

УДК 616.24 – 002.5 – 089.168 – 07 – 092 : [612.017 + 611.018.2]  
© Суханова Л.А., Сорокина И.В., Омельченко О.А., Марковская Е.В., 2009

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ И СТЕПЕНИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Суханова Л.А., Сорокина И.В., Омельченко О.А., Марковская Е.В.

Харьковская медицинская академия последипломного образования; Харьковский Национальный медицинский университет; Областной детский туберкулезный клинический санаторий

**Суханова Л.А., Сорокина И.В., Омельченко О.А., Марковская Е.В.** Иммуногистохимическая характеристика туберкулеза легких в зависимости от состояния соединительной ткани и степени туберкулезного воспаления // Украинський морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №4. – С. 118-120.

Проведено иммуногистохимическое исследование легких 47 больных туберкулезом, оперированных по поводу неэффективного лечения. Подавляющее большинство (78,7%) больных было с инфильтративным туберкулезом, остальные – с туберкуломой. У 76,7% больных отмечались фенотипические признаки дисплазии соединительной ткани (ДСТ), они составили основную группу, остальные представили группу сравнения. Установлено изменение всех звеньев иммунитета в зависимости от степени специфического воспаления и от наличия (или отсутствия) ДСТ. У больных отмечалось снижение количества Т-лимфоцитов, хелперов, антигенактивированных лимфоцитов, уменьшение соотношения CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>, понижение содержания ФНО α, ИЛ 1-β, ИЛ-2, ИЛ-4, (более значительные достоверные изменения) установлены в группе ДСТ+, при этом выявлено увеличение супрессоров.

**Ключевые слова:** дисплазия соединительной ткани, туберкулез легких.

**Суханова Л.А., Сорокина И.В., Омельченко О.А., Марковская Е.В.** Імуногістохімічна характеристика туберкульозу легень залежно від стану сполучної тканини і ступеню туберкульозного запалення // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №4. – С. 118-120.

Проведено імуногістохімічне дослідження легень 47 хворих туберкульозом, оперованих із приводу неефективного лікування. Більшість (78,7%) хворих було з інфільтративним туберкульозом, інші - з туберкуломою. В 76,7% хворих відзначалися фенотипічні ознаки дисплазії сполучної тканини (ДСТ), вони склали основну групу, інші представили групу порівняння. Установлено зміну всіх ланок імунітету залежно від ступеня специфічного запалення й від наявності (або відсутності) ДСТ. У хворих відзначалося зниження кількості Т-лімфоцитів, хелперів, антигенактивованих лімфоцитів, зменшення співвідношення CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>, зниження вмісту ФНО α, ІЛ 1-β, ІЛ-2, ІЛ-4, (більше значні достовірні зміни) установлені в групі ДСТ+, при цьому виявлено збільшення супрессорів.

**Ключові слова:** дисплазія сполучної тканини, туберкульоз легень.

**Sukhanova L.A., Sorokina I.V., Omelchenko O.A., Markovska E.V.** Immunohistochemical description tuberculosis of lungs in dependence on the state of connecting tissue and degree of tubercular inflammation // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №4. – С. 118-120.

Immunohistochemical research of lights is conducted 47 patients by tuberculosis, operated concerning uneffective treatment. Repressed most (78,7%) patients were with infiltrative tuberculosis, other – with tuberculoma. At 76,7% patients the phenotypical signs of dysplasia of connecting tissue (DCF) were marked, they made a basic group, other presented the group of comparison. The change of all of links of immunity is set depending on the degree of specific inflammation and from the presence (or absences) of DCF. For patients by a white, operated in connection with absence of effect from a chemotherapy the decline of amount of T-cell was marked, helpers, antigen-activated lymphocytes plague, diminishing of correlation of CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>, lowering of maintenance of FNO α, IL1-β, IL-2, IL-4, (more considerable reliable changes) is set in the group of DCF+, the increase of suppressors is here exposed.

