

Д.И. Галата, И.В. Сорокина

Иммуногистохимическая характеристика лимфоидной популяции тимуса плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией

Харьковский национальный медицинский университет

Ключевые слова: тимус, преэклампсия, плод, новорожденный.

Проведенное исследование выявило влияние преэклампсии матери на пролиферативную активность лимфоидного компонента тимуса плодов и новорожденных, а также на процессы созревания и дифференцировки тимоцитов.

Имуногістохімічна характеристика лімфоїдної популяції тимуса плодів та новонароджених від матерів з преєклампсією

Д.І. Галата, І.В. Сорокіна

Проведене дослідження виявило вплив преєклампсії матері на проліферативну активність лімфоїдного компоненту тимуса плодів і новонароджених, а також на процеси дозрівання й диференціювання тимоцитів.

Ключові слова: тимус, преєклампсія, плід, новонароджений.**Патологія.** – 2010. – Т.7., №2. – С. 74–77

Immunohistochemical characteristics of lymphoid population of thymus in fetuses and newborns from mothers with preeclampsia

D.I. Galata, I.V. Sorokina

Performed investigation has revealed the influence of mother's preeclampsia on proliferative activity of lymphoid population of thymus in fetuses and newborns as well as on processes of maturation and differentiation of thymocytes.

Key words: thymus, preeclampsia, fetus, newborn.**Pathologia.** 2010; 7(2): 74–77

Общепризнанным является неблагоприятное влияние преэклампсии на внутриутробное развитие плода, вследствие развития у матери синдрома полиорганной функциональной недостаточности, что приводит к срыву адаптационных систем матери [1,2]. Несмотря на то, что первые морфологические исследования тимуса плодов от матерей с преэклампсией появились еще в начале-середине XX в. и проводятся до сих пор, углубленное иммуногистохимическое исследование рецепторного аппарата клеточной популяции тимуса у плодов от матерей, страдавших во время беременности преэклампсией, не проводилось.

Цель работы

Изучить иммунофенотипические особенности иммунокомпетентных клеток тимуса плодов и умерших новорожденных от матерей, беременность у которых осложнилась преэклампсией различной степени тяжести.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили тимусы 19 мертворожденных и умерших новорожденных от здоровых матерей (группа контроля), а также тимусы 67 плодов и умерших новорожденных от матерей, беременность у которых осложнилась преэклампсией. Все плоды погибли интранатально, вследствие острого нарушения пуповинно-плацентарного кровообращения (преждевременная отслойка плаценты) или от родовой травмы. Новорожденные погибли от постнатальной асфиксии. Все плоды и новорожденные от матерей с преэклампсией были разделены на 3 группы, в зависимости от тяжести преэклампсии. В 1 группу вошли 21 плод и новорож-

денный от матерей с преэклампсией легкой степени тяжести (группа ПЭ 1). Во вторую группу объединены 26 плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией средней тяжести (группа ПЭ 2) и в 3 группу – 20 плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией тяжелой степени (группа ПЭ 3). Внутри каждой группы произошло подразделение материала на доношенных (срок гестации 37–41 неделя) и недоношенных (срок гестации 31–36 недель) плодов и новорожденных. Во время вскрытия плоды взвешивались, измерялась их длина, оценивалось соответствие морфологических показателей сроку гестации. Кусочки тимусов фиксировали в 10% нейтральном формалине. Изготовленные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также использовали для иммуногистохимического исследования по непрямому методу Кунса в модификации Brosmann (1979). Иммунные клетки дифференцировали с помощью моноклональных антител (МКА) к различным типам клеток (США). Выявляли Thy-1, CD8, CD4, CD3, CD7, CD38, CD22, HLA-Dr, ИЛ-7, ИЛ-4. В качестве люминесцентной метки использовали F(ab)-2 – фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных ФИТЦ. Препараты изучали в люминесцентном микроскопе «Axioscop 40». Комплекс морфометрических исследований проводили на серийных срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, на микроскопе «Olympus» BX-41 с использованием программ Olympus DS-Soft (Version 3:1) и Biostat.exe. С помощью сетки и линейки Г.Г. Автандилова на срезах обработанных МКА определяли относительные объемы

основных клонов иммунных клеток. Цифровые данные обработаны с использованием программного обеспечения Biostat.exe. При определении степени вероятности допускалась точность $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Иммуногистохимический метод выявил как качественные, так и количественные особенности основных клонов иммунных клеток исследуемых тимусов, учитывая стадии созревания лимфоидной популяции вилочковой железы. Современные данные свидетельствуют о том, что тимоцит походит 3 стадии созревания: I и II стадии осуществляются в субкапсулярной и внутренней корковой зоне, а III стадия происходит в мозговом веществе тимуса [3]. У доношенных плодов и новорожденных во всех исследуемых группах отмечалось яркое свечение клеток с рецепторами к CD7 и CD38 всех структурно-функциональных зон дольки железы. Пролиферативная активность тимоцитов при преэклампсии легкой степени тяжести практически не отличается от контрольной, о чем, в частности, свидетельствует относительный объем популяции CD38 и CD7 (табл. 1). По сравнению с тимусами доношенных плодов и новорожденных контрольной группы, при преэклампсии средней степени тяжести отмечается усиление пролиферации лимфоидного компонента железы, о чем свидетельствует показатель относительного объема CD38 лимфоцитов. Как известно, данный антиген свойственен клеткам с высокой пролиферативной активностью, находящимся на всех трех стадиях созревания [3,4]. Это подтверждается и нарастанием популяции CD7. При тяжелой преэклампсии пролиферативная активность несколько снижена. Это видно из снижения относительного объема CD38 клеток (рис. 1), тогда как среди тимоцитов отмечается большая доля клеток, экспрессирующих рецепторы к CD7, что свидетельствует о нарушении созревания клеток. Как известно, пролиферативная активность тимоцитов на ранних этапах иммуногенеза регулируется в частности

ИЛ-7, а основными продуцентами этого интерлейкина в вилочковой железе являются клетки стромального происхождения [5]. По нашим данным, относительный объем клеток-продуцентов ИЛ-7 соответствует контролю при легкой преэклампсии, увеличивается при среднетяжелой и уменьшается при тяжелой.



Рис. 1. CD38-timoциты в тимусе доношенного плода от матери с тяжелой преэклампсией. Непрямой метод Кунса с МКА к CD38, x 400

Также была выявлена еще одна важная характеристика лимфоидной популяции тимусов доношенных плодов от матерей с преэклампсией – это нарушение ее созревания. Так, если преэклампсии легкой степени относительный объем незрелых пре-Т-лимфоцитов (Thy-1), а также клеток с поверхностным рецептором к CD7 практически не отличается от контроля, то при среднетяжелой и особенно тяжелой преэклампсии интенсивность созревания тимоцитов, по сравнению с таковой в группе контроля, замедлена, на что указывает увеличение относительных объемов как незрелых пре-Т-лимфоцитов (Thy-1), так и клеток с поверхностным рецептором к CD7. Как известно, CD7 экспрессируют тимоциты разной степени зрелости [3,4]. Также нарушение про-

Таблица 1

Относительные объемы основных клонов иммунных клеток в тимусах доношенных плодов и новорожденных

