

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ПРИ ВИЧ/ТБ КО-ИНФЕКЦИИ С УЧЕТОМ ЭКСПРЕССИИ БИОМАРКЕРОВ CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ В ЛЕГКИХБЫХАЛОВ Л.С.^{1,2}**CHARACTERIZATION OF INTERCELLULAR RELATIONSHIPS IN HIV/TB CO-INFECTION TAKING INTO ACCOUNT THE EXPRESSION OF BIOMARKERS CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ IN THE LUNGS**

BYKHALOV L.S.

¹Кафедра патологической анатомии (зав. кафедрой – профессор А.В. Смирнов) ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ²лаборатория морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза (зав. лабораторией – профессор А.В. Смирнов) ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр».

Исследование морфологических изменений непосредственно в очагах воспалительного ответа при ВИЧ/туберкулёз ко-инфекции позволяют оценить функциональную активность и межклеточные взаимоотношения иммунокомпетентных клеток, что имеет научную, патоморфологическую и клиническую ценность. Цель исследования - оценить степень экспрессии биомаркеров CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ в очагах гранулематозного воспаления в тканях лёгких больных, умерших от туберкулёза на фоне ВИЧ-инфекции. Исследован аутопсийный материал (n=30) умерших пациентов с ВИЧ/ТБ ко-инфекцией, стадия 4Б-5 - группа 1. В группу сравнения - группа 2 - вошли аутопсийные случаи (n=30) с моно-инфекцией туберкулёз. Иммуногистохимическое исследование с целью определения экспрессии биомаркеров CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ проводили с использованием кроличьих моноклональных антител фирмы Epitomics - an Abcam. Выраженность экспрессии биомаркеров оценивали, с применением программы Image Analysis с последующим морфометрическим анализом. Автором выявлено снижение количества CD3⁺ морфологически зрелых Т-лимфоцитов и возрастание числа CD7⁺ незрелых лимфоцитов преимущественно, в очагах продуктивного воспаления, что свидетельствует о глубоком угнетении иммунного ответа при ВИЧ-инфекции на терминальных стадиях иммунодефицита, с развитием туберкулеза. Обнаружено уменьшение количества CD10⁺ лимфоцитов в

фокусах продуктивного воспаления в легких, свидетельствующее о нарушении процессов дифференцировки В-лимфоцитов, способствующее глубокому угнетению гуморального звена иммунитета с гипорегическим ответом на микобактерии туберкулёза.

Ключевые слова: ВИЧ, туберкулез, иммуногистохимия, CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺

The study of morphological changes directly in areas of inflammatory response in HIV/TB co-infection allow to estimate the functional activity and intercellular relationships of immune cells. The purpose of the study was to assess the degree of expression of CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ biomarkers in foci of granulomatous inflammation in lung tissues of patients who died of HIV / TB co-infection. Autopsy material (n=30) of patients with HIV/TB co-infection was studied, stage 4B-5 - group 1. In the comparison group - a group 2 - includes autopsy cases (n=30) with mono-infection with TB. Immunohistochemical investigation to determine the expression of biomarkers of CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ was performed with using rabbit monoclonal antibodies (Epitomics, Abcam). The severity of biomarker expression was assessed with the use of Image Analysis with subsequent morphometric analysis. The author showed a reduction in the number of morphologically mature CD3⁺ T-lymphocytes and an increase in the number of immature CD7⁺ T-lymphocytes mainly in foci of productive inflammation, indicating a profound inhibition of the immune response in HIV infection in the terminal stages of immunodeficiency, with the development of tuberculosis. The decrease in the number of CD10⁺ cells in foci of productive inflammation in lungs, indicating disruption of the processes of B-lymphocyte differentiation, contributing to a deep depression of humoral immunity with weak immune response to Mycobacterium tuberculosis.