**Key words:** dysplasia of connecting tissue, tuberculosis of lungs.

Туберкулез по-прежнему является одной из главных проблем здравоохранения, несмотря на наметившееся снижение, заболеваемость туберкулезом остается высокой, ухудшается структура впервые диагностированных клинических форм, увеличивается количество бактериовыделителей и лиц с химиорезистентным туберкулезом, что сказывается отрицательно на эффективности лечения [4]. Туберкулез сопровождается изменением иммунологической реактивности, особенно значительно нарушены параметры клеточного иммунитета [2, 3, 5].

Соединительная ткань является составной частью всех органов, в том числе и легких. Она выполняет многочисленные и сложные функции, которые сводятся к поддержанию гомеостаза и принимают активное участие в развитии патологических процессах.

Защитная функция соединительной ткани обеспечивается участием ее иммунокомпетентных клеток в иммунных реакциях. При различных физиологических и патологических процессах большую роль играют интерлейкины, которые, связываясь со специфическими рецепторами на поверхности клеточных мембран, обладают широким спектром действия [6, 7]. Иммуногистохимическое исследование соединительной ткани при туберкулезе легких ранее не проводилось.

Таким образом, напряженная ситуация по туберкулезу, значимость и многофункциональность соединительной ткани, ее участие в иммунных процес-

сах определяют актуальность данного исследования.

**Цель работы:** изучить иммуногистохимические особенности воспалительной клеточной инфильтрации при туберкулезе легких в зависимости от наличия или отсутствия дисплазии соединительной ткани и степени специфического воспаления.

**Материалы и методы:** обследовано 47 больных впервые диагностированным туберкулезом легких, оперированных по поводу неэффективного лечения. Мужчин было 36 (76,6%), женщин – 11 (23,4%). По возрасту: 18-25 лет – 5 (10,6%) человек, 26-45 лет – 34 (72,3%), 46-60 лет – 8 (17%), т.е. подавляющее большинство больных были трудоспособного возраста, социально значимы.

**Результаты исследования.** Инфильтративный туберкулез легких диагностирован у 78,7% больных, туберкулема – у 21,3%.

Проводилось изучение фенотипических признаков дисплазии соединительной ткани (ДСТ) у всех 47 пациентов, в результате чего установлено наличие фенотипических признаков ДСТ у 36 (76,6%) человек. Они составили основную группу – (ДСТ+), 11 (23,4%) больных без признаков ДСТ представили группу сравнения – (ДСТ-).

Удаленные фрагменты легочной ткани (8-10 кусочков) были исследованы морфологически (макро- и микроскопически).

Парафиновые срезы толщиной 10-15 мкм были окрашены гематоксилин-эозином, нитрофуксином

по ван Гизон, ван Гизон по Вейгерту.

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 5-6 мкм непрямым методом Кунса по методике Brosnan (1979). Иммуные клетки дифференцировали с помощью моноклональных антител (МКА) к различным типам клеток – CD<sub>8</sub>, CD<sub>4</sub>, CD<sub>3</sub>, CD<sub>19</sub>, CD<sub>56</sub>, CD<sub>38</sub>, апоптоз

определяли с помощью МКА CD<sub>95</sub>, клетки - продуценты ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО $\alpha$  и ИЛ 1- $\beta$  (Chemicon International, USA). Определено 5 степеней активности воспалительных изменений при хроническом туберкулезном процессе [1]. Степень активности туберкулезного процесса у исследуемых представлена в таблице 1.

**Таблица 1.** Распределение больных туберкулезом легких по степени активности туберкулезного воспаления в зависимости от состояния соединительной ткани

Группы наблюдения	Степени активности туберкулезного воспаления									
	1		2		3		4		5	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ДСТ+	-	-	-	-	-	-	16	44,4	20	55,6
ДСТ-	-	-	-	-	2	18,2	5	45,4	4	36,4

Из приведенной таблицы видно, что у больных с ДСТ+ в отличие от пациентов группы сравнения отмечались только 4 и 5 степени активности туберкулезного воспаления, а самая выраженная - 5 степень, определялась в 1,5 раза чаще также у больных основной группы.

