

УДК 616-091:616.24-002.5:616-002:616-002:616.155.3

© И.В. Сорокина, Т.Г. Филоненко, 2013.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ОЦЕНКА ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОГО ИНДЕКСА CD4/CD8 В ОЧАГЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

¹ И. В. Сорокина, ²Т.Г. Филоненко¹Кафедра патологической анатомии (зав. кафедрой - проф. В.Д. Марковский), Харьковский национальный медицинский университет;²Кафедра патологической анатомии (зав. кафедрой - доц. Н.Ю. Новиков), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь.

PECULIARITIES OF T-LYMPHOCYTES EXPRESSION AND ESTIMATION OF IMMUNOREGULATORY INDEX CD4/CD8 IN THE FOCUS OF SPECIFIC INFLAMMATION WITH FIBRO-CAVERNOUS PULMONARY TUBERCULOSIS

I.V. Sorokina, T.G. Filonenko

SUMMARY

It is determined, that CD4+ and CD8+ the T-cell are localized in the fibrotic cavity's wall with specific inflammation's focus regardless of the bacteria excretion. A peculiarity is predominance of cytotoxic CD8+ T-cells regardless of the bacteria excretion. The immunoregulatory indexes of CD4/CD8 are in MBT+ is $0,58 \pm 0,04$ and MBT- is $0,75 \pm 0,04$, which can be the criterion of diagnostics of of cellular immune aresponse's violation in focus of specific inflammation.

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ Т-ЛІМФОЦИТІВ І ОЦІНКА ІМУНОРЕГУЛЯТОРНОГО ІНДЕКСУ CD4/CD8 У ВОГНИЩІ СПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ ПРИ ФІБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОМУ ТУБЕРКУЛЬОЗІ ЛЕГЕНІВ

I.V. Сорокіна, Т.Г. Філоненко

РЕЗЮМЕ

Встановлено, що CD4+ і CD8+ Т-лімфоцити локалізуються в стінці фіброзної каверни у вогнищах специфічного запалення незалежно від бактеріовідділення. Особливістю є переважання цитотоксичних CD8+ Т-лімфоцитів незалежно від бактеріовідділення. Визначені імунорегуляторні індекси CD4/CD8 при MBT+ ($0,58 \pm 0,04$) і MBT- ($0,75 \pm 0,04$), які можуть бути критерієм діагностики порушення клітинної імунної відповіді при фіброзно-кавернозному туберкульозі у вогнищах специфічного запалення.

Ключевые слова: фиброзно-кавернозный туберкулез, Т-лимфоциты, иммуногистохимия.

Одним из инфекционных заболеваний, имеющее в настоящее время глобальное распространение, является туберкулез. Многочисленные научные исследования, доклады ВОЗ, опубликованные в последние десятилетия, подчеркивают, что около трети населения земного шара инфицированы микобактерией туберкулеза [15]. Заметное ухудшение эпидемиологической обстановки регистрируется и в Украине [5].

В патогенезе туберкулеза перестройка иммунной системы играет весьма значительную роль. Многочисленные научные исследования показывают, что выраженность Т-клеточной иммуносупрессии сопряжена с активацией течения туберкулеза легких и во многом определяет риск неблагоприятного исхода заболевания [2,8]. Несмотря на то, что наибольшая научная информация по изучению роли лимфоцитов и макрофагов в формировании клеточного иммунитета при туберкулезе представлена весьма широко, следует подчеркнуть, данная проблема

остаётся в фокусе современных исследований и постоянно пополняется новыми научными фактами [10,12,13,16]. Так, оценка уровней CD3+, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов наиболее изучены в периферической крови, изменения соотношений которых являются важным маркером формирования иммунной недостаточности, в том числе и нарушений антигенспецифического системного ответа при туберкулезе [3,4]. Кроме того, в последние годы большое значение уделяют изучению роли CD8+ Т-лимфоцитов, их способности распознавать макрофаги, которые фагоцитировали микобактерии туберкулеза (МБТ), и приводит их к гибели непосредственно в очаге воспалительной реакции [7,11].

Однако, в научной литературе практически отсутствуют данные об экспрессии маркеров Т-лимфоцитов в очагах туберкулезного поражения. Немногочисленные результаты исследований весьма противоречивы и представлены, в основном, в экспериментальных моделях. Одни авторы отмечают пре-

обладание в очаге специфического воспаления CD4+ – лимфоцитов [6,7,16], другие CD8+ [14]. При этом нет сведений о показателях иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 в зависимости от активности туберкулеза непосредственно в очаге поражения.