Key words: *HIV, tuberculosis, immunohistochemistry, CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺*

Введение. Рост ВИЧ - ассоциированного туберкулёза (ВИЧ/ТБ) регистрируется во многих странах, в т.ч. в РФ. Среди причин смерти у ВИЧ-инфицированных туберкулёз, по различным данным, составляет 43-89%, что выводит его на лидирующую позицию [1]. Полиморфизм клинических проявлений туберкулёза на стадии СПИДА, затрудняет его посмертную морфологическую верификацию, что требует дальнейшего изучения патогенеза двойного заболевания ВИЧ/ТБ [2]. Иммунный ответ макроорганизма на внедрение в него микобактерий туберкулеза включает клеточное и гуморальное звенья с взаимодействием Т-лимфоцитов, макрофагов, иммуноглобулинов. Иммуноглобулины G участвуют в образовании иммунных комплексов, в активации системы комплемента, оседают на микробных клетках, чем усиливают фагоцитоз [3]. Повреждение CD4⁺ вследствие тропности ВИЧ к лимфоцитам с последующим цитопатическим эффектом со снижением иммунокомпетентных клеток предрасполагает к изменению клеточных и тканевых реакций [4]. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению патоморфогенеза, иммуноморфологии ко-инфекции ВИЧ/ТБ клеточные изменения в очагах гранулематозного воспаления остаются малоизученными, большинство данных носит противоречивый характер, а функциональная активность оценивалась иммуноферментными методами в сыворотке крови [3].

Изучение экспрессии CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ в тканях легких при ВИЧ/ТБ ко-инфекции представляет особый интерес, т.к. может охарактеризовать взаимоотношения между клеточными и гуморальными звеньями иммунитета непосредственно в очагах воспалительного ответа.

Цель исследования - оценить степень экспрессии CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ в очагах гранулематозного воспаления в тканях лёгких больных, умерших от туберкулёза на фоне ВИЧ-инфекции.

Материал и методы исследования. Исследован аутопсийный материал (n=30) умерших пациентов с ТБ легких, на стадии ВИЧ 4Б-5 - группа 1. В группу сравнения - группа 2 - вошли аутопсийные случаи (n=30) с моно-инфекцией, с остро прогрессирующими формами ТБ легких. Образцы легких извлекались из трупов по общепринятым методикам в ранние сроки после смерти больного, фиксировались в 10 % растворе забуференного формалина в течение суток при комнатной температуре, промывались и подвергались стандартной гистологической проводке. Из парафиновых блоков были изготовлены гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с целью определения экспрессии биомаркеров CD3⁺, CD7⁺, CD10⁺ проводили с использованием кроличьих моноклональных антител фирмы Epitomics - an Abcam. Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с высокотемпературной демаскировкой антигенов, исследование микропрепаратов проводили на микроскопе «Micros» (Austria), производили микрофотосъемку цифровой фотокамерой «Olympus» (Japan), выраженность экспрессии биомаркеров оценивали, с применением программы Image Analysis с последующим морфометрическим анализом. Статистическую обработку материалов осуществляли с помощью прикладной программы Statistica 6.0, разработанной для медико-биологических исследований, за величину уровня статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В 1 группе исследования (ВИЧ/ТБ ко-инфекция), при окраске гематоксилином и эозином, в микропрепаратах легких наблюдался полиморфизм изменений. В паренхиме лёгких отмечались участки эмфиземы, сменяющиеся ателектазами, как правило, наблюдалось утолщение межальвеолярных перегородок. В альвеолах обнаруживались слущенные эпителиальные клетки, макрофаги, большая часть которых была со светлой цитоплазмой, лимфоциты, количество которых варьировало, различное количество серозного, геморрагического и смешанного экссудата. Кроме того, в просветах альвеол наблюдались казеозные массы, а также тканевый детрит. Выявлялись зоны формирующегося продуктивного воспаления, представленные очагами лимфогистиоцитарной инфильтрации, локализованными чаще в периваскулярных отделах и участки формирующихся пневмониогенных каверн с различными по выраженности инфильтративными явлениями от умеренных до выраженных, а также фокусы гранулематозного воспаления, в которых выявлялись выраженные по площади зоны казеозного некроза, эпителиоидные клетки, незначительное количество лимфоцитов, практически отсутствовали гигантские клетки Пирогова – Лангханса.