При иммуногистохимическом исследовании выявлены иммунокомпетентные клетки во всех структурах легких – CD<sub>3</sub> - Т-лимфоциты, CD<sub>4</sub> - Т-хелперы, CD<sub>8</sub> - Т-супрессоры, – CD<sub>38</sub> – антигенактивированные лимфоциты, CD<sub>56</sub> - макрофаги, CD<sub>19</sub> - В-лимфоциты, а также клетки продуценты интерлейкинов, а именно: ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1- $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4. Все клетки выявлялись в стенках и в просветах бронхиол и альвеол, а также в бронхоассоциированной ткани - в стенках и в просветах сосудов. При этом у больных обеих групп в стенках и в просветах бронхиол чаще выявлялись CD<sub>56</sub> - макрофаги, тогда как

CD<sub>19</sub> - В-лимфоциты наиболее часто отмечались в бронхоальвеолярной лимфоидной ткани, а CD<sub>3</sub> - Т-лимфоциты – в просвете альвеол и межальвеолярных перегородках. При обзорном исследовании препаратов было отмечено, что степень выраженности местной иммунной реакции в легких у больных группы ДСТ+ была меньшей в сравнении со степенью выраженности иммунологических изменений у больных группы ДСТ-.

Для объективизации оценки степени выраженности того или иного звена местного иммунитета изучалась количественная оценка в виде определения относительных объемов указанных выше клонов иммунных клеток в препаратах легких, обработанных МКА. Сравнение показателей иммуногистохимического исследования производилось в зависимости от степени воспаления, а также от наличия (отсутствия) дисплазии соединительной ткани (таблица 2).

**Таблица 2.** Показатели местного иммунитета у больных туберкулезом легких в зависимости от состояния соединительной ткани

Иммунокомпетентные клетки	ДСТ-			ДСТ+			Достоверные различия
	Степень воспаления			Степень воспаления			
	3	4	5	4	5		
	n=2	n=5	n=4	n=16	n=20		
	1	2	3	4	5		
Относительные объемы иммунных клеток (%)							
CD <sub>3</sub>	20,0±2,0	19,0±1,0	17,0±1,0	17,0±0,9	14,0±0,8		P <sub>1,3</sub> < 0,05; P <sub>2,5</sub> < 0,05; P <sub>3,5</sub> < 0,05; P <sub>4,5</sub> < 0,05
CD <sub>4</sub>	10,0±0,8	9,0±0,7	8,0±0,4	8,6±0,4	8,0±0,6		
CD <sub>8</sub>	6,0±0,2	6,5±0,3	6,8±0,4	6,6±0,3	6,9±0,3		
CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub>	1,66±0,02	1,38±0,01	1,17±0,03	1,3±0,04	1,16±0,02		
CD <sub>56</sub>	11,0±0,5	11,5±0,4	12,0±0,6	11,4±0,3	10,0±0,6		P <sub>3,5</sub> < 0,05
CD <sub>19</sub>	8,0±0,5	3,0±0,3	9,0±0,7	9,0±0,2	8,0±0,2		P <sub>1,2</sub> < 0,01; P <sub>2,3</sub> < 0,01; P <sub>2,4</sub> < 0,01; P <sub>2,5</sub> < 0,01
CD <sub>38</sub>	6,0±0,2	5,0±0,1	3,0±0,3	4,0±0,1	3,0±0,09		P <sub>1,3</sub> < 0,01; P <sub>2,3</sub> < 0,05; P <sub>1,5</sub> < 0,01; P <sub>2,5</sub> < 0,05; P <sub>1,4</sub> < 0,05
ФНО $\alpha$	5,19±0,3	5,02±0,4	2,74±0,1	5,04±0,3	1,8±0,6		P <sub>1,3</sub> < 0,05; P <sub>2,3</sub> < 0,05; P <sub>1,5</sub> < 0,01; P <sub>2,5</sub> < 0,01; P <sub>4,5</sub> < 0,01
ИЛ-1 $\beta$	5,33±0,2	5,0±0,4	3,27±0,3	5,15±0,4	2,0±0,4		P <sub>1,3</sub> < 0,05; P <sub>2,3</sub> < 0,05; P <sub>1,5</sub> < 0,05; P <sub>2,5</sub> < 0,05; P <sub>4,5</sub> < 0,05
ИЛ-2	4,03±0,1	3,2±0,2	1,0±0,02	3,0±0,3	0,6±0,04		P <sub>1,3</sub> < 0,05; P <sub>1,5</sub> < 0,01; P <sub>2,3</sub> < 0,05; P <sub>3,4</sub> < 0,05; P <sub>2,5</sub> < 0,05; P <sub>4,5</sub> < 0,05
ИЛ-4	3,18±0,2	3,0±0,3	1,15±0,08	2,87±0,2	1,0±0,01		P <sub>1,3</sub> < 0,05; P <sub>1,5</sub> < 0,05; P <sub>2,3</sub> < 0,05; P <sub>2,5</sub> < 0,05
CD <sub>95</sub>	0,98±0,02	0,76±0,03	0,42±0,01	0,58±0,05	0,38±0,03		

