

**Л.С.Малофій**

Івано-Франківський  
національний медичний  
університет

**Ключові слова:** хронічне  
обструктивне захворю-  
вання легень, імунокомпе-  
тентні клітини, сегмента-  
рні бронхи.

*Надійшла: 26.12.2011*

*Прийнята: 12.02.2012*

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2012.1.37-42>

УДК 616-071+616.233+616.24

## **ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ІМУНО- КОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН В СЕГМЕН- ТАРНИХ БРОНХАХ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНЕ ОБСТРУКТИВНЕ ЗАХВОРЮ- ВАННЯ ЛЕГЕНЬ**

*Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Патоморфологія серцево-судинної системи, плаценти, жирової тканини, нирок, головного мозку, регуляторних систем (APUD, імунної) при метаболічному синдромі, гострій ішемії міокарда, облітеруючих захворюваннях судин нижніх кінцівок, хворобах легень, пухлинних процесах і внутрішньоутробних інфекціях у клініці й експерименті» (номер державної реєстрації 0107U002769).*

**Резюме.** Проведене комплексне імуногістохімічне дослідження місцевої імунної системи сегментарних бронхів 54 хворих на хронічне обструктивне захворювання легень. В статті наведені принципи розподілу та кількісні показники імунокомпетентних клітин. Встановлено кореляцію між рівнем експресії, стадією та клінічним перебігом хвороби. Отримані дані дослідження показали неоднозначну участь клітин місцевого імунітету у формуванні патогенетичних аспектів прогресування ХОЗЛ. Незалежно від фази перебігу хвороби відмічається різкий дисбаланс імунорегуляторного індексу. Переважна більшість цитотоксичних лімфоцитів спостерігається в ділянках дисрегенераторних процесів, а саме у вогнищах проліферації, гіперплазії, плоскоклітинної метаплазії та дисплазії бронхіального епітелію.

**Морфологія.** – 2012. – Т. VI, № 1. – С. 37-42.

© Л.С.Малофій, 2012

**Malofiy L.S. Peculiarity of immunocompetent cells allocation in segmental bronchus for patients with chronic obstructive pulmonary disease.**

**Summary.** We made complex immunohistology examination of local immune system of segmental bronchus for 54 patients with chronic obstructive pulmonary disease. In the article author give principles about allocation and quantitative index for immunocompetent cells. We ascertained correlation between level of expression, stage and clinical course of disease. Our examination demonstrated ambiguous fate for local immunity cells during formation of pathogenetical aspects about chronic obstructive pulmonary disease progress. There is a pronounced disbalance of immunoregulatory index. The predominance of cytotoxic lymphocytes is observed in the foci of disregeneration processes, namely, in proliferation, hyperplasia, squamous metaplasia and dysplasia of the bronchial epithelium.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease, immunocompetent cells, segmental bronchus.

### **Вступ**

В останні десятиріччя хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) виділене в окрему нозологічну форму, яке має відповідну стадійність, а також сформовані нові підходи до трактування хвороби, методів діагностики і профілактики (Dabbs D.J., 2002; Дзюблик А.Я. и соавт., 2007).

За даними літературних джерел на перебіг та прогноз ХОЗЛ значною мірою впливає стан імунної системи та окремих її факторів. Сучасні дані щодо функціонування імунної системи респіраторного тракту фрагментарні і потребують уточнення (Cosio M. G., 2004; Михайлюк І.О. та співавт., 2005; Brozyna S. et al., 2009).

Методи, що застосовуються для оцінки іму-

ного статусу при ХОЗЛ, не в повному обсязі відповідають зростаючим потребам клінічної практики і не дозволяють встановити діагноз на ранніх стадіях захворювання, а при проявах незворотного компонента бронхіальної обструкції – прогнозувати перебіг та важкість хвороби. В переважній більшості робіт проведені дослідження субпопуляцій лімфоцитів у периферійній крові, що не відображає розвитку імунних зрушень на рівні мукозосацієваної лімфоїдної тканини бронхів (Medzitov R., Janeway C.J., 2000; Чернушенко Е. Ф., 2003; Barnes, P.G. et al., 2003).

Таким чином, не дивлячись на наявність наукових праць, присвячених вивченню імунологічних аспектів патогенезу ХОЗЛ, механізмів її розвитку, ця проблема далека від розрішення.

Вивчення особливостей етіопатогенезу загострення ХОЗЛ, з врахуванням показників імунної відповіді дозволить удосконалити методи патогенетичної протизапальної терапії, покращити якість лікування.

**Мета дослідження** – оцінити принципи розподілу та кількісні показники імунокомпетентних клітин в сегментарних бронхів хворих на ХОЗЛ на різних стадіях захворювання для патогенетичного обґрунтування окремих аспектів розвитку хвороб.

#### **Матеріали та методи**

Проведене імуногістохімічне дослідження біоптатів сегментарних бронхів 54 хворих на ХОЗЛ, отриманих при бронхоскопії. Залежно від клінічного перебігу ХОЗЛ хворі розподілені на дві групи: I група – 25 хворих на ХОЗЛ у фазі ремісії (I стадія – 5 хворих, II стадія – 8 хворих, III стадія – 8 хворих, IV стадія – 4 хворих); II група – 29 хворих на ХОЗЛ у фазі загострення (I стадія – 5 хворих, II стадія – 9 хворих, III стадія – 11 хворих, IV стадія – 4 хворих). Контрольну групу склали 5 чоловік без бронхо-легеневої патології, які померли від цереброваскулярних захворювань.

Зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на спеціальні адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, потім депарафінізували відповідно до прийнятих стандартів. У зв'язку з тим, що при фіксації в формаліні відбувається порушення структури антигенних детермінант, яке призводить до зниження їх імуногенності, необхідним етапом ІГХ дослідження було проведення теплової індукції епітопного (антигенного) звороту (HIER - heat induction of epitope retrieval), в результаті якого відновлювались антигенні властивості тканини. Ми використовували нагрівання в цитратному буфері з рН=6,0 в автоклаві (8 хвилин при температурі +121°C) із симетричним розташуванням скельця у кюветі. Значення рН буферного розчину має важливе значення і для деяких антитіл може мати різні показники, наприклад 6,3 або 9,0.

В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до CD3-маркеру Т-лімфоцитів (клон SP7, Lab Vision), CD4-маркеру Т-хелперів (клон 4B12, Lab Vision), CD8-маркеру Т-супресорів (клон SP16, Lab Vision), CD56-маркеру NK-клітин, CD68-маркеру макрофагів (клон PG-M1, DAKO), CD20-маркеру В-лімфоцитів (клон L26, Lab Vision). Для кожного маркера виконувалися контрольні дослідження з метою виключення помилково позитивних або помилковонегативних результатів.

Важливими умовами специфічних та якісних імуногістохімічних реакцій є правильно підібраний титр антитіл, а також час і температура інкубації. Ми використовували інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C на протязі 30 хвилин. Титр

антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера з використанням у якості розчинника спеціального розчину antibody diluent (Lab Vision).

Наступний етап імуногістохімічного дослідження проводили з використанням системи візуалізації останнього покоління UltraVision LP (Lab Vision). Вторинні антитіла, що містили велику кількість молекул пероксидази хрому, наносили на зрізи та інкубували у вологих камерах протягом 30 хвилин з промиванням у ТРИС-буферному розчині між кожним етапом протягом 10 хвилин. Ідентифікація реакції проводилась завдяки нанесенню хромогену (DAB (Lab Vision)) під контролем мікроскопа протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді темно-коричневого забарвлення специфічних структур в залежності від маркеру (ядерна, цитоплазматична, мембрана реакція).

Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Маєра протягом 1-3 хвилин. Наступна дегідратація і включення у бальзам здійснювалися згідно розповсюдженим методикам.

Підрахунок клітин з позитивною експресією проводили у 10-ти полях зору при збільшенні ок. 10, об. 20 на біологічному мікроскопі XSP-128В з наступним фотографуванням цифровою фотокамерою Nikon Coolpix 4500.

Варіаційно-статистичну обробку отриманих даних здійснювали використанням t-критерія Стьюдента. Відмінності вважались статистично достовірними при рівні вірогідності 0,05 і вище. Обробка отриманих результатів проведена з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2000.

#### **Результати та їх обговорення**

При порівняльному аналізі імунологічних параметрів клітинного та гуморального місцевого імунітету, макрофагальної ланки імунної системи, визначення їх участі та значення вкладу кожного в розвиток патологічного процесу, були встановлені певні особливості рівня експресії та розподілу імунокомпетентних клітин в сегментарних бронхах хворих на ХОЗЛ (табл. 1).

У фазу ремісії ХОЗЛ лімфоцити з фенотипом CD3+, головним чином, виявляються поодинокі або групами, у вигляді невеликих скупчень навколо гіпертрофованих залоз підслизового шару сегментарних та субсегментарних бронхів. Позитивна експресія характеризується переважно незначно вираженим світлокоричневим забарвленням, в окремих випадках зустрічається помірна темно-коричнева експресія. На висоті загострення хвороби лімфоцити, що експерсують CD3+ також виявляються в товщі базальної мембрани залоз підслизового шару, проникаючи в міжепітеліальні простори. Крім цього спостерігається локалізація CD3+ поодинокі або групами у покривному бронхіальному епітелії та у вогнищах плоскоклітинної мета-

плазії (рис. 1, Б), причому число лімфоцитів з таким фенотипом має тенденцію до зростання у випадках де наявні ознаки дисплазії. Звертає увагу зміна інтенсивності експресії у фазу загострення,

яка проявляється переважно темно-коричневим забарвленням.

Таблиця 1  
Ступінь експресії лімфоцитів, з різними фенотипами в стінці сегментарних бронхів при ХОЗЛ

Групи дослідження	CD-3	CD-4	CD-8	CD-20	CD-56	CD-68
	Інтенсивність забарвлення					
ХОЗЛ, фаза ремісії, (n=25)	+	++	++	++	+	+
ХОЗЛ, фаза загострення, (n=29)	++	++	+++	++	+	+
Контроль, (n=5)	+	+	++	+	+	+

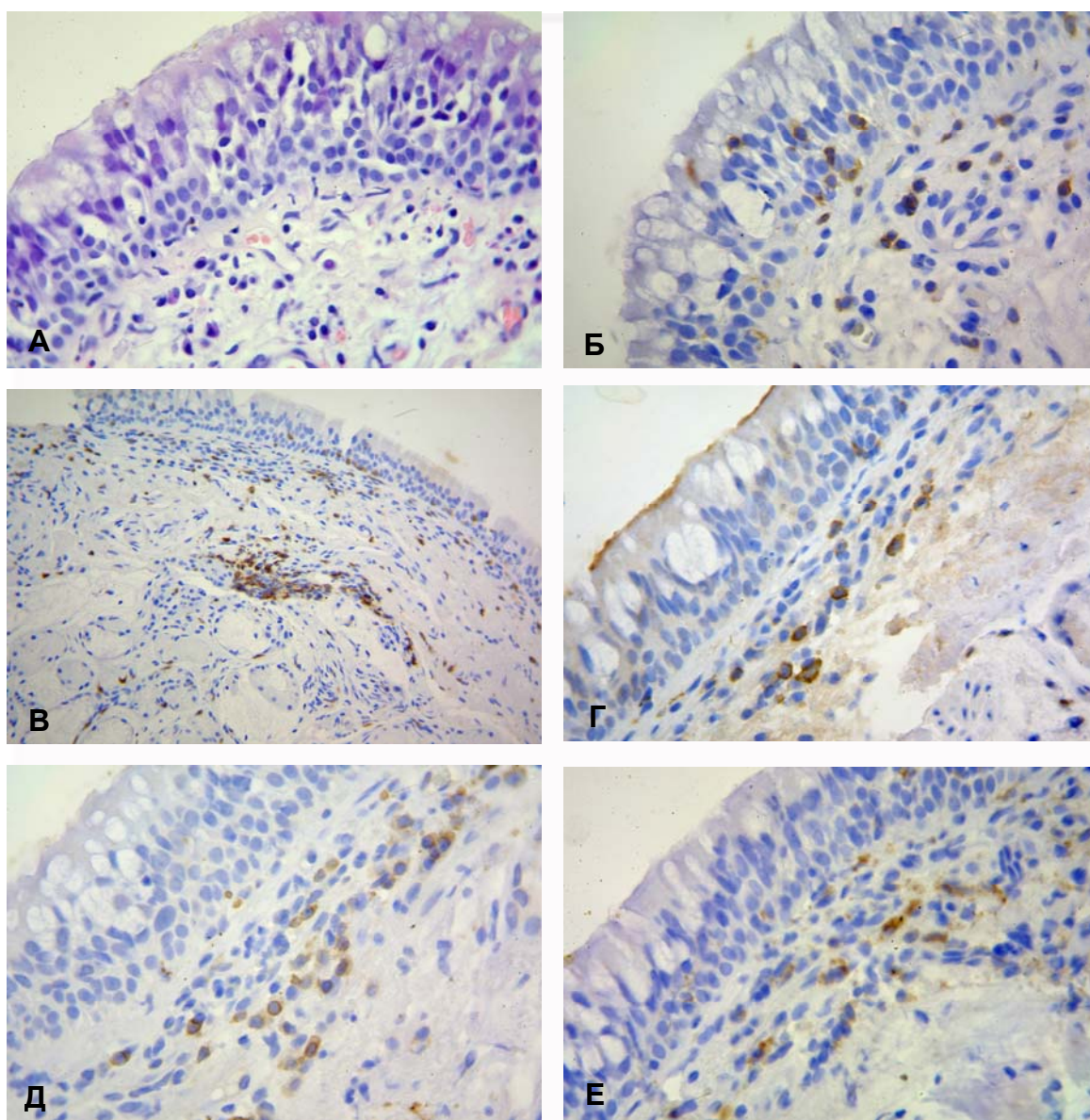


Рис. 1. Розподіл імунокомпетентних клітин в сегментарних бронхах з плоскоклітинною метаблазією у хворого на хронічне обструктивне захворювання легень (чоловік, 56 років). Забарвлення: А – гематоксиліном та еозином; Б-Е – імуногістохімічна реакція з моноклональними антитілами: Б – CD-3 (клон SP7, Lab Vision); В – CD-4 (клон 4B12, Lab Vision); Г – CD-8 (клон SP16, Lab Vision); Д – CD-20 (клон L26, Lab Vision); Е – CD-68 (клон PG-M1, DAKO) з додатковим забарвленням гематоксиліном Маєра. А, Б, Г, Д, Е –  $\times 200$ ; В –  $\times 100$ .

Лімфоцити з позитивною експресією CD3+ виявляються дифузно у лімфодних вузликах, в яких відмічається різна інтенсивність забарвлення (рис. 2, Б).

В I стадії ХОЗЛ, у фазу ремісії, абсолютна кількість лімфоцитів, експресуючих на своїй поверхні CD3+ маркер, знаходиться в межах характерних для контрольної групи спостереження, тенденція до наростання відмічається у пацієнтів у період загострення хвороби ( $p > 0,05$ ).

При важкій формі ХОЗЛ вміст CD3+ лімфоцитів є максимальним і досягає вірогідності у порівнянні з контрольною групою незалежно від фази хвороби ( $p < 0,05$ ).

Клітини з хелперними функціями (лімфоцити CD4+) виявляються в субепітеліальному шарі в зонах плоскоклітинної метаплазії (рис. 1, В) та у вигляді скупчень навколо залоз підслизового шару (рис. 2, В).

Також відмічається зниження числа лімфоцитів з фенотипом CD4+ при ХОЗЛ III-IV стадії ( $80 \pm 12,5$ ;  $p < 0,001$ ).

Зниження рівня експресії CD3+ лімфоцитів та рівня клітин з фенотипом CD4+ свідчить про напружені реакції клітинного імунітету при ХОЗЛ, а також опосередковано про зниження проліферації та диференціації В-лімфоцитів (CD4+ володіє даною дією).

