

## АНАЛИЗ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МАРКЕРА CD4, CD8 ПРИ ТУБЕРКУЛОМЕ ЛЕГКИХ

Питиримова А.С, Гималдинова Н.Е

*Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова,  
кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины,  
г. Чебоксары*

**Ключевые слова:** туберкулома, индекс клеточного иммунитета, CD4 позитивные Т лимфоциты, CD8 позитивные Т лимфоциты, плазматические клетки.

**Резюме:** в статье проведен анализ первичных гистологических критериев дифференциальной диагностики туберкуломы легких, детализированы морфологические особенности специфического воспаления непосредственно в очаге поражения и в интактной легочной ткани с выявлением векторного потенцирующего эффекта макрофагальной активности на дисбаланс иммунного ответа и формирование вторичной иммунологической недостаточности.

**Resume:** the article analyzes the primary histological criteria for the differential diagnosis of pulmonary tuberculosis, details the morphological features of specific inflammation directly in the lesion and in intact lung tissue with the identification of the vector potentiating effect of macrophage activity on the imbalance of the immune response and the formation of secondary immunological insufficiency.

**Актуальность.** Т-клетки играют важную роль в контроле клеточного иммунитета против патогенов и, следовательно, влияют на исход заболеваний человека. Хотя большинство Т-лимфоцитов коэкспрессируют либо CD4, либо CD8. Вместе с активацией CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, более высокие частоты как αβ, так и γδ Т-клеток от больных туберкулезом также экспрессируют маркер хронической активации HLA-DR [1].

Основным защитным иммунным ответом против внутриклеточных бактерий, таких как *Mycobacterium tuberculosis*, является клеточный иммунитет [2]. CD4<sup>+</sup> Т-клетки являются доминирующими защитными Т-клетками, но есть доказательства того, что CD8<sup>+</sup> Т-клетки также играют роль в ответе против микобактерий. Субпопуляция Т-лимфоцитов, особенно CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, играют решающую роль в иммунитете против инфекций микобактериями [3]. Экспрессия корцепторов CD4 и CD8 на зрелых Т-клетках обычно считается взаимоисключающей и отражает связанные с подтипами специфические функции и различия в комплексном ограничении гистосовместимости для распознавания антигенов. При проведении иммуногистохимического исследования с маркерами CD4 и CD8 лимфоцитов в биоптатах легких пациентов была выявлена популяция макрофагов, демонстрирующих экспрессию CD4, CD8, локализованных в перинекротической зоне, в участках эмфизематозного расширения альвеол. Локализованы они были в основном в просвете альвеол либо фиксированы в альвеолярных нишах [4].

При инфицировании организма *M. tuberculosis* первыми компонентами иммунной системы, которые взаимодействуют с ними, являются альвеолярные макрофаги [5]. Эти клетки секретируют большое количество цитокинов, в частности IL16, который широко известен как хемоаттрактант для CD4<sup>+</sup> Т-клеток [6]. Взаимодействие между лимфоцитами и макрофагами имеет решающее значение для сдержива-

ния инфекции. CD8 + лимфоциты, с другой стороны, распознают инфицированные клетки либо путем взаимодействия между основными молекулами комплекса гистосовместимости I класса, несущими микобактериальные антигены.

Патогенез микобактериальной инфекции широко изучен, определяя фундаментальную роль иммунокомпетентности хозяина в прогрессировании заболевания [7,10]. Клеточный иммунитет особенно важен для защиты от инфекции *M.tuberculosis*, и многие типы Т-лимфоцитов, включая Т-лимфоциты рецептора  $\alpha\beta$  (CD4 + или CD8 +), цитотоксические Т-лимфоциты и Т-лимфоциты рецептора  $\gamma\delta$  играют свою роль в этом отношении. CD4 + и CD8 + Т-клетки играют важную роль в защите организма от туберкулеза [8]. Определение антигенов, распознаваемых этими Т-клетками, имеет решающее значение для лучшего понимания иммунобиологии туберкуломы, а также для разработки вакцин и диагностических средств. CD4 + Т-клетки играют важную роль в этом ответе и поддерживаются другими подмножествами Т-клеток, такими как CD8 + Т-клетки,  $\gamma\delta$  Т-клетки [9]. Профиль популяции Т-лимфоцитов, в частности соотношение CD4 + / CD8 +, рассматривается как индикатор личной иммунной компетентности к инфекции. Отношение CD4 + / CD8 + используется в качестве условного показателя для оценки клеточного иммунитета пациентов.

