**УДК: 616. 12 - 008. 46 - 036. 12:[616.24+616.428]- 092.18**

**Иммуногистохимические изменения в ткани легкого и перибронхиальных лимфатических узлов при хронической сердечной недостаточности**

Е.А. Павлова

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

e-mail: slegg@mail.ru

**Введение**

Сердечно - сосудистые заболевания (ССЗ) остаются лидирующей причиной смертности во всем мире и приобрели статус важнейшей медико-социальной проблемы. Исходом многих ССЗ является хроническая сердечная недостаточность (ХСН) - клинический синдром со сложным патогенезом, характеризующийся дисбалансом между гемодинамической потребностью организма и возможностями сердца [1,3]. Нарушение микроциркуляции в малом круге приводит к повреждению тканей и, по-видимому, нарушению клеточного и гуморального, общего и местного иммунитета [2,4,5,14]. В воздухоносных путях иммунная система легких представлена бронхо-ассоциированной лимфоидной тканью (БАЛТ), располагающейся в толще покровного эпителия, возле желез и в строме. БАЛТ играет важную роль в местных защитных реакциях легких, обеспечивая сохранение функции слизистой оболочки, определяя тяжесть и продолжительность заболевания [10,11]. Также представляет интерес изучение изменений в перибронхиальных лимфатических узлах, где происходит размножение лимфоцитов, поступающих в ткани [6,8,9,12], и поэтому актуальным является изучение состава структурных компонентов Т- и В-зон и данных о содержании функционально активных клеток в ткани легких и перибронхиальных лимфатических узлов при ХСН [2,4,6,9,10].

**Целью исследования** явилось изучение иммуногистохимических изменений в ткани легких и перибронхиальных лимфоузлов при ХСН в сравнении с ОСН для получения более полного представления об участии клеток иммунной системы в местных иммунных реакциях.

**Материалы и методы.**

Исследованы легкие и перибронхиальные лимфатические узлы в 20 аутопсийных наблюдениях (судебно-медицинский материал) у лиц сопоставимых по полу и возрасту. Причинами смерти были: острая сердечная недостаточность (ОСН) - контроль и ХСН. У всех были исключены воспалительные заболевания на основании макро- и микроскопического исследования. Материал фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина и после спиртовой проводки подвергали парафиновой. Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах толщиной 5-6 мкм непрямым и прямым методами Кунса по методике Brosman. Иммунные клетки дифференцировали с помощью моноклональных антител (МКА) фирмы «Serotec» к различным клонам клеток: CD3+ (общая популяция Т-лимфоцитов), CD22+ (общая популяция В-лимфоцитов), CD8+ (Т-супрессоры цитотоксические), CD4+ (Т-хелперы), CD56+ (моноциты/ макрофаги), CD18+ (нейтрофильные гранулоциты), IgА-, IgМ-, и IgG-, а также IL-1- и IL-6 - продуценты. В качестве люминисцентной метки использовали F (ab)-2 - фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов, меченные ФИТЦ. Препараты изучали в люминисцентном микроскопе ЛЮМАМ-И2 с использованием светофильтров: ФС-1-2, СЗС-24, БС-8-2, УФС-6-3. Относительные объемы основных клонов иммунных клеток определяли с помощью сетки Г.Г. Автандилова в люминисцентном микроскопе. Полученные данные обрабатывали с использованием пакета программного обеспечения STATISTYKA v6.0 компании «StatSoft».

**Результаты.**

В изученном материале кусочков легочной ткани, умерших от ХСН, основными зонами сосредоточения иммунных клеток в легких как и в группе контроля, являлись межальвеолярные перегородки, периваскулярные пространства, а также БАЛТ. Относительные объемы основных клонов иммунных клеток (табл. 1), отражают интегральные результаты, полученные при исследовании как альвеолярного, так и бронхиального компонентов легких. Также как и в контроле, в межальвеолярных перегородках при ХСН были обнаружены основные клоны иммунных клеток - CD3+, CD22+, СD56+. При этом, отмечалось достоверное уменьшение макрофагальной популяции, а также тенденция к уменьшению В-клеточного компонента местных иммунных реакций. В тоже время популяция Т-лимфоцитов, увеличивалась за счет снижения содержания CD4+, и увеличения - CD8+- клеток.

Табдица 1

Иммуногистохимические показатели в препаратах легкого (в %) при ХСН

(М (m), n =10)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы | Клетки, экспрессирующие рецепторы | | | | | | |
| CD3+ | CD4+ | CD8+ | CD22+ | СD56+ | CD18+ | CD4+/CD8+ |
| ОСН | 48,0 (4,5) | 65,0 (3,8) | 35,0 (2,4) | 49,0 (3,9) | 9,0  (0,6) | 3,0 (0,05) | 1,85  (0,01) |
| ХСН | 49,0  (3,8) | 64,0  (4,6) | 37,0  (1,9) | 44,0  (4,4) | 6,0  (0,7)\* | 4,2  (0,08) | 1,72  (0,05) |

Продолжениетаблицы 1

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы | IL-продуцирующие | | Ig-продуцирующиеклетки | | |
| IL-1β | IL-6 | IgM | IgA | IgG |
| ОСН | 9,0 (1,1) | 11,0 (1,0) | 22,0 (1,5) | 20,0 (1,9) | 3,6 (0,006)\* |
| ХСН | 7,5 (0,4) | 13,0 (0,9) | 17,0 (2,0) | 11,0 (1,7)\* | 1,5 (0,003) |

*Примечание: \*- р<0,05 - достоверность различий с контролем*

В межальвеолярной ткани и просвете альвеол присутствовали клетки - продуценты преимущественно IgM, IgA, тогда, как IgG выявлялся в виде «следа». Также как и в контроле, нейтрофильные гранулоциты (CD18+) были единичными.