В этой связи изучение экспрессии Т-лимфоцитов, участвующих в механизмах формирования иммунной недостаточности, представляется важным аспектом, являясь основой для разработки новых методов прогноза течения и лечения туберкулеза.

Цель: определить особенности локализации, количество CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в очаге специфического воспаления при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких в зависимости от бактериовыделения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для гистологического и иммуногистохимического исследования (ИГХИ) – участки ткани легких, взятые у 41 больного, оперированных по поводу фиброзно-кавернозного туберкулеза (ФКТ) легких, разделенные на 2 группы в зависимости от бактериовыделения. Первая группа (n=20) – ФКТ с активным бактериовыделением (МБТ+), вторая группа (n=21) – ФКТ без бактериовыделения (МБТ–).

На первом этапе исследования проводили гистологическое исследование с обзорной окраской гематоксилин эозин и гистохимической окраской по Циль-Нильсону для определения локализации микобактерий туберкулеза по стандартным методикам [1].

Иммуногистохимическое исследование (ИГХИ) проводили по стандартизированной методике [1,9] с использованием серийных парафиновых срезов толщиной 3-5 мкм, помещённых на адгезивные стекла, покрытые полизином («Menzel-Glaser», Германия) и реактивов компании DAKO.

Иммуногистохимическая панель включала в себя следующие антитела: CD4 (Clone 4B12) и CD8 (Clone C8/144B), системы визуализации EnVision™ FLEX на автостейнере фирмы DAKO. Просмотр и

цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли цифровой камерой OLYMPUS C 5050Z, установленной на микроскопе «Olympus CX-41».

В месте цитоплазматической мембранной локализации антигена визуализировался продукт реакции коричневого цвета. Морфометрическое исследование включало подсчет позитивных клеток в 5 полях зрения при увеличении 200.

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ООО «Альфа», г. Донецк. При анализе проверки распределения на нормальность использовали Хи-квадрат и критерий W Шапиро-Уилка, сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с использованием W-критерия Вилкоксона и сравнение средних двух независимых выборок по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам ИГХИ было установлено, что во всех препаратах определялась экспрессия CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, особенно в очагах специфического воспаления фиброзной стенки каверны и участках дистелектаза в перикавернозной зоне. Неравномерная по плотности экспрессия Т-лимфоцитов отмечалась периваскулярно, перибронхиально и в очагах бронхо-ассоциированной лимфоидной ткани. Наименьшее количество позитивных Т-лимфоцитов располагалось в участках эмфиземы.

В очагах специфического воспалительного инфильтрата обнаруживались Т-лимфоциты как с фенотипом CD4+, так и CD8+. Причем независимо от бактериовыделения преобладали цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты. Большее количество CD8+ Т-лимфоцитов ($117,8 \pm 6,99$ позитивных клеток) располагалось плотным кольцом вокруг фокусов казеозного некроза в прогрессирующей фиброзной каверне и в зоне экссудативного воспаления активных туберкулезных гранул при ФКТ (МБТ+) (рис.1).



Рис. 1. Очаг специфического воспаления в прогрессирующей фиброзной каверне при ФКТ (МБТ+). Экспрессия CD8 +Т-лимфоцитов. Фокус казеозного некроза (KN). ИГХИ. Система визуализации FLEX. Ув. x200.

Экспрессию CD4+ Т-лимфоцитов обнаруживали в тех же участках, но их количество было в 1,8 раз меньше, чем CD8+ клеток, что составило $64,35 \pm 3,78$ позитивных клеток (рис.2, табл.1.). Соотношение Т-хелперов к цитотоксическим Т-лимфоцитам оценивали как низкий иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 – $0,58 \pm 0,04$. При исследовании ткани легких с ФКТ (МБТ–) позитивные CD8+

Т-лимфоциты локализовались в очаге специфического воспалительного инфильтрата в стенке фиброзной каверны преимущественно в зоне скопления эпителиоидных макрофагов и многоядерных гигантских клеток Лангханса (рис.3). Их количество составило $92,33 \pm 4,79$, в 1,28 раз меньше, чем аналогичных клеток при ФКТ (МБТ+), что было достоверным показателем ($P < 0,05$).



Рис. 2. Очаг специфического воспаления в прогрессирующей фиброзной каверне при ФКТ (МБТ+). Экспрессия CD4 + лимфоцитов. Фокус казеозного некроза (КН). ИГХИ. Система визуализации FLEX. Ув. X200.