**Цель:** изучить иммуногистохимические особенности CD4 + и CD8 + Т-лимфоцитов в легочной ткани при туберкуломе.

**Задачи:** 1. Количественное определение иммуногистохимического маркера CD4 +; 2. Количественное определение иммуногистохимического маркера CD8 +; 3. Определить изменение соотношения иммунорегуляторного индекса CD4 + / CD8 + у пациентов с туберкуломой легких.

**Материалы и методы.** Метод исследования ИГХ позволяет идентифицировать антигенные детерминанты клеток и тканей на основе специфического взаимодействия антигена и антитела. Этот метод основан на сочетании строго специфического моно-поликлонального антитела с искомыми антигенными детерминантами. Патологический процесс изучался в 7 полях зрения (зона казеозного некроза, зона грануляционной ткани, зона фиброза, зона прилегающего бронха, зона ателектаза, зона эмфиземы и интактная легочная ткань). Определяли абсолютное количество клеток с цитоплазматической экспрессией (CD4, CD8), мембранной экспрессией (CD4, CD8). Исследование проводили на аутопсийном материале в БУ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» ЧР г. Чебоксары, от больных данной формы вторичного туберкулеза – туберкуломы с 12-ти часового момента наступления биологической смерти. Забор аутопсийного материала производился с учетом медицинской документации (история болезни, амбулаторная карта, карта диспансерных наблюдений), содержащий клинико-лабораторные, биохимические, бактериологические, рентгенологические данные.

Изображения срезов тканей были получены с использованием цифровой камеры OLYMPUS C5050Z под 40-кратным увеличением объектива светового микроскопа OLYMPUS CX41. Для количественного анализа использовали изображения в формате TIFF. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica для Microsoft Windows, version 10.0. (StatSoft Inc.,

США). Перед началом работы изображения были откалиброваны для получения данных в заданных калибровочных единицах измерений – миллиметрах. Для анализа изображений использовали цветовой режим RGB. Определяли абсолютное число клеток с цитоплазматической экспрессией (CD4, CD8), мембранной экспрессией (CD4, CD8).

ИРИ 1,5–2,1 соответствует нормальному иммунному ответу; более 2,2 – избыточному иммунному ответу; менее 1,0 – иммунодефициту. При тяжелом течении воспалительного процесса ИРИ может быть меньше 1. Принципиальное значение отношение имеет в оценке иммунной системы у больных туберкулезом. При данном заболевании туберкулез избирательно поражает и разрушает CD4+ лимфоциты, в результате чего ИРИ понижается до значений, значительно меньше 1. Чаще всего, при любой воспалительной патологии, особенно протекающей в тяжелой форме, ИРИ может быть, как равным, так и менее 1. Повышение ИРИ (до 3) нередко отмечается в острой фазе различных воспалительных заболеваний, за счет повышения уровня CD4+ и снижения CD8+. В середине воспалительного заболевания отмечается медленное снижение CD4+ и повышение CD8+. При стихании воспалительного процесса эти показатели и их соотношения нормализуются. Повышение ИРИ характерно практически для всех аутоиммунных заболеваний, увеличение ИРИ за счет снижения уровня CD8+ выявляется обычно в разгаре обострения при большой активности процесса, снижение ИРИ из-за роста уровня CD8+ характерно для ряда злокачественных опухолей.

**Результаты и их обсуждение.** Для комплексного анализа патоморфологических изменений регистрация гистологических характеристик клеточных компонентов легочной паренхимы как в интактной ткани, так и в условиях ее деструктивной трансформации происходила, в зависимости от удаленности от деструкции. Для более точной оценки иммуноморфологических характеристик фрагментов легочной ткани было использовано зонирование патологически измененных тканей по отношению к очагу деструкции. Все образцы исследуемых тканей характеризовались наличием пиогенного слоя (казеозный некроз), слой специфической грануляционной ткани и слой грубоволокнистой соединительной ткани, перинекротическая зона и окружающие интактные легочные ткани. Воспалительная инфильтрация в основном представлена диффузной лимфоцитарной инфильтрацией с образованием округлых псевдоузелков, мноморфных по своим характеристикам.