Во 2-ой группе (моно-инфекции ТБ), изменения характеризовались наличием в легких эпителиоидно-клеточных гранул туберкулоидного типа с гигантскими многоядерными клетками Пирогова-Лангханса, значительным количеством малых лимфоцитов и различных по величине фокусов казеозного некроза. Отмечались очаги слабовыраженного фиброза и продуктивного воспаления в субплевральных отделах с гистиоцитарной инфильтрацией.

При ИГХ исследовании легких с использова-

нием моноклональных антител к CD3⁺ в 1 группе (ВИЧ/ТБ) исследования вне зон воспалительного инфильтрата отмечалась слабая и умеренная (1-2 балла) цитоплазматическая экспрессия иммунореактивного материала (ИРМ) в лимфоцитах. В зонах специфического воспаления отмечена также слабовыраженная (1 балл) экспрессия ИРМ в лимфоцитах. При использовании моноклональных антител к CD7⁺ в 1 группе исследования (ВИЧ/ТБ) вне зон воспалительного инфильтрата отмечалась умеренная и выраженная (2-3 балла) цитоплазматическая экспрессия иммунореактивного материала, а в фокусах специфического воспаления отмечалась выраженная и резко выраженная экспрессия ИРМ (3-4 балла) как в лимфоцитах так и в некротических массах. При ИГХ реакции с биомаркером к CD10⁺ вне зон воспаления наблюдалась слабовыраженная ИРМ (1 балл), а в воспалительном инфильтрате она практически отсутствовала (0-1 балл).

При ИГХ исследовании легких во 2 группе (моно-инфекция ТБ) с использованием моноклональных антител к CD3⁺ в большинстве случаев вне зон воспаления была обнаружена резко выраженная степень (4 балла) цитоплазматической экспрессии ИРМ в лимфоцитах, а в зонах гранулематозного воспаления реакция носила резко выраженный характер и в казеозном детрите. При ИГХ исследовании с использованием моноклональных антител к CD7⁺ отмечалась слабая и умеренная (1-2 балла) экспрессия ИРМ как вне зон специфического воспаления, так и в казеозно-пневмонических очагах. При изучении ИГХ с использованием моноклональных антител к CD10⁺ вне зон воспаления отмечалась слабая экспрессия ИРМ, а в зонах воспаления наблюдалась экспрессия ИРМ от умеренной до выраженной, которая сохранялась в центрах некрозов.

Для объективизации оценки иммуноморфологических изменений в различных областях легких проведен программный морфометрический анализ. При ИГХ исследовании легких с использованием моноклональных антител к CD3⁺ отмечены различия в значениях морфометрических параметров: вне зон воспаления в 1 группе относительная площадь иммунопозитивных объектов (ИПО) была в 23 раза меньше ($p < 0,001$) по сравнению с группой сравнения (группа 2), а в фокусе воспаления этот параметр был меньше в 17 раз ($p < 0,001$) по сравнению с моно-инфекцией ТБ.

При ИГХ исследовании легких с использованием моноклональных антител к CD7⁺ выявлено изменение морфометрических параметров: увеличение относительной площади ИПО в зонах воспаления в 20,7 раз ($p < 0,001$) в группе 1 при ВИЧ/ТБ ко-инфекции, вне зон воспаления относительная площадь ИПО увеличилась на 2,6% (достоверных

различий не выявлено) по сравнению с группой 2.

При ИГХ исследовании легких с использованием моноклональных антител к CD10⁺ выявлено изменение морфометрических параметров: уменьшение относительной площади ИПО в зонах воспаления в 12,5 раз ($p < 0,001$) в группе 1 при ВИЧ/ТБ ко-инфекции, вне зон воспаления относительная площадь ИПО увеличилась на 2,8% (достоверных различий не выявлено) по сравнению с группой 2 - иммуноморфологического.