В БАЛТ при ХСН обнаруживались все изучаемые нами популяции иммунных клеток - В-лимфоциты (CD22+), клетки - продуценты IgM, IgA, IgG, Т-лимфоциты (CD3+), в том числе CD4+ и CD8+, а также макрофаги (CD56+) и единичные CD18+. Анализ относительных объемов выше указанных клеток свидетельствует, что в легочной ткани умерших от ХСН выявляется достоверный дефицит макрофагов - в 1,5 раза, а также клеток-продуцентов IgA - в 1,8 раза, IgM - в 1,3 раза соответственно по сравнению с контролем. Если при ОСН количество клеток-продуцентов IgG увеличивается, то при ХСН относительный объем их достоверно снижается - в 2,4 раза. Кроме того, видна тенденция к уменьшению популяции В-лимфоцитов - в 1,1 раза и к увеличению популяции Т-лимфоцитов - в 1,02. Следует заметить, что внутри популяции Т-лимфоцитов отмечается большее, чем в контроле, возрастание супрессорной активности, и, как следствие, в 1,07 раза снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ) (табл. 1). Сохраняется выявленная при ОСН тенденция в отношении изменения количества клеток-продуцентов IL-1 и IL-6. Относительный объем первых достоверно уменьшается - в 1,2 раза, а вторых - наоборот достоверно увеличивается - в 1,18 раза (табл. 2).

Таким образом для местных иммунных реакций легких при ХСН характерно наличие существенного дефицита макрофагальной популяции и продуцентов IgA на фоне относительной недостаточности В-лимфоидного компонента и активации Т-клеточной популяции, внутри последней с нарастанием супрессорной активности. Как и при ОСН, среди иммунных клеток усиливается дефицит IL-1 - и увеличивается содержание IL-6 - продуцентов. Дефицит CD56+ при ХСН может быть связан с недостаточностью кровообращения, вследствие чего и уменьшается поступление моноцитов, экспрессирующих этот рецептор, в легкие. К иммунопатологическим процессам, развивающимся при ХСН, следует также отнести фиксацию на поверхности эпителиальных базальных мембран иммунных комплексов, состоящих из IgM и IgA, а на сосудистых базальных мембранах еще и IgG. Среди разнообразных влияний иммунных комплексов на ткани общепризнанна их роль в развитии альтерации базальных мембран, повышении сосудистой проницаемости, обусловленной гипоксией, с одной стороны, и усиление явлений дистрофии и некробиоза в эпителиоцитах, с другой.

Иммуногистохимическое исследование перибронхиальных лимфоузлов выявило, что среди лимфоцитов коры преобладали В - лимфоциты, экспрессирующие рецепторы к CD22+, там же встречались клетки - продуценты IgM и IgG, реже IgA. По периферии фолликулов и в диффузном корковом плато выявлялись Т-лимфоциты- CD3+, CD8+. В паракортикальной зоне преимущественно локализовались Т-лимфоциты - CD3+, CD8+ и CD4+. Вокруг посткапиллярных венул и на границе паракортикальной зоны и мозгового вещества встречались В-лимфоциты (CD 22+), а также макрофаги, в цитоплазме которых содержался темно-коричневый и черный пигмент. Также как и в группе контроля (ОСН), в мякотных тяжах локализовались преимущественно макрофаги, часть из которых экспрессировала рецепторы к CD56+, другая - не экспрессировала эти рецепторы. Отмечалось также присутствие В- и Т-лимфоцитов, плазмобластов и плазмоцитов. Результаты иммуногистохимических исследований в группе ХСН мало отличались от таковых - контроля, однако была увеличена популяция макрофагов, уменьшен относительный объем Т- и В- лимфоцитов, равно как и клеток-продуцентов IL и Ig. Среди Т- клеточной популяции сохранялся дефицит супрессоров, что приводило к увеличению, по сравнению с контролем ИРИ. Результаты количественной оценки основных клонов иммунных клеток приведены в таблице 2.

Таким образом, при ХСН, по сравнению с ОСН, в перибронхиальных лимфатических узлах имела место атрофия лимфоидного компонента на фоне существенных склеротических изменений. В 50% наблюдений атрофия сочеталась с выраженным опустошением лимфоидного компонента, что, по-видимому связано с хронической циркуляторной гипоксией (более выражена при ХСН, по сравнению с ОСН), возникающей вследствие нарастающей сердечной недостаточности и с разрастанием соединительной ткани вокруг зон скопления пыли, высвобождающейся в результате гибели большого количества макрофагов - эