

О.М.Рудяк

Івано-Франківський
національний медич-
ний університет

Ключові слова: іму-
нокомпетентні кліти-
ни, недоношені, ново-
народжені, метаболіч-
ний синдром, легені.

Надійшла: 16.04.2011
Прийнята: 11.06.2011

УДК: 616-095+616.211-008.4+613.952+616.12-008.331+616.379-008.64

ПАТОМОРФОЛОГІЯ ІМУНОКОМПЕТЕН- ТНИХ КЛІТИН ІМУННОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІВ ДИХАННЯ НЕДОНОШЕНИХ ДІТЕЙ НА ФОНІ КОМПОНЕНТІВ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ МАТЕРІ

Резюме. В проведеному імуногістохімічному дослідженні місцевої імунної системи легень (90 недоношених новонароджених дітей, 29-33 тижні гестації), розділених на 3 групи відносно до компонентів метаболічного синдрому матері, виявлені особливості та закономірності розподілу, кількісні показники імунокомпетентних клітин в бронхіальному та респіраторному відділах. Встановлено, що у дітей I групи (артеріальна гіпертензія та дисліпідемія матері) пригнічується загальна популяція Т-лімфоцитів (CD3), знижується хелперна функція (CD4), виявляється змішана супресорна реакція (CD8), зменшується кількість субпопуляцій В-лімфоцитів (CD20), пригнічується макрофагальна функція (CD68). В легенях дітей II групи (цукровий діабет 2-го типу та дисліпідемія матері) пригнічується хелперно-супресорна функція (CD4, CD8), підвищується макрофагальна реакція (CD68). Зменшення абсолютної кількості субпопуляцій цитотоксичних і супресорних Т-лімфоцитів, зниження кількості В-лімфоцитів (CD20) та пригнічення макрофагальної функції (CD68) спостерігається у дітей III групи (ожиріння і дисліпідемія матері). Порівняльний аналіз імунного статусу легень у дітей трьох груп свідчить про різкий дисбаланс імунорегуляторного індексу, депресію компонентів місцевої імунної системи легень та про негативний вплив патології матері на гістогенетичні процеси формування органів дихання.

Морфологія. – 2011. – Т. V, № 2. – С. 61-66.

© О.М.Рудяк, 2011.

Rudyak O.M. Distribution of immunocompetent cells in the lungs of premature newborns on the background of some components of mother metabolic syndrome.

Summary. In immunohistochemical researching of the local immune system of the lungs (90 premature newborns, 29-33 weeks gestation), divided into 3 groups with respect to the components of mothers metabolic syndrome, the features and patterns of distribution, quantitative indicators of immune cells in the bronchial and respiratory departments are detected. It was determined that children who belong to group №1 (mothers hypertension and dyslipidemia) have the total depression of T-lymphocytes (CD3), reduction of helper function (CD4), mixed reaction of suppressors (CD8), decreasing the number of B-lymphocytes - subpopulations (CD20), inhibition of macrophagic function (CD68). In group№2 (mothers diabetes type 2 and dyslipidemia) we observed depression of helper-suppressor functions (CD4, CD8), increasing of macrophagic reaction (CD68). Reducing of the absolute number of suppressor and cytotoxic T-lymphocytes subpopulations, a decreasing of B-lymphocytes (CD20) and inhibition of macrophagic functions (CD68) is observed in group№3 of children at the background of mothers adiposity and dyslipidemia. Reducing of expression of CD3 lymphocytes and levels of CD4 cells shows intensive reaction of cellular immunity in premature newborns. Comparative analysis of the immune status of the lungs of children in three groups with different components of mothers metabolic syndrome shows an acute disbalance of immunoregulation index, and the negative impact of mothers disease on histogenetic processes of respiratory organization.

Key words: immunocompetent cells, premature newborns, metabolic syndrome, lung.

