наблюдался значительно позже – на 10-е сут вместо 3-х. Что касается Ig⁺-клеток, то наибольшая экспрессия наблюдалась со стороны IgE⁺-клеток.

В то же время реакция IgG⁺- и IgM⁺-клеток наблюдалась в период, соответственно, с 1-х до 28-х сут и с 6-го ч до 21-х сут с пиками на 3-и и 7-е сут.

Приведенные результаты во многом совпадают с динамикой количества лимфоцитов в очаге, полученной при изучении лейкоцитарной динамики очага. Количество лимфоцитов уменьшалось к 1-м сут (3,0%), затем восстанавливалось и постепенно достигало максимума к 5-м сут (18,7%), и повторно – к 14-м и 21-м сут (18,3% и 17,5%) [9].

Быстрое увеличение количества Т-лимфоцитов в очаге совпадает с развитием в тимусе на 2-е–3-и сут акцидентальной трансформации (II–III фаз) с последующей его гиперплазией, повышением до 28-х сут плотности тимоцитов в коре и мозговом веществе, а также плотности лимфоцитов в Т-зоне селезенки.

При этом количество CD3⁺-клеток в тимусе было близким к исходному, а в селезенке – снижено до 21-х сут [10, 11].

В то же время динамика хелперной и супрессорной активности лимфоцитов в очаге в основном совпадает с таковой в тимусе и селезенке.

Таблица

Сроки исследования	Контроль (интактные крысы)				Группа I (интактные крысы)				Группа II (интактные крысы)				
	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ	СДЖ
Холестерин	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 суток	3,9/ 0,11*	9,16 0,31*	3,86 1,31*	1,83 0,5*	36,70 1,11*	0	0	0	0,35 0,35*				
10 суток	18,98 3,49*	23,29 3,20*	8,00 1,88*	10,73 0,71*	11,05 3,60*	1,38 1,58*	1,38 1,58*	2,22 1,00*					
20 суток	19,05 1,00*	21,28 3,6*	13,69 1,21*	11,22 1,28*	16,10 1,30*	11,53 1,59*	11,53 1,59*	19,75 2,2*					
30 суток	19,15 2,60*	35,71 1,21*	36,56 1,55*	18,02 1,02*	58,38 1,29*	10,31 1,61*	10,31 1,61*	26,21 1,23*					
50 суток	13,09 1,83*	25,89 3,78*	12,78 2,03*	78,31 0,61*	21,79 2,12*	19,05 2,11*	19,05 2,11*	30,06 6,69*					
70 суток	12,08 2,19*	21,71 2,00*	26,81 5,62*	13,11 1,91*	37,11 5,11*	15,76 0,93*	15,76 0,93*	11,61 2,69*					
100 суток	37,59 1,11*	13,21 1,15*	30,55 1,6*	11,78 2,31*	12,71 5,15*	10,93 0,81*	10,93 0,81*	11,22 0,96*					
110 суток	23,86 1,71*	10,15 2,51*	39,85 1,53*	22,89 5,56*	21,11 1,52*	21,11 1,52*	21,11 1,52*	11,71 1,53*					
210 суток	21,75 1,66*	10,03 3,71*	20,96 1,79*	17,36 1,85*	21,23 5,10*	28,21 3,3*	28,21 3,3*	11,7 0,96*					
280 суток	11,50 0,83*	6,32 3,26*	21,61 6,99*	51,71 1,16*	0	11,61 1,05*	11,61 1,05*	0					

Примечание: * – p ≤ 0,001 по сравнению с контролем (интактные крысы).

Значительное повышение количества В-лимфоцитов в очаге до 10-х сут с последующим постепенным снижением коррелирует с гиперплазией фолликулов селезенки, повышением плотности лимфоцитов в В-зоне до 5-х сут с последующим ее снижением с 10-х до 28-х сут [11].