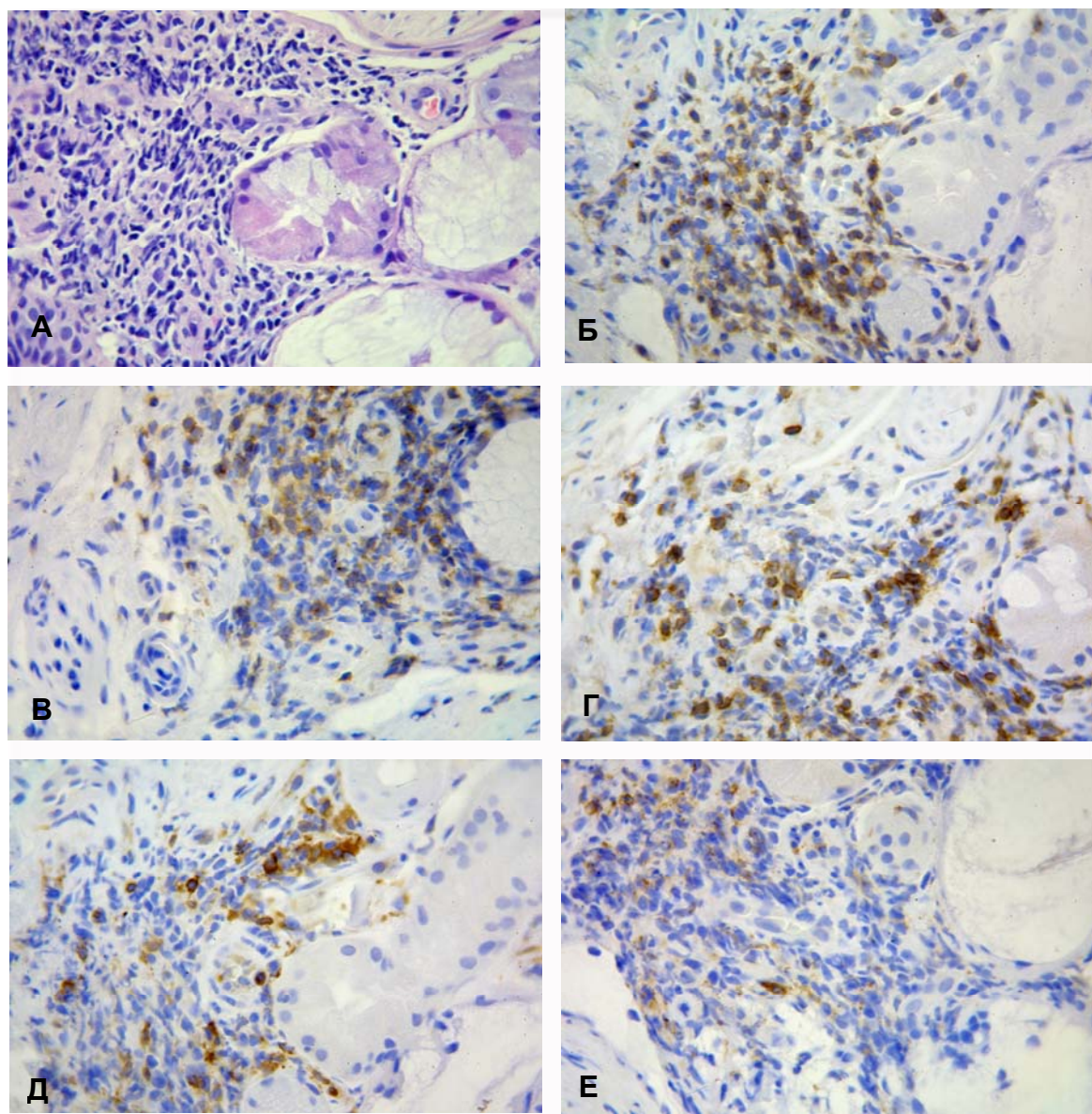


Рис. 2. Експресія імунокомпетентних клітин в залозах підслизового шару сегментарного бронху у хворого на хронічне обструктивне захворювання легень (чоловік, 47 років). Забарвлення: А – гематоксиліном та еозином; Б-Е – імуногістохімічна реакція з моноклональними антитілами: Б – CD-3 (клон SP7, Lab Vision); В – CD-4 (клон 4B12, Lab Vision); Г – CD-8 (клон SP16, Lab Vision); Д – CD-20 (клон L26, Lab Vision); Е – CD-68 (клон PG-M1, DAKO) з додатковим забарвленням гематоксиліном Маєра. А, Б, Г, Д, Е –  $\times 200$ ; В –  $\times 100$ .

Лімфоцити, що експресують на своїй поверхні CD8<sup>+</sup> (клітини з супресорною активністю) спостерігаються в усіх структурних компонентах стінки сегментарних та субсегментарних бронхів.

Клітини з фенотипом CD8<sup>+</sup> виявляються в базальній мембрані епітеліального шару та гіпертрофованих залоз підслизового шару, інколи в пластах десквамованого епітелію. Як і CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> виявляється внутрієпітеліально та субепітеліально у вогнищах плоскоклітинної метаплазії (рис. 1, Г), а також периваскулярно. Значна експресія CD8<sup>+</sup> спостерігається у лімфоїдних вузликах та характеризується високою інтенсивністю забарвлення (рис. 2, Г).