Таким образом, нами выявлено уменьшение уровня экспрессии биомаркера CD3⁺ в малых лимфоцитах в различных зонах легких при ВИЧ/ТБ ко-инфекции с минимальной экспрессией в фокусах воспаления, а также снижение в фокусах гранулематозного воспаления количества лимфоцитов с иммунофенотипом CD3⁺ по сравнению с группой моно-инфекции ТБ. Отмечено возрастание уровня экспрессии биомаркера CD7⁺ как в казеозно-некротических очагах, так и вне зон воспаления при ВИЧ/ТБ ко-инфекции по сравнению с группой моно-инфекции ТБ. Уменьшение экспрессии белка CD3⁺ при ВИЧ/ТБ ко-инфекции свидетельствует о снижении количества зрелых Т-лимфоцитов с антиген распознающим рецептором в зонах воспалительного инфильтрата. Увеличение содержания лимфоцитов с иммунофенотипом CD7⁺, которые являются клетками предшественниками Т-лимфоцитов и выполняют регуляторную роль в активации Т-хелперов и Т-супрессоров, возможно, свидетельствует об дисрегуляции вторичного иммунного ответа, обуславливающего супрессию противотуберкулезного иммунитета, а также об изменении регуляции механизмов клеточной гибели при сочетанной инфекции, что приводит к большей инициации апоптоза особенно в фокусах продуктивного воспаления.

Отмеченное снижение уровня экспрессии CD10⁺ в зонах воспаления при ВИЧ/ТБ ко-инфекции по сравнению с моно-инфекцией ТБ свидетельствует о нарушениях гуморального звена иммунитета при сочетанной патологии, так как экспрессия рецептора CD10⁺ на поверхности незрелых В-лимфоцитов является этапом их дифференцировки, которые в результате бластной трансформации превращаются в плазматические клетки, синтезирующие различные типы иммуноглобулинов и поддерживающие Т-хелперную, макрофагальную активность в инициации и согласовании адаптивного иммунного ответа [5].

Заключение. Таким образом, выявленное в нашем иммуноморфологическом исследовании снижение количества CD3⁺лимфоцитов и возрастанием числа CD7⁺ лимфоцитов в паренхиме легких и в фокусах продуктивного воспаления при ко-инфекции ВИЧ/ТБ свидетельствует о глубоком угнетении иммунного ответа при ВИЧ-инфекции

на терминальных стадиях приобретенного иммунодефицита, с развитием туберкулеза, и характеризуется снижением количества морфологически зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) на фоне возрастания числа незрелых CD7⁺ лимфоцитов, преимущественно, в очагах продуктивного воспаления. Кроме того, обнаруженное при ко-инфекции ВИЧ/ТБ уменьшение количества CD10⁺ лимфоцитов в фокусах продуктивного воспаления в легких свидетельствует о нарушении процессов дифференцировки В-лимфоцитов, что способствует глубокому угнетению гуморального звена иммунитета и гипоэргическому ответу на микобактерии туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Быхалов Л.С., Седова Н.Н., Деларю В.В. [и др.] Причины смерти и патоморфологическая характеристика органов при туберкулезе, ассоциированном с ВИЧ-инфекцией // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013 – № 3. – С. 64-68.
2. Зюзя Ю.Р., Пархоменко Ю.Г., Зимина В.Н. [и др.] Сочетанные ВИЧ-ассоциированные инфекции легких - особенности морфологической ве-

рификации и дифференциальной диагностики // Клиническая и экспериментальная морфология - 2012. – № 1. - С. 21-25.

3. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Воронкова О.В. [и др.] Роль Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции // Туберкулез и болезни легких. – 2011. № 3. С. 3–7.

4. Быхалов Л.С., Смирнов А.В., Хлопонин П.А. [и др.] Морфометрическая характеристика специфического продуктивного воспаления в легких у лиц, умерших от ко-инфекции ВИЧ/туберкулез, с учетом прижизненных девиаций // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – №4. – С.98-101.

5. Gujer C, Sundling C, Seder RA, Karlsson Hedestam GB, Loré K. Human and rhesus plasmacytoid dendritic cell and B-cell responses to Toll-like receptor stimulation // Immunology. 2011 Nov; 134(3):257-69.

Авторская справка:

Быхалов Леонид Сергеевич – докторант кафедры патологической анатомии Волгоградского государственного медицинского университета, к.м.н. – Волгоград, пл. Павших борцов, 1, 400131, e-mail: leonby-vgd@yandex.ru, +7 (8442) 37-58-65