Вступ

Стан імунної системи недоношених новонароджених дітей є предметом прицільного вивчення педіатрів та імунологів у зв'язку з високим рівнем захворюваності і перинатальної смертності в Україні (Сміян І.С., 2000; Дубровин М.М., 2001; Мороз Т.Ю., Сизякіна Л.П., 2003). Разом з тим, публікації, що висвітлюють дану проблему в основному присвячені вивченню імуноглобулінів та показників імунної системи в крові (Антипкін Ю.Г., Ковальчук О.Л., 2001;

Сырцов В.К., 2001). Недостатньо уваги приділяється дослідженню морфологічних аспектів місцевої ланки імунної системи легень (Криворучко Е.Г., 2000; Кушнарєва М.В., 2002). Саме тому актуальним є вивчення локалізації, розподілу, взаємовідносин клітин бронхоасоційованої імунної системи бронхів, паренхіми легень недоношених новонароджених дітей та впливу на них різних чинників зі сторони матері.

Мета дослідження – оцінити принцип розподілу та кількісні показники імунокомпетент-

них клітин у легенях недоношених новонароджених дітей на фоні деяких компонентів метаболічного синдрому матері.

Матеріали та методи

Імуногістохімічне дослідження проводили на секційному матеріалі легень 120 недоношених новонароджених дітей (29-33 тижні гестації), розділених на три групи в залежності від компонентів метаболічного синдрому матері. I група – 30 випадків недоношених новонароджених дітей (29-33 тижні гестації) з артеріальною гіпертензією і дисліпідемією у матері; II група – 30 випадків з цукровим діабетом 2 типу і дисліпідемією у матері; III група – 30 недоношених новонароджених дітей на фоні ожиріння і дисліпідемії у матері. Контрольна група – 30 недоношених дітей, народжених від здорових матерів.

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-супрессорів (клон SP16, Lab Vision), CD20 – маркеру В-лімфоцитів (клон L26, Lab Vision), CD68 – маркеру макрофагів. Підрахунок клітин з позитивною експресією проводили у 10-ти полях зору при збільшенні ок. 10, об. 20 на біологічному мікроскопі XSP – 128B з наступним фотографуванням цифровою фотокамерою Nikon Coolpix 4500.

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

Результати та їх обговорення

Результати проведених нами досліджень імунокомпетентних клітин бронхіального дерева та респіраторного відділу легень в дітей різних груп показали, що мають місце особливості та закономірності їх експресії, розподілу та чисельності. Так, у легенях дітей I групи лімфоцити з фенотипом CD3, головним чином, виявляються

поодинокі або у вигляді невеликих скупчень навколо слизово-білкових залоз підслизового шару сегментарних та субсегментарних бронхів (12,4±2,6). Позитивна експресія цих клітин характеризується незначно вираженим світло-коричневим або помірно темно-коричневим забарвленням (табл. 1). Інколи лімфоцити, що експресують CD3 також виявляються у власній пластинці і між епітеліальними клітинами слизової оболонки сегментарних і субсегментарних бронхів, їх кількість коливається в межах 9,3±0,1 (p<0,05). Крім цього спостерігається локалізація CD3 поодинокі або групами в епітеліальному шарі (5,8±0,4) внутрішньочасточкових бронхів. Лімфоцити, що експресують на своїй поверхні CD3 також виявляються у товщині міжальвеолярних перетинок (4,2±0,7), нечисельно в просвіті альвеол (3,5±0,6) і між альвеолоцитами (рис. 1А). В ділянках ателектазів кількість позитивних клітин збільшується і складає 9,2±0,8 (p<0,05).

В респіраторному відділі легень дітей II і III груп кількість лімфоцитів, експресуючих на своїй поверхні CD3 маркер, значно зростає, нерівномірно розташовуючись у товщині міжальвеолярних перетинок (5,3±1,2 – 6,1±1,3) (p<0,05). Помірно реагуючі CD3 клітини також виявляються у просвіті альвеол.