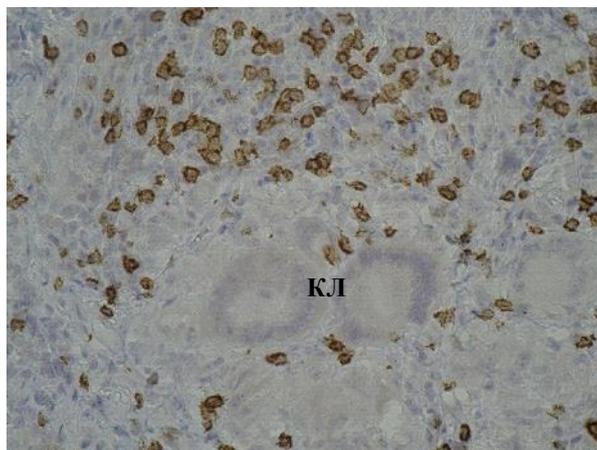


Рис. 3. Очаг специфического воспаления с неактивными гранулемами в фиброзной каверне при ФКТ (МБТ–). Экспрессия CD8 + Т-лимфоцитов. Многоядерные гигантские клетки Лангханса (КЛ). ИГХИ. Система визуализации FLEX. Ув. x400.

CD4+ Т-лимфоциты в неактивных гранулемах фиброзной каверны у больных ФКТ (МБТ–) обнаруживались в количестве $68,71 \pm 4,34$ позитивных клеток, что достоверно не отличалось от группы исследования с ФКТ (МБТ+) (табл.). При этом иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 составил $0,75 \pm 0,04$, достоверно отличающийся от первой группы исследования ($P < 0,05$).

При сравнительном анализе количества субпопуляций иммунокомпетентных Т-лимфоцитов в зависимости от бактериовыделения документируется увеличение показателей активации иммунного вос-

паления у пациентов с ФКТ независимо от бактериовыделения. Анализ ИГХИ в ткани легких у оперированных больных по поводу вторичного ФКТ показал наличие различного уровня экспрессии CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в очаге специфического воспаления в стенке фиброзной каверны, который выражается в сдвиге соотношения популяций Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты в зависимости от бактериовыделения.

В нашем исследовании обращает внимание преобладание экспрессии цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов в очаге специфического туберкулезно-

го воспаления независимо от бактериовыделения, что позволяет думать об их опосредованном участии в механизмах антимикробного действия, среди

которых имеют место прямые цитотоксические эффекты и продукция соответствующих провоспалительных цитокинов.

Таблица 1

Уровень экспрессии CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в очаге специфического воспаления при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких в зависимости от бактериовыделения

Экспрессия CD	1 группа (n=20) ФКТ, МБТ+	2 группа (n=21) ФКТ, МБТ–
CD4+	64,35±3,78	68,71±4,34
CD8+	117,80±6,99*	92,33±4,79*
CD4/ CD8	0,58±0,04*	0,75±0,04*

Примечание: * – достоверность различий группы 1 от группы 2, P<0,05.

При прогрессирующем ФКТ (МБТ+) в участках казеозного некроза в стенке бронха, сообщающейся с фиброзной каверной, микобактерии получают возможность внеклеточного размножения. В окружающей казеозный некроз ткани, вокруг активных гранул увеличивается количество цитотоксических Т-лимфоцитов и снижается количество Т-хелперов по сравнению с группой ФКТ (МБТ–). Все это приводит к анергии, подавлению клеточного иммунного ответа, обуславливающее прогрессирующее туберкулезное процесса, показателем которого является достоверно низкий иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 = 0,58±0,04. Кстати, отсутствие гиперчувствительности замедленного типа на антиген микобактерий рассматривается многими авторами как анергия, сопровождающаяся неблагоприятным клиническим прогнозом [3], что и наблюдается в нашем исследовании в очагах казеозного некроза. Однако большинство исследователей утверждают, что в периферической крови у человека, в периказеозной зоне гранул в экспериментальных моделях преобладающими являются именно CD4+ хелперы, определяющие остроту воспалительной реакции при туберкулезе [6,7,12,14].

Тем не менее результаты гистологического и ИГХ исследований в нашей работе доказывают, доказывают, что при ФКТ (МБТ–) в очагах гранулематозного воспаления с наличием неактивных гранул имеет место незначительное недостоверное преобладание CD4+ хелперов, достоверное снижение цитотоксических CD8+ лимфоцитов по отношению к ФКТ (МБТ+) и, следовательно, достоверное увеличение иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 до 0,75±0,04.

По-видимому, стабильность хронического туберкулезного гранулематозного воспаления зависит, с одной стороны, от количества активированных CD4+ лимфоцитов, способных поддерживать воспалительный процесс, с другой стороны, от количества CD8+ лимфоцитов, которые могут способствовать ограничению иммунного ответа. Поскольку индуктивная фаза гиперчувствительности замедлен-

ного типа не проявляет себя клинически, в морфологических исследованиях не всегда возможно уловить повышение активности Т-хелперного звена. Вероятно, в дальнейшем нарушение механизмов, сдерживающих иммунный ответ, приводит к прогрессированию заболевания.