Группы сравнения	Контроль, %	ПЭ 1, %	ПЭ 2, %	ПЭ 3, %
CD3	50.4±2.29	49.85±2.85	46.0±3.13*	45.0±14*
CD4*	63.0±3.34	63.0±3.01	58.5±2.89*	56.4±24.5*
CD8*	21.5±2.33	20.4±2.16	17.2±1.9*	16.3±7.5*
CD4+/CD8*	2.91±0.31	3.1 ±0.28	3.43±0.3*	3.51±1.5*
CD7	71.0± 3.58	70.0±3.12	76.0±3.35*	79.0±17*
CD38	70.0±3.43	71.0±3.23	78.4±3.52*	66.0±17*
Thy-1	2.2±0.18	2.3±0.17	4.7±0.25 *	5.5±0.5*
CD22	0.87±0.106	0.93±0.102	1.5±0.123*	1.8±0.6*
HLA-Dr	1.6±0.14	1.9±0.12	2.2±0.17*	2.6±0.6*
ИЛ- 7	3.3±0.241	3.4±0.217	3.8±0.20 *	2.4±0.7*
ИЛ-4	2.8±0.237	2.7±0.22	2.0±0.232*	1.7±0.7*

Примечания: все значения представлены в виде средней ± ошибка средней;

* – отличия достоверны ($p < 0,05$), по сравнению с контролем.

**Относительные объемы основных клонов иммунных клеток
в тимусах недоношенных плодов и новорожденных**

Группы сравнения	Контроль, %	ПЭ 1, %	ПЭ 2, %	ПЭ 3, %
CD3	49.1 ± 5.4	48.4 ± 4.7	47.0 ± 4.1*	46.0 ± 2.8*
CD4 ⁺	60.0 ± 4.6	61.0 ± 6.0	59.0 ± 4.1*	58.5 ± 2.9*
CD8 ⁺	20.6 ± 4.0	20.3 ± 3.6	17.8 ± 3.35*	16.8 ± 1.96*
CD4 ⁺ / CD8 ⁺	2.9 ± 0.26	3.0 ± 0.27	3.3 ± 0.21*	3.5 ± 1.7*
CD7	74.6 ± 4.9	74.0 ± 4.3	77.0 ± 3.8*	79.0 ± 2.9*
CD38	72.14 ± 5.0	72.0 ± 2.9	76.0 ± 3.8*	70.0 ± 3.0*
Thy-1	2.4 ± 0.20	2.5 ± 0.19	4.5 ± 0.34*	5.3 ± 0.26*
CD22	0.65 ± 0.05	0.68 ± 0.04	0.95 ± 0.06*	1.1 ± 0.06*
HLA-Dr	1.6 ± 0.15	1.7 ± 0.16	2.0 ± 0.23*	2.4 ± 0.11*
ИЛ- 7	3.0 ± 0.38	3.0 ± 0.34	3.6 ± 0.45*	2.3 ± 0.13*
ИЛ-4	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.34	2.1 ± 0.26*	1.6 ± 0.19*

Примечание: все значения представлены в виде средней ± ошибка средней;

* – отличия достоверны ($p < 0,05$), по сравнению с контролем.

цессов созревания лимфоидной популяции тимуса у данных плодов подтверждается уменьшением популяции CD3- зрелых Т-лимфоцитов, а также уменьшением CD4⁺ – дифференцированных хелперов/индукторов – во всех группах преэклампсии. При этом, с возрастанием тяжести преэклампсии уменьшение данных показателей прогрессирует. Также задержке созревания тимоцитов, по-видимому, способствует угнетение ИЛ-4 продуцирующей активности клеток тимуса. ИЛ-4 продуцируется зрелыми тимоцитами и, в свою очередь, способствует пролиферации тимоцитов на более поздних стадиях их развития, а также стимулирует созревание и иммунологическую дифференцировку Т-клеток [6]. Анализ относительного объема тимоцитов, которые экспрессируют рецепторы к ИЛ-4, выявил достоверное его снижение при преэклампсии с нарастанием тяжести данного осложнения беременности, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В вилочковой железе доношенных плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией относительный объем CD8⁺ относительно популяции CD4⁺ резко уменьшен, что приводит к достоверному повышению иммунорегуляторного индекса. Можно предположить, что это является следствием особенностей антигенной стимуляции при преэклампсии, равно как и некоторое увеличение относительного объема В-лимфоцитов. Степень экспрессии HLA-Dr антигена макрофагами и дендритическими клетками тимусов доношенных плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией, по сравнению с контрольной группой, расценивается как высокая, что, по-видимому, на фоне усиленной антигенной стимуляции, характерной для преэклампсии, может рассматриваться как признак активной презентации аутоантигенов плода, поступающих в железу плода гематогенным путем. Достаточно высокая активность эпителиоцитов экспрессирующих HLA-Dr – антиген, возможно, играет определенную роль в усилении процессов миграции зрелых CD4⁺ и CD8⁺ тимоцитов из железы в периферические органы иммунной системы [7].

Анализируя данные тимусов недоношенных плодов и

новорожденных (табл. 2), мы обнаружили следующее. Несмотря на срок гестации 31–36 недель в группе контроля популяция тимоцитов достаточно зрелая, о чем свидетельствует сопоставление результатов иммуногистохимического исследования тимусов доношенных и недоношенных плодов. Количество зрелых CD3 тимоцитов практически равно таковому у доношенных (рис. 2), тогда как количество CD4 и CD8 несколько снижено. Но при этом хелперно\супрессорное взаимоотношение соответствует таковому у доношенных детей. Несколько увеличены популяции пролиферирующих клеток CD38, клеток на различных этапах дифференцировки CD7, а также незрелых пре-Т-лимфоцитов. Количество В-лимфоцитов уменьшено, тогда как количество клеток, экспрессирующих рецепторы к HLA-Dr-антигену соответствует таковому у доношенных плодов. Количество интерлейкин-продуцентов несколько снижено. Таким образом, можно предположить, что у недоношенных плодов и новорожденных от матерей с неосложненной беременностью имеются признаки усиления пролиферативной активности в сочетании с нарушением процессов созревания и дифференцировки тимоцитов.

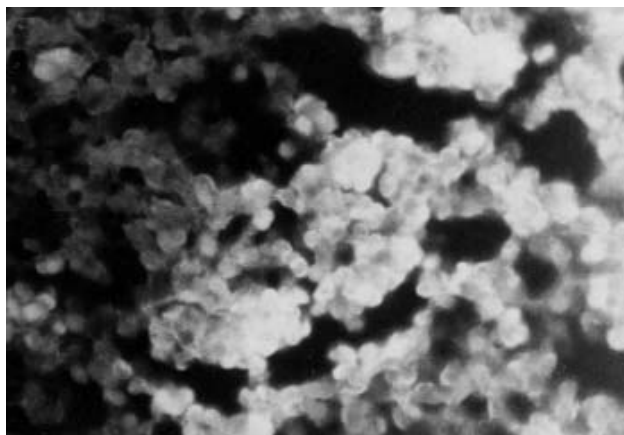


Рис. 2. CD3-тимоциты в тимусе недоношенного плода от матери с преэклампсией легкой степени тяжести. Непрямой метод Кунса с МКА к CD3, х400

При преэклампсии легкой степени тяжести у недоношенных плодов и новорожденных картина подобна контрольной. Интересно, что при этом несколько повышена популяция CD4 и, за счет этого, хелперно\супрессорное взаимоотношение соответствует таковому в группе преэклампсии легкой степени у доношенных плодов. Анализ данных групп ПЭ2 и ПЭ3 обнаружил следующее. По сравнению с контролем в тимусе при преэклампсии средней тяжести пролиферативная активность нарастает, о чем свидетельствует показатель относительного объема CD38 лимфоцитов. Однако, при тяжелой преэклампсии относительный объем CD38 клеток понижен, что свидетельствует о некотором снижении процессов пролиферации, тогда как среди тимоцитов обеих групп отмечается большая доля клеток, экспрессирующих рецепторы к CD7, что свидетельствует о нарушении созревания клеток. По нашим данным, относительный объем клеток-продуцентов ИЛ-7, регулирующих пролиферацию тимоцитов, увеличивается при среднетяжелой преэклампсии, а при тяжелой преэклампсии данный показатель уменьшается. Относительный объем CD8⁺ относительно популяции CD4⁺ уменьшен в обеих группах, что приводит к достоверному повышению иммунорегуляторного индекса ($p < 0,05$), который практически не отличается от такового в соответствующих группах доношенных плодов. При среднетяжелой и тяжелой преэклампсии относительные объемы как незрелых Т-лимфоцитов (Thy-1), так и клеток с поверхностным рецептором к CD7 увеличены. С другой стороны, это подтверждается уменьшением популяции CD3- зрелых Т-лимфоцитов при преэклампсии. Этому способствует угнетение ИЛ-4 продуцирующей активности клеток тимуса. Подобно доношенным плодам и новорожденным, в обеих исследуемых группах отмечается высокая степень экспрессии макрофагами и дендритическими клетками HLA-Dg антигена, равно как и рост популяции В-лимфоцитов.

Выводы

1. Иммунокомпетентные клетки тимусов плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией экспрессируют те же многочисленные рецепторы, что и тимусы потомков от матерей, чья беременность протекала физиологично. Это свидетельствует о том, что тимоциты

находятся на разных стадиях дифференцировки.

2. У незрелых плодов и новорожденных от здоровых матерей отмечается некоторое усиление пролиферативной активности лимфоидного компонента тимуса в сочетании признаками нарушения процессов созревания и дифференцировки тимоцитов.

3. При легкой степени преэклампсии в вилочковой железе плодов и новорожденных не формируются существенные иммунные изменения. При среднетяжелой преэклампсии в тимусе доношенных и недоношенных плодов и нарастает пролиферативная активность тимоцитов, а интенсивность созревания клеток железы замедляется. Вышеуказанное связано с усиленной продукцией ИЛ-7 и относительным дефицитом ИЛ-4.

4. При тяжелой преэклампсии отмечается резкое снижение пролиферативной активности лимфоидного компонента тимуса и интенсивности созревания и дифференцировки тимоцитов.

5. Несмотря на то, что показатели относительных объемов CD4 и CD8 несколько изменяются в каждой группе недоношенных детей, иммунорегуляторный индекс сохраняет стабильность в каждой соответствующей группе, по сравнению таковыми группами доношенных плодов.

Литература:

1. Шалина Р. Гестоз. Современное состояние вопроса / Шалина Р.И. // Акушерство и гинекология. – 2007. – №5. – С. 27–33.
2. Ушакова Г. Регуляторные и адаптационные процессы в системе мать-плацента-плод при гестозе различной степени тяжести / Ушакова Г.А., Рец Ю.В. // Акушерство и гинекология. – 2008. – № 4. – С. 11–16.
3. Партенадзе А. Иммунофенотипические особенности становления иммунокомпетентных клеток в фетальном тимусе / Партенадзе А.Н., Студеникин В.М. // Российский педиатрический журнал. – 1998. – № 4. – С. 44–47.
4. Смирнов В. Иммунодефицитные состояния / Смирнов В.С., Фрейдлин И.С. – СПб.: Фолиант. – 2000. – 568 с.
5. Хлыстова З. Становление системы иммуногенеза плода человека / Хлыстова З.С. // М.: Медицина, – 1987. – 256 с.
6. Porter B. Thymic and intestinal intraepithelial T lymphocyte development are each regulated by the gamma-c dependent cytokines IL-2, IL-7, and IL-15 / Porter B.O., Malek T.R. // Semin. Immunol. – 2000. – № 12 (5). – P. 465–474.
7. Ройт А. Основы иммунологии / Ройт А. – М.: Мир, 1991. – 329 с.

Сведения об авторах:

Галата Д.И., аспирант каф. патоморфологии, ХНМУ.

Сорокина И.В., д. мед. н., профессор, каф. патоморфологии, ХНМУ.

Адрес для переписки:

Галата Дарья Игоревна. 61022, Харьков, пр. Ленина, 4, ХНМУ, каф. патоморфологии.

Тел.: (057)7077333, E-mail: dasha2305@ukr.net