В легенях дітей трьох груп клітини з хелперними функціями (лімфоцити CD4) виявляються в субепітеліальному шарі сегментарних та субсегментарних бронхів (18,2±3,7), та у вигляді скупчень навколо залоз підслизового шару (10,7±5,1) (p<0,05). Так, у легенях дітей I групи лімфоцити з фенотипом CD4 розташовуються поодинокі (3,4±0,5) у потовщених міжальвеолярних перетинках з помірною експресією. В емфізематозних ділянках легень інтенсивність забарвлення збільшується. В дітей II і III груп кількість позитивних CD4 клітин у сегментарних та субсегментарних бронхів складає від 6,7±0,4 до 10,3±0,3 (p<0,05). Клітини з хелперними функціями між альвеолоцитами бронхіол (7,1±0,6 – 7,8±0,3) (рис. 1Б). Поодинокі позитивні клітини зустрічаються у просвіті бронхіол.

Таблиця 1

Ступінь експресії лімфоцитів з різними фенотипами в стінці сегментарних бронхів недоношених новонароджених дітей на фоні окремих компонентах метаболічного синдрому матері

Групи дослідження	CD-3	CD-4	CD-8	CD-20	CD-68
	Інтенсивність забарвлення				
I	++	+	+++	+	+
II	+	+	++	+	+
III	+	++	+	+	+
Контрольна група	+	++	++	++	+

Примітка: + - слабка інтенсивність; ++ - помірна; +++ - виражена.

Зниження рівня експресії CD3 лімфоцитів та рівня клітин з фенотипом CD4 свідчить про напруження реакцій клітинного імунітету у легенях

недоношених новонароджених дітей.

У легенях недоношених новонароджених дітей I групи виявляється змішана реакція CD8,

яка характеризується одночасним забарвленням як ядер, так і цитоплазми клітин з переважанням останньої. Лімфоцити, що експресують на своїй поверхні CD8 (клітини з супресорною активністю) виявляються у всіх структурних компонентах стінки сегментарних та субсегментарних бронхів. Незначна цитоплазматична позитивна реакція CD8 спостерігається у вільчастому епітелії сегментарних та субсегментарних бронхів. Інтенсивна реакція змішаного типу CD8 має місце у клітинах, які знаходяться на поверхні призматичного епітелію слизової оболонки бронхів ($12,6 \pm 1,5$; $14,5 \pm 1,2$; $13,1 \pm 0,9$) ($p < 0,05$) та в поодиноких лімфоцитах в базальному шарі. В складках слизової оболонки і ділянках гіперплазії бронхіального епітелію відмічається тенденція до збільшення числа позитивно забарвлених клітин. Поодинокі CD8 лімфоцити виявляються в просвіті бронхів у складі десквамованого бронхіального епітелію. В набряклій перибронхіальній тканині CD8 експресуються, головним чином, навколо капілярів та в просвіті судин. Клітини з супресорними функціями поодинокі або невеликими групами (2-3 клітини) наявні в потовщених міжальвеолярних перетинках (до $11,8 \pm 6,6$), ($p < 0,05$) та поодинокі в просвіті альвеолярних ходів.

У легенях дітей II групи відмічалась така реакція лімфоцитів з фенотипом CD8 внутрішньочасточкових бронхів у порівнянні з попередньою генерацією бронхів. В деяких випадках незначна позитивна реакція слизової оболонки внутрішньочасточкових бронхів має місце в ділянках вираженої клітинної проліферації. У вогнищах дистелектазів виявляються 1-2 CD8 позитивних

клітин в полі зору. Їх більша кількість знаходиться у розширених альвеолах, що коливається від $13,5 \pm 0,5$ до $15,2 \pm 0,4$ ($p < 0,05$). Групами або у вигляді скупчень позитивні CD8 клітини розташовуються у потовщених міжальвеолярних перегородках ($5,6 \pm 1,5$).