При оценке локализации экспрессии маркеров CD4+ и CD8+ была установлена равномерная диффузная инфильтрация легочной паренхимы лимфоидных клеток с расположением в межальвеолярных перегородках на границе с просветом альвеол. В-лимфоциты в основном ограничены в лимфоидных фолликулах. CD4-положительные Т-лимфоциты наблюдались внутри и вокруг лимфоидных фолликулов, а также в утолщенной фиброзной стенке альвеол с фиброзом. В отличие, CD8-положительные Т-лимфоциты были распределены диффузно. Корреляция между соотношениями CD4+/CD8+ в легочной ткани была слабой. Однако даже с очень низким соотношением CD4 / CD8 в тканях туберкуломы легких обнаруживалось много лимфоцитов CD4+, что свидетельствует о том, что CD8+ лимфоциты, диффузно распределенные в тонкой альвеолярной стенке, чем CD4+ лимфоциты.

Экспрессия маркера CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов визуализировалась в области грануляционной ткани в количестве  $78,19 \pm 4,43$  положительно окрашенных клеток по периферии казеозного некроза, что указывает об антигензависимом механизме активации Т-хелперных клеток посредством взаимодействия с антигенпрезентирующими клетками. Корреляционный анализ выявил сильное превалирование CD8<sup>+</sup> клеток, что свидетельствует о выраженном цитотоксическом действии на макрофаги специфических грануляций, что в конечном итоге приводит к активизации некроза. При сравнении количественных соотношений CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток определен показатель иммунорегуляторного индекса (ИРИ) для исследуемых зон. Так в грануляционной ткани ИРИ составил  $0,4 \pm 0,5$ , в фиброзном слое  $0,33 \pm 0,5$ , в прилегающем бронхе  $0,93 \pm 0,5$ . Происходит развитие иммунодефицитного состояния, и преобладание Т-киллеров над Т-хелперами более чем в 3 раз указывает на неадекватность иммунного ответа.

Установлено, что CD8<sup>+</sup> цитотоксические лимфоциты преобладали над Т-хелперами в 2 раза. При активации выделения CD4<sup>+</sup> клеток в перибронхиальной зоне преобладает над CD8<sup>+</sup> окрашенными лимфоцитами –  $77,81 \pm 3,54$  и  $84,07 \pm 1,5$  соответственно. Иммунорегуляторный индекс составил  $0,93 \pm 0,5$ . Этот показатель указывает на активацию провоспалительных Т-хелперов.

При оценке экспрессии CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> маркеров в активных гранулемах определялось незначительное количество положительно окрашенных Т-хелперов непосредственно в зоне казеозного некроза. В то же время основная часть лимфоцитов локализовались в виде плотного кольца, образующих псевдолимфоидные узелки на границе с окружающими тканями. Преобладающей популяцией лимфоцитов независимо от активности гранулемы, были CD8<sup>+</sup> клетки. В целом же они локализовались по периферии от очагов гранулематозного воспаления.

Показатели иммунорегуляторного индекса указывали на преобладание цитотоксических лимфоцитов, в активных гранулемах наблюдалось статистически значимое увеличение показателя до  $0,86 \pm 0,05$  в связи с увеличением количества CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и уменьшения количества CD8<sup>+</sup> клеток. Установлены морфометрические характеристики капсулы туберкуломы. Полученные морфометрические данные позволяют изучить активность туберкуломы. Количественное превалирование грануляционной ткани над фиброзным слоем характеризует активную форму гранулемы.

В зонах дис- и ателектаза особенности лимфоцитов указывают на преобладание цитотоксических лимфоцитов, действие которых направлено в том числе и на гиперактивированные макрофаги. Иммунорегуляторный индекс  $CD4/CD8 = 0,75 \pm 0,5$ .

По мере удаления от очагов деструкции легочной ткани количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов динамически уменьшается, определяется в виде единичных положительных клеток с мембранной экспрессией локализованных в подслизистом слое. Популяция В-лимфоцитов и плазматических клеток исчезает. Концентрация субпопуляций лимфоцитов была определена количественно. Анализ показал снижение отношения CD4 + / CD8 +. В частности, у групп исследования по сравнению с интактной группой было отмечено снижение на 49% среднего количества CD4 + Т-клеток, снижение отношения CD4 + / CD8 + на 45% и снижение CD8 + на 17%.