Что касается Ig^+ -клеток, то динамика их количества в очаге также совпадает с таковой в селезенке. В последней повышение количества IgE^+ -клеток было значительно более выраженным и продолжительным (с 1-х до 28 сут), чем IgG^+ - и IgM^+ -клеток (2-е–10-е сут) [11].

ВЫВОДЫ

По данным иммуногистохимического исследования, при вторично хроническом воспалении в очаге наблюдается выраженная лимфоцитарная реакция с преобладанием клеточного иммунного звена над гуморальным. Последнее проявляется выраженным превышением количества Т-лимфоцитов над В-лимфоцитами. Происходит интенсивный синтез IgE и более низкий – IgM и IgG. В то же время среди популяции Т-лимфоцитов в ранние сроки воспаления (до 5-х сут) преобладают Т-хелперы над Т-супрессорами, а в более поздние – наоборот.

Перспективы дальнейших исследований в этом направлении состоят, в частности, в выяснении иммуногистохимических особенностей лимфоцитарной реакции очага при первично хроническом неиммунном воспалении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маянский Д. Н. Хроническое воспаление / Д. Н. Маянский. – М.: Медицина, 1991. – 272 с.
2. Клименко Н. А. Общие принципы противовоспалительной терапии / Н. А. Клименко // Харьк. мед. журнал. – 1997. – № 1. – С. 5–11.
3. Патогенетические аспекты хронического воспаления / В. С. Пауков, Б. Б. Салтыков, Н. Г. Ермакова, С. В. Шашлов // Арх. патологии. – 1998. – № 1. – С. 34–38.
4. First International Symposium on Influenza and Other Respiratory Viruses: summary and overview: Kapalua, Maui, Hawaii, December 4-6, 1998 / L. Kaiser, R. B. Couch, G. J. Galasso [et al.] // Antiviral Res. – 1999. – Vol. 42, № 3. – P. 149-175.
5. Физиология иммунной системы и экология / В. А. Черешнев, Н. Н. Кеворков, Б. А. Бахметьев [и др.] // Иммунология. – 2001. – № 3. – С. 12–16.
6. Воспаление: руководство для врачей / под ред. В. В. Серова, В. С. Паукова. – М.: Медицина, 1995 – 640 с.
7. Weiss U. Inflammation / U. Weiss // Nature. – 2008. – Vol. 454, № 7203. – P. 427.
8. Обоснование модели хронизирующегося (вторично хронического) воспаления / Н.А. Клименко, С.В. Татарко, А.Н. Шевченко, Г.И. Губина-Вакулик // Эксперим. і клін. мед. – 2007. – №2. – С. 12-17.
9. Клименко Н. А. Клеточный состав и экспрессия адгезивных молекул очага подкожного карагигенового асептического воспаления у крыс в динамике / Н. А. Клименко, А. Н. Шевченко // Український морфологічний альманах. – 2003. – Т. 1, № 2. – С. 30-32.
10. Клименко Н.А. Морфофункциональное состояние тимуса в динамике вторично хронического воспаления / Н.А. Клименко, С.В. Татарко, И.В. Сорокина // Медицина сьогодні і завтра. – 2008. – № 2. – С. 72-76.
11. Клименко Н.А. Морфофункциональное состояние селезенки в динамике вторично хронического воспаления / Н.А. Клименко, С.В. Татарко, И.В. Сорокина // Эксперим. і клін. мед. – 2008. – №3. – С. 17-20.
12. Клименко Н. А. Роль лейкоцитов в реакции тучных клеток очага воспаления / Н. А. Клименко // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1993. – Т. 116, №9. – С. 249-253.
13. Brosman M. Immunofluorescence vysetrovanie formalinovego materialu / M. Brosman // Cs. Patol. – 1979. – Vol. 15, № 4. – P.215–220.
14. Кулаичев А. П. Методы и средства анализа данных в среде Windows STADIA / А. П. Кулаичев. – М.: Информатика и компьютеры, 1999. – 341 с.