Для III групи дослідження характерні інтенсивно забарвлені Т-супресори, що виявляються на поверхні слизової оболонки нерівномірно розширених внутрішньочасточкових бронхів. CD8 поодинокі наявні серед ендотеліальних клітин артеріол, що супроводжують внутрішньочасточкові бронхи. Ступінь експресії клітин з супресорною функцією знижується у бронхіолах та поодинокі або невеликими групами вони виявляються в альвеолярних ходах, що складає $8,3 \pm 0,4$ (рис. 1В). В ділянках десквамації недиференційованих епітеліальних клітин термінальних незрілих альвеолярних ходів та мішків зустрічаються розсіяні CD8 клітини.

В дітей III групи у респіраторних відділах легень відмічається зниження кількості лімфоцитів ($4,8 \pm 0,3$) з фенотипом CD8, які локалізуються поодинокі в потовщених альвеолярних перетинках.

На підставі даних про співвідношення CD4 та CD8 клітин можна визначити ще один важливий діагностичний критерій – імунорегулюючий індекс (ІРІ), який підкреслює суть Т-клітинних змін і, відповідно, зниження резистентності організму. Відмічається різкий дисбаланс імунорегуляторного індексу у недоношених новонароджених дітей, про що свідчать знижені показники співвідношення CD4/CD8, незалежно від захворювань матері (табл. 2).

Таблиця 2

Співвідношення хелперно-супресорних Т-лімфоцитів та показники імунорегулюючого індексу у легенях недоношених новонароджених дітей (29-33 тижні гестації) при окремих компонентах метаболічного синдрому матері, ($M \pm m$)

Групи дослідження	Імунологічні показники					
	CD4		CD8		ІРІ	
	БВ	РВ	БВ	РВ	БВ	РВ
I	$18,2 \pm 3,7$	$3,4 \pm 0,5$	$12,6 \pm 1,5$	$11,8 \pm 6,6$	$1,44 \pm 2,41$	$0,29 \pm 0,32$
II	$6,7 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,6$	$14,5 \pm 1,2$	$13,2 \pm 0,5$	$0,46 \pm 0,52$	$0,54 \pm 0,91$
III	$10,3 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,3$	$13,3 \pm 0,9$	$8,3 \pm 0,4$	$0,77 \pm 0,80$	$0,94 \pm 1,20$
Контрольна група	$11,4 \pm 0,5$	$10,9 \pm 0,3$	$12,4 \pm 0,3$	$13,7 \pm 0,1$	$0,92 \pm 0,11$	$0,8 \pm 0,2$
	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)

Примітка: БВ – бронхіальний відділ; РВ – респіраторний; вірогідність показників порівняно з контрольною групою – $p < 0,05$.

У I групі виявляються поодинокі розсіяні CD20 позитивні клітини субепітеліально ($5,2 \pm 2,1$ та $4,3 \pm 2,5$), навколо залоз підслизового шару ($21,1 \pm 3,1$ і $17,3 \pm 2,3$) та в лімфоїдних вузликах ($15,2 \pm 1,5$ та $13,1 \pm 2,1$) ($p < 0,05$).

Клітини зі змішаним типом реакції переважно ідентифікуються в слизовому шарі поодинокі або згруповано по 3-4 клітини.

Відмічається незначне посилення експресії даних клітин в ділянках базальноклітинної проліферації слизової оболонки та в десквамованому бронхіальному епітелії. Поодинокі клітини спостерігаються в набряклій та розволоненій базальній мембрані слизової оболонки сегментарних бронхів та навколо залоз підслизового шару. У потовщених міжальвеолярних перетин-

ках та у просвітах бронхіол експресія CD20 позитивна (рис. 1Г).

У III групі спостерігається така ж особливість розподілу CD20, які виявляються в базальній мембрані внутрішньочасточкових бронхів. В розширених міжепітеліальних просторах слизової оболонки виявляються поодинокі

CD20. Наявна рівномірна експресія в міжальвеолярних перетинках, в зонах дрібних чи поширених ателектазів, а також в розширених альвеолярних ходах та мішках (до $5,7 \pm 2,5$) ($p < 0,05$). Експресія CD20 проявляється в товщі судинної стінки.

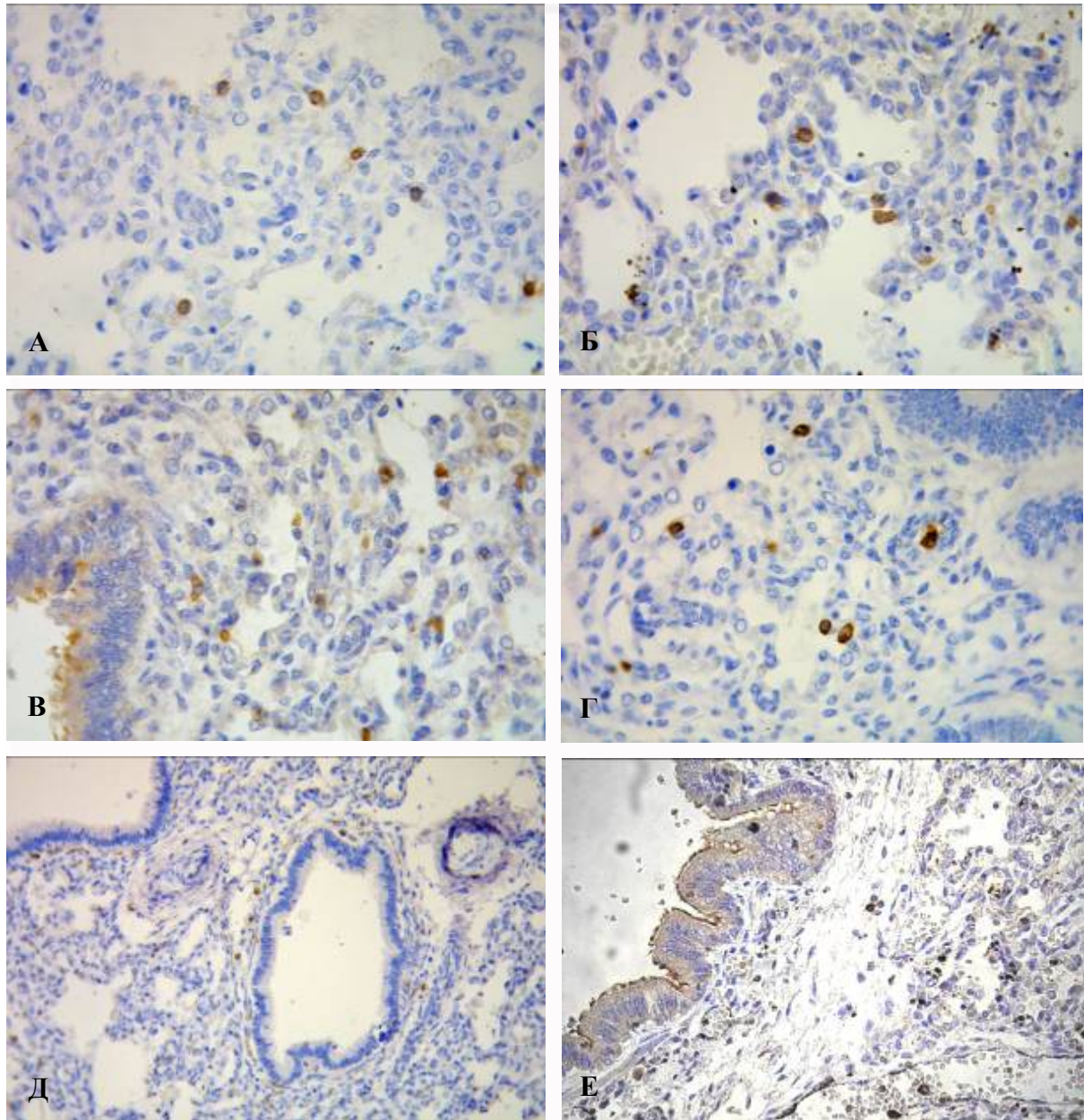


Рис. 1. Розподіл імунокомпетентних клітин у легенях недоношених новонароджених дітей: А – поодинокі експресія CD3 у потовщених міжальвеолярних перетинках у дітей I групи дослідження; Б – розташування клітин з хелперними функціями (лімфоцити CD4) в епітеліальному шарі бронхіол, помірна реакція у міжальвеолярних перетинках легень дітей II-ої групи; В – знижена експресія клітин з супресорною функцією у бронхіолах та поодинокі CD8-позитивні клітини в альвеолярних ходах (III-я група); Г – інтенсивна експресія CD20 на апікальній поверхні епітелію респіраторних ходів та в їх просвіті (I-а група); Д – перибронхіальна експресія CD 68 у внутрішньочасточковому бронху (II група); Е – CD 68-позитивні клітини в стінці крупного бронха (III група). Забарвлення: імуногістохімічна методика з первинними антитілами. Зб.: Д, Е – ок. 10, об. 20; А, Б, В, Г, – ок. 10, об. 40.

У легенях дітей I групи експресія CD68 позитивних клітин спостерігається у підслизовому

шарі внутрішньочасточкових бронхів, клітини розміщуються поодинокі і в невеликій кількості

(рис. 1Д). Ступінь експресії CD68 позитивних клітин з макрофагальною функцією знижується в бронхіолах; вони поодинокі виявляються в альвеолярних ходах. У легенях II групи дослідження спостерігається така ж особливість розподілу та експресії CD68 позитивних клітин з макрофагальною функцією (рис. 1Е). Спостерігається слабка реакція CD68 позитивних клітин внутрішньочасточкових бронхів, які розміщуються поодинокі у підслизовому шарі (III група дослідження).

В ділянках вираженого ателектазу експресія CD68 позитивних клітин виявляється поодинокі або згруповано в міжальвеолярних перетинках у I і II групах дослідження. А в ділянках розширених альвеол реакція CD68 клітин позитивна, вони виявляються також поодинокі у міжальвеолярних перетинках. Ідентифікується слабка експресія CD68 позитивних клітин, які розміщуються поодинокі в міжальвеолярних перетинках легень у III групі дослідження.