**Выводы:** иммуногистохимические исследования легких больных выявили нарушения всех звеньев клеточного иммунитета, их выраженность зависела от степени специфического воспаления и наличия или отсутствия дисплазии соединительной ткани. Туберкулез легких при неэффективном лечении сопровождается снижением количества Т-лимфоцитов, хелперов и антиген-активированных лимфоцитов, снижением соотношения CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup>, а также увеличением супрессоров в зависимости от степени воспаления, более значительные изменения выявлены с дисплазией соединительной ткани.

Определение CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> макрофагов с цитотоксической активностью во фрагментах легких пациентов является диагностическим критерием прогрессирования туберкулеза и повышенного риска распространения. Сдвиг иммунорегуляторного индекса (ИРИ) CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> за счет цитотоксических Т-лимфоцитов более чем в 3 раза сигнализирует о продолжительности воспаления и его переходе в латентную фазу. Иммунорегуляторный индекс с соотношением CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> не менее 0,7 является надежным прогностическим и диагностическим критерием реактивации воспалительного процесса. С увеличением степени воспаления наблюдается тенденция к снижению активности хелперов CD4<sup>+</sup> и увеличению активности супрессоров CD8<sup>+</sup>, особенно это проявилось в снижении коэффициента CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup>. У пациентов наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов, хелперов. Наши результаты убедительно показали, что соотношение CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> значительно снижается у пациентов с туберкулезом.

Детализированы иммунофенотипические характеристики лимфоидной популяции локальной системы иммунитета легких, детализированы особенности взаимодействий лимфоцитов-макрофагов и разработаны критерии активации специфического туберкулезного воспаления.

### Литература

1. Абдуллаев, Р. Ю. Выраженность системного воспалительного ответа у больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ-инфекцией / Р. Ю. Абдуллаев, О. Г. Комиссарова, Л. Н. Герасимов // Туберкулез и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 6. – С. 36–40.
2. Белки множественной лекарственной устойчивости соматических клеток легкого и особенности их экспрессии при фиброзно-кавернозном туберкулёзе / М. В. Ерохина [и др.] // Туберкулез и болезни лёгких. – 2016. – № 9. – С. 53–58.
3. Варианты комплексной терапии различных категорий больных туберкулёзом лёгких / В. А. Краснов [и др.] // Проблемы туберкулёза. – 2013. – № 2. – С. 27–31.
4. Глобальные отчеты Всемирной организации здравоохранения по туберкулёзу: формирование и интерпретация / И. А. Васильева, Е. М. Белиловский, С. Е. Борисов, С. А. Стерликов // Туберкулез и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 5. – С. 7–16.
5. Диагностика активности туберкулёзной инфекции у больных конитуберкулёзом и пневмокозиозом лёгких / Е. Г. Гуренко [и др.] // Вестник гигиены и эпидемиологии. – 2016. – Т.10, №1 Прилож. – С.37–41.
6. Ерохин В. В. Молекулярные, субклеточные и клеточные механизмы патогенеза туберкулезного воспаления легких / В. В. Ерохин // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2009. – Т.5, № 2. – С. 267–269.
7. Зими́на, В. Н. Совершенство диагностики и эффективность лечения туберкулёза у больных ВИЧ-инфекцией при различной степени иммуносупрессии : автореф. дис... д-ра мед. наук / В. Н. Зими́на. – Москва, 2012. – 44 с

8. Иммуномодуляторы в комплексном лечении туберкулёза органов дыхания с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* / Н. В. Богуш, Е.Н. Данькевич, И. Г. Козлов, В. А. Стаханов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2015. – № 6. – С. 31–32.

9. Исследование активности литического микобактериофага D29 на модели перевиваемой линии макрофагов, инфицированных микобактериями туберкулёза / М. Б. Лапенкова [и др.] // Туберкулёз в XXI веке : новые задачи и современные решения : тез. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием ( 1-2 июня 2016 г.). – Москва, 2016. – С. 66–68.

10. Особенности макрофагальной формулы бронхоальвеолярного смыва у больных с деструктивным туберкулёзом лёгких / В. В. Ерохин [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2003. – №12. – С. 17–21.