Установлено, что с возрастанием степени воспаления количество CD<sub>3</sub> постепенно уменьшалось, что вполне логично, так как CD<sub>3</sub> являются центральным звеном клеточного иммунитета при туберкулезе [2,3,5]; наиболее значимое уменьшение CD<sub>3</sub> наблюдалось при 5 степени туберкулезного воспаления. Однако, у больных с наличием ДСТ уменьшение CD<sub>3</sub> было более выражено по сравнению с лицами без ДСТ.

С увеличением степени воспаления отмечается тенденция к уменьшению хелперной (CD<sub>4</sub>) активности и увеличению супрессорной (CD<sub>8</sub>), это особенно наглядно проявлялось в уменьшении коэффициента CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>, причем он достоверно ниже у больных с 4 степенью воспаления группы ДСТ+ по сравнению

с группой ДСТ-. Клинически это проявляется неблагоприятным течением туберкулезного процесса.

Количество макрофагов - CD<sub>56</sub> с увеличением степени воспаления повышалось у больных группы ДСТ-, в то время как у лиц группы ДСТ+ уменьшалось, особенно при 5 степени воспаления, т.е. макрофагальное звено иммунного ответа значительно изменено у больных группы ДСТ+.

Такая же картина наблюдалась в отношении В-лимфоцитов (CD<sub>19</sub>), количество которых достоверно меньше у больных с 5 степенью воспаления и наличием дисплазии соединительной ткани по сравнению с показателями группы ДСТ-, что должно отрицательно сказаться на гуморальном иммунитете.

Одной из наиболее значимых клеточных популя-

ций в системе местного иммунитета при туберкулезе, позволяющих прогнозировать его течение, особенно прогрессирование, является популяция клеток, экспрессирующие рецепторы к CD<sub>38</sub>. Известно, что их уменьшение способствует прорыву гранулематозного барьера и диссеминации. [10]

Как видно из приведенной таблицы, популяция CD<sub>38</sub> уменьшалась с увеличением степени туберкулезного воспаления, особенно значительно при 5 степени у больных обеих групп, однако, при 4 степени воспаления она более снижена у лиц основной группы -ДСТ+. ( $p < 0,05$ ). Микобактерии туберкулеза, попадая в организм, особенно при возникновении специфического воспаления, вызывают каскад иммунных реакций, осуществляющиеся не только иммунокомпетентными клетками, но и системой цитокинов, которые продуцируются макрофагами, лимфоцитами и дендритными клетками [5,9].

Особенно значимы в иммунном ответе ФНО  $\alpha$  и ИЛ 1- $\beta$ ; в частности ФНО  $\alpha$  активизирует макрофагальную систему, усиливая тем самым бактериальный киллинг [9], его дефицит вызывает прогрессирование туберкулеза, так как приводит к усилению внутриклеточного размножения МБТ и способствует формированию гранулем с выраженными некротическими изменениями. [8]

У наших обследуемых также выявлено снижение ФНО  $\alpha$  в зависимости от степени воспаления, особенно значительно выраженное при 5 степени, при этом у больных группы ДСТ+ ФНО  $\alpha$  достоверно ниже в отличии от больных группы сравнения. ИЛ 1- $\beta$  также снижен тем сильнее, чем выше степень воспаления, причем снижение более выражено у больных группы ДСТ+, что сказывается отрицательно на активации Т-хелперов.[6] ИЛ-2, влияя на Т и В-лимфоциты, является центральным регулятором иммунного ответа, оказывает противовоспалительное действие.