При міжгруповому порівнянні, абсолютний рівень клітин, що експресують CD8<sup>+</sup> маркер в субепітеліальних ділянках у фазу загострення має тенденцію до збільшення і є недостовірним ( $p < 0,05$ ) в I та II стадії хвороби. Його показники коливаються від  $10,2 \pm 1,9$  та  $10,6 \pm 1,3$  відповідно. В третій та четвертій стадії хвороби спостерігається достовірне підвищення показників CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ),  $17,1 \pm 2,1$  та  $16,4 \pm 2,7$  відповідно. В лімфоїдних вузликах спостерігається збільшення абсолютного числа CD8<sup>+</sup> при I, II, III та IV стадії ХОЗЛ, та характеризується показниками  $87,3 \pm 12,3$ ;  $90,4 \pm 12,7$ ;  $112,2 \pm 10,9$ ;  $123,2 \pm 12,6$  відповідно ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з контрольною групою. Відносний рівень лімфоцитів з фенотипом CD8<sup>+</sup> підвищений ( $p < 0,001$ ) при всіх ступенях важкості ХОЗЛ.

Також відмічається зниження співвідношення CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> – різкий дисбаланс імунорегуляторного індексу при всіх стадіях ХОЗЛ, незалежно від фази перебігу хвороби.

Позитивна експресія маркеру NK – клітин (CD56<sup>+</sup>) переважно спостерігається периваскулярно, у вигляді вогнищевих скупчень та в міжепітеліальних просторах бронхіального епітелію в ділянках його активної проліферації з тенденцією до плоскоклітинної метаплазії. Абсолютні показники CD56<sup>+</sup> лімфоцитів достовірно збільшувались тільки у фазу загострення хвороби з II по IV стадії хвороби.

При вивченні гуморальної імунної відповіді, у фазі загострення ХОЗЛ, в усіх групах пацієнтів виявлені статистично достовірні зміни, які характеризувались низькими показниками В-лімфоцитів з фенотипом CD20<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з контрольною групою.

В I та II стадії лімфоцити з експресією CD20<sup>+</sup> виявляються розсіяно субепітеліально ( $9 \pm 2,8$  та  $8,3 \pm 2,1$  відповідно), навколо гіпертрофованих залоз підслизового шару ( $53 \pm 4,5$  та  $42 \pm 4,1$  відповідно) та в лімфоїдних вузликах до  $23 \pm 5,6$  та  $18 \pm 3,6$  відповідно (рис. 2, Д). Також CD20<sup>+</sup> виявляється між м'язовими волокнами сегментарних бронхів до  $14,1 \pm 1,6$  клітин. Тенденція до групового скупчення лімфоцитів з фенотипом

CD20<sup>+</sup> відмічається при III та IV стадії ХОЗЛ субепітеліально та інтраепітеліально в ділянках плоскоклітинної метаплазії з ознаками диспластичних змін (рис. 1, Д).

У фазу ремісії хвороби спостерігається тенденція до активації В-клітинної ланки імунітету, що виражалось у тенденції до збільшення показників CD20<sup>+</sup> лімфоцитів.

З елімінаційних механізмів в процесі імунної відповіді вивчена макрофагальна активність, а саме ступінь експресії лімфоцитів CD68<sup>+</sup>. Даного фенотипу лімфоцити виявляються поодинокі в інтраепітеліальних просторах ( $3,2 \pm 0,6$ ), субепітеліально ( $12,3 \pm 1,4$ ) (рис. 1, Е) та між м'язовими волокнами ( $1,5 \pm 0,2$ ) (рис. 2, Е). Показники рівня CD68<sup>+</sup> мають тенденцію до наростання в періоді загострення ХОЗЛ.

Таким чином, у хворих на ХОЗЛ в стінці сегментарних бронхів спостерігається імунологічний дисбаланс. При прогресуванні хвороби відмічається збільшення вмісту Т- і В-лімфоцитів, а саме цитотоксичних лімфоцитів, експресуючих CD8<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> та CD4<sup>+</sup>. Останні виконують важливі імунорегуляторні функції, в тому числі безпосередньо приймають участь в передачі інформації цитотоксичним лімфоцитам CD8<sup>+</sup>. Тривале персистування змін імунної відповіді веде до пролонгації запального процесу, зниження механізмів антибактеріального та протівірусного захисту дихальних шляхів, а також вказує на недостатню ефективність терапевтичних заходів (Дзюблик А.Я. и соавт., 2007; Brozyna S. et al., 2009).

#### Висновки

1. У фазі загострення ХОЗЛ виявлена активація Т-клітинної ланки (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> - лімфоцитів), та NK-клітин на фоні зниження В-лімфоцитів

2. У фазі ремісії ХОЗЛ встановлена активація гуморального імунітету, представленого В-лімфоцитами (CD20<sup>+</sup>) на рівні зниження лімфоцитів з фенотипами CD3<sup>+</sup> та CD4<sup>+</sup>.

3. Відмічається зниження співвідношення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, що свідчить про різкий дисбаланс імунорегуляторного індексу при всіх стадіях ХОЗЛ, незалежно від фази перебігу хвороби.

4. Виявлені особливості експресії імунокомпетентних клітин та морфологічних змін в стінці сегментарних бронхів у хворих на ХОЗЛ свідчить про формування хронічного запального процесу на II стадії хвороби.

5. Найбільша концентрація імунокомпетентних клітин (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>-лімфоцитів та NK-кілерів) в стінці сегментарних бронхів у хворих на ХОЗЛ спостерігається в ділянках гіперплазії, проліферації та плоскоклітинної метаплазії бронхіального епітелію.

#### Перспективи подальших досліджень

Отримані результати вказують на необхідність електронікроскопічного дослідження

активності імункомпетентних клітин сегментарних бронхів хворих на ХОЗЛ, для встановлення їх міжклітинної взаємовідносин та взаємодій,

особливо, на стадії становлення компенсаторних реакцій, з метою уточнення пато- та морфогенезу хвороби.

### Літературні джерела

Дзюблик А. Я. Хроническое обструктивное заболевание легких: современная концепция патогенеза, подходы к терапии / А. Я. Дзюблик, А. А. Мухин, Е. И. Бялик // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2007. – Т. 1, № 6. – С. 27–35.

Михайлюк І. О. Стан імунної системи легенів в нормі і при хронічних неспецифічних захворюваннях / І. О. Михайлюк, О. Г. Курик, Ю. П. Артиш // Галицький лікарський вісник. – 2005. – Т. 12, № 4. – С. 152–154.

Чернушенко Е. Ф. Актуальные проблемы иммунологии во фтизиатрии и пульмонологии : материалы III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України, 25–28 трав. 2003 р., Київ // Український пульмонологічний журнал. — 2003. — № 2. — С. 94–95.

Barnes, P. G. Chronic obstructive pulmonary

disease: molecular and cellular mechanisms / P. G. Barnes, S. D. Shapiro, R. A. Pauwels // Eur. Respir. J. – 2003. – № 22. – P. 672–688.

Chemotactic mediators of Th1 T-cell trafficking in smokers and COPD patients / S. Brozyna, J. Ahern, G. Hodge [et al.] // COPD. – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 4–16.

Cosio M. G. Autoimmunity, T-cells and STAT-4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / M. G. Cosio // Eur. Respir. J. - 2004. - Vol. 24. - P. 3-5.

Dabbs D. J. Diagnostic immunohistochemistry. / D. J. Dabbs– Churchill Livingstone, 2002. — 676 p.

Medzhitov R. Innate immunity / R. Medzhitov, C.J. Janeway // N. Engl. J. Med. - 2000. – Vol. 343. – P. 338-344.

### **Малофій Л.С. Особенности распределения иммунокомпетентных клеток в сегментарных бронхах больных хроническим обструктивным заболеванием легких.**

**Резюме.** Проведено комплексное иммуногистохимическое исследование местной иммунной системы сегментарных бронхов 54 больных на хроническое обструктивное заболевание легких. В статье представлены принципы распределения и количественные показатели иммунокомпетентных клеток. Установлено корреляцию между уровнем экспрессии, стадией и клиническим течением болезни. Проведенное исследование показало неоднозначное участие клеток местного иммунитета в формировании патогенетических аспектов хронического обструктивного заболевания легких. Независимо от фазы течения болезни отмечается резкий дисбаланс иммунорегуляторного индекса. Преобладание цитотоксических лимфоцитов наблюдается в очагах дисрегенераторных процессах, а именно при пролиферации, гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии бронхиального эпителия.

**Ключевые слова:** хроническое обструктивное заболевание легких, иммунокомпетентные клетки, сегментарные бронхи.