Таким чином, розміщення CD68 позитивних клітинних елементів макрофагально-гістіоцитарного ряду в просвіті альвеол разом із гіаліновими мембранами свідчить про активну макрофагальну реакцію на формування або на сформовані мембрани, які є "стороннім тілом" по відношенню до респіраторного тракту. У гіалінових мембранах зустрічаються CD68 позитивні клітинні значно більших розмірів, ніж в міжальвеолярних перегородках, що свідчить про ключову роль альвеолярних макрофагів в утилізації гіалінових мембран. Наявність середніх і малих CD68 позитивних клітин в ділянках з гіаліновими мембранами можна розглядати як "наступну хвилю" макрофагальної реакції на збережені гіалінові мембрани. Ці клітини розміщуються переважно

дифузно в міжальвеолярних перегородках і розмір їх менший, в результаті чого, можна стверджувати про зменшення макрофагального пула і переміщення із кров'яного русла моноцитів, які попадаючи в міжальвеолярні перегородки перетворюються на тканинні макрофаги.

Висновки

1. Закономірностями взаємовідносин імуннокомпетентних клітин в структурах легень недоношених новонароджених дітей трьох груп є дисбаланс імунорегулюючого індексу (співвідношення CD4/CD8), депресія компонентів місцевої імунної системи органів дихання.

2. Особливостями експресії, гістотопографії, розподілу імуннокомпетентних клітин в досліджуваних групах є: пригнічення загальної популяції Т-лімфоцитів (CD3), зниження хелперної функції (CD4), змішана супресорна реакція (CD8), зменшення кількості субпопуляції В-лімфоцитів (CD20) та пригнічення макрофагальної функції (CD68) в дітей I групи (артеріальна гіпертензія та дисліпідемія у матері); в легенях дітей II групи цукровий діабет 2-го типу та дисліпідемія у матері) пригнічення хелперно-супресорної функції (CD4, CD8), підвищення макрофагальної реакції (CD68); зменшення абсолютної кількості субпопуляції цитотоксичних і супресорних Т-лімфоцитів, зниження кількості В-лімфоцитів (CD20) та пригнічення макрофагальної функції (CD68) у дітей III групи (ожиріння та дисліпідемія у матері).

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження будуть присвячені вивченню морфометричних параметрів імуннокомпетентних клітин та їх взаємовідносини з епітеліальними, мезенхімальними структурами бронхіального та респіраторного відділах легень.

Літературні джерела

Антипкін Ю. Г. Динаміка окремих субпопуляцій лімфоцитів в різні фази патологічного процесу у дітей з гострою пневмонією та рецидивуючим бронхітом / Ю. Г. Антипкін, О. Л. Ковальчук. - К. : Експерт, 2001. - С. 45-50.

Дубровин М. М. Развитие иммунной системы плода / М. М. Дубровин, Е. С. Дубровина, А. Г. Румянцев // Педиатрия. - 2001. - № 1. - С. 67-71.

Імунологічні особливості в момент народження у маловагових дітей / І. С. Сміян, І. О. Багірян, В. В. Стеценко, Г. А. Павлишин // Матеріали спільної українсько-польської науково-практичної конференції неонатологів. - Київ, 2000. - С. 96-98.

Криворучко Е. Г. Морфофункциональные особенности лимфоцитов легких человека в пре-

натальном периоде онтогенеза / Е. Г. Криворучко // Вісник морфології. - 2000. - № 2. - С. 231-233.

Мороз Т. Ю. Особенности иммунной системы недоношенных новорожденных в период ранней адаптации / Т. Ю. Мороз, Л. П. Сизякина // Аллергология и иммунология. - 2003. - Т. 4, № 3. - С. 118-121.

Морфофункциональные особенности структур местной иммунной системы / В. К. Сырцов, Е. Г. Криворучко, С. П. Ковалев [и др.] // Буковинський медичний вісник. - 2001. - Т. 5, № 2. - С. 161-163.

Особенности иммунного ответа слизистых оболочек дыхательных путей у недоношенных детей с пневмониями / М. В. Кушнарєва, Г. М. Дементьева, Т. В. Виноградова [и др.] // Педиатрия. - 2002. - № 1. - С. 13-18.

Рудяк А.М. Патоморфология иммунокомпетентных клеток местной иммунной системы органов дыхания недоношенных новорожденных детей на фоне некоторых компонентов метаболического синдрома матери.

Резюме. В проведенном иммуногистохимическом исследовании местной иммунной системы легких (90 недоношенных новорожденных детей, 29-33 недели гестации), разделённых на 3 группы относительно к компонентам метаболического синдрома матери, обнаружены особенности и закономерности распределения, количественные показатели иммунокомпетентных клеток в бронхиальном и респираторном отделах. Установлено, что у детей II группы (артериальная гипертензия и дислипидемии у матери) подавляется общая популяция Т-лимфоцитов (CD3), снижается хелперная функция (CD4), отмечаются смешанная супрессорная реакция (CD8), уменьшается количество субпопуляций В-лимфоцитов (CD20), подавляется макрофагальная функция (CD68). В легких детей II группы (сахарный диабет 2-го типа и дислипидемия матери) подавляется хелперно-супрессорная функция (CD4, CD8), повышается макрофагальная реакция (CD68). Уменьшение абсолютного количества субпопуляций цитотоксических и супрессорных Т-лимфоцитов, снижение количества В-лимфоцитов (CD20) и подавление макрофагальной функции (CD68) наблюдается у детей III группы (ожирение и дислипидемии у матери). Сравнительный анализ иммунного статуса легких у детей трех групп свидетельствует о резком дисбалансе иммунорегуляторного индекса, депрессии компонентов местной иммунной системы легких, а также о негативном влиянии патологии матери на гистогенетические процессы формирования органов дыхания.

Ключевые слова: иммунокомпетентные клетки, недоношенные, новорожденные, метаболический синдром, легкие.