У наших обследуемых установлено вполне логичное снижение ИЛ-2 в зависимости от степени выраженности воспаления – чем выше степень, тем ниже его содержание, особенно низкое при 5 степени, при этом у лиц группы ДСТ+ достоверно ниже показатели ИЛ-2 по сравнению с больными группы ДСТ-.

Точно такая же ситуация наблюдалась в отношении ИЛ-4, который также действует противовоспалительно.

Дефицит ИЛ-4 у наблюдаемых больных туберкулезом легких, с большей вероятностью, обусловлен дефицитом CD<sub>4</sub>, которые его продуцируют, чем и объясняется неэффективное лечение.

При анализе апоптотического индекса клеточных элементов выявлено его снижение с увеличением степени воспаления, т.е. не совсем прогнозируемый результат.

Можно полагать, что снижение интенсивности апоптотических изменений у исследуемых больных связано с особенностями местных иммунных реакций. Известно, что апоптоз индуцируется ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1- $\beta$ , ИЛ-2, содержание которых в наших наблюдениях снижено, этим можно объяснить уменьшение апоптоза, идущее параллельно содержанию ФНО  $\alpha$  и интерлейкинов.

#### Выводы:

1. Иммуногистохимические исследования легких больных, оперированных по поводу туберкулеза

легких в связи с отсутствием эффекта от химиотерапии, выявили нарушения всех звеньев местного иммунитета, причем, выраженность их зависела от степени специфического воспаления и наличия или отсутствия дисплазии соединительной ткани.

2. Туберкулез легких с неэффективным лечением сопровождается снижением количества Т-лимфоцитов, хелперов и антигенактивированных лимфоцитов, уменьшением соотношения CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>, а также увеличением супрессоров в зависимости от степени воспаления, более значительные изменения выявлены у больных с наличием дисплазии соединительной ткани.

3. Макрофагальное звено иммунитета у больных туберкулезом легких существенно не изменяется в зависимости от степени воспаления, однако у лиц с наличием дисплазии соединительной ткани количество макрофагов снижено в сравнении с пациентами без дисплазии соединительной ткани.

4. У больных с неэффективным лечением по поводу туберкулеза легких содержание ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1- $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4 снижено пропорционально степени специфического воспаления, причем у лиц с 5 степенью уровень цитокинов достоверно был ниже при наличии ДСТ, чем при ее отсутствии. Данным фактом можно объяснить уменьшение выраженности апоптоза с увеличением степени воспаления.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Ариэль Б.М. Морфологические особенности фиброзно-кавернозного туберкулеза легких на операционном материале // Архив патол.- 2004. - №1. – С.14-18.
2. Борисов С.Е. Диагностика туберкулеза: возможности и пределы // Пробл. туб. – 2001.- №3. – С.5-9.
3. Мишин В.Ю. Актуальные вопросы туберкулеза органов дыхания // Москва: ООО Издательство «Трида», 2003. – С.22-36.
4. Фещенко Ю.І. Стан надання фізіотричної допомоги населенню України // Український пульмонологічний журнал.- 2008. - №3. Додаток – С.7-9.
5. Чернушенко Е.Ф. Диагностика вторичных иммунодефицитных состояний // Журнал практичного лікаря. – 2000. - №1. – С.6-10
6. Чулкин С.Н., Переяслов А.А. / Интерлейкины. - Львов.- Лига-Пресс. - 2005. – 480 с.
7. Шехтер А.Б., Коган Е.А. Соединительная ткань легких // Клеточная биология легких в норме и при патологии/ под ред. В.В. Ерохина, А.К. Романовской. - 2005. – С.209-221.
8. Clay H., Volkman H.E., Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death // Immunology. – 2008. – Vol.29 (2). – P.283-294.
9. Korbil D.S., Schneider B.E., Schaible U.E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth // Microbes Infect. – 2008. – Vol.10 (9). – P.995-1004.
10. Viegas M.S., do Carmo A., Silva T., Seco F., Serra V., Lacerda M., Martins T.C. CD<sub>38</sub> plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of TH 1 immune responses against Mycobacterium avium // Microbes Infect 2007. – Vol.9 (7). – P.847-854.

Надійшла 28.09.2009 р.

Рецензент: проф. І.В.Лоскутова