ВЫВОДЫ

Таким образом, иммуногистохимический анализ в очагах специфического воспаления при фиброзно-кавернозном туберкулезе показал, что CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты локализируются в стенке фиброзной каверны в очагах специфического воспаления независимо от бактериовыделения, увеличение показателей которых свидетельствуют об активации иммунного воспаления в пораженной легочной ткани. Особенностью является преобладание цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов независимо от бактериовыделения, что доказывает их опосредованное участие в механизмах антимикробного действия. Определены иммунорегуляторные индексы CD4/CD8 при ФКТ (МБТ+) – 0,58±0,04 и ФКТ (МБТ–) – 0,75±0,04, которые могут являться критерием диагностики нарушения клеточного иммунного ответа *in situ*, необходимыми в прогнозе течения заболевания и выбора тактики терапии фиброзно-кавернозного туберкулеза.

Перспективы дальнейшего исследования.

Особенности иммунологической характеристики клеточного состава ткани легких из очага специфического воспаления при фиброзно-кавернозном туберкулезе чрезвычайно важны для оценки патологического процесса на конкретном этапе заболевания.

Множество вопросов, остающихся без ответов, диктуют необходимость продолжения исследования в этом направлении.

Дальнейшее изучение детальной характеристики иммунокомпетентных клеток в очаге поражения при фиброзно-кавернозном туберкулезе будет способствовать более глубокому пониманию особенностей механизмов иммунопатогенеза и выбора тактики дальнейшего лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по гистологической, гистохимической и иммуногистохимической технике : учеб. пособие для бакалавров / В. Д. Марковский, И. В. Сорокина, Н. В. Гольева и др. // Харьков: АДВА™, 2010. – 152 с.
2. Ерохин В.В. О некоторых механизмах патогенеза туберкулеза /В.В. Ерохин // Проблемы туберкулеза. – 2009. – № 11. – С. 3–9.
3. Нарушения специфического иммунного ответа у больных туберкулезом легких / Т.Е. Кисина, И.С. Фрейдлин, Б.Е. Кноринг и соавт. // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8, № 2 – 3. – С. 270 – 271.
4. Реактивность лимфоцитов крови при туберкулезе легких / Р.Р.Хасанова, О.В.Воронкова, О.И. Уразова и др.// Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 35–40
5. Фещенко Ю. І. Сучасна стратегія боротьби з туберкульозом в Україні / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник// – К. : Здоров'я, 2007. – 664 с.
6. Saccamo N. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection / N.Saccamo et al. // Eur. J. Immunol. – 2010. – №40. P. 2211–20;
7. Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells /L.A.van Pinxteren, J.P.Cassidy, B.H.Smedegaard et al. // Eur. J. Immunol. – 2000.–№30.– P.3689–3698.
8. Cooper A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis / A. M. Cooper// Annu Rev. Immunol. – 2009. – №27. – P. 393–422;
9. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry / Dabbs D.J.// London: Churchill Livingstone, 2006. – 828 p.
10. Day C. L. Functional Capacity of Mycobacterium tuberculosis-Specific T Cell Responses in Humans Is Associated with Mycobacterial Load / C. L. Day et al. // J. Immunol.– 2011. – №187. – P. 2222–32;
11. Lazarevic V. CD8 cells in tuberculosis / V.Lazarevic, J.Flynn // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2002.– №166. – P.1116 1121;
12. Percentage of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in blood of tuberculosis patients /N. Afzal, K. Javed, S.uz-Zaman et al. //J. Ayub. med coll abbottabad .– 2010.– №22(4). – P.182-185;
13. Revival of the identification of cytotoxic T-lymphocyte epitopes for immunological diagnosis, therapy and vaccine development /J.Liu, S.Zhang et al.// Exp. Biol.Med. (Maywood).–2011. – № 236(3).– P.253-267.
14. Serbina N.V. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during Mycobacterium tuberculosis infection /N.VSerbina, V.Lazarevic, J.L.Flynn// J. Immunol.– 2001.–№167.– P.6991–7000;
15. TB database 2010: overview and update / Galagan, J. E., Sisk, P. et al.// Tuberculosis (Edinb.).– 2010.–№ 90(4).– P.225-235.
16. Temporal and Spatial Arrangement of Lymphocytes within Lung Granulomas Induced by Aerosol Infection with Mycobacterium tuberculosis / M. Gonzalez-Juarrero, O. C. Turner, J. Turner et al.// Infect Immun.– 2001.–№69(3). – P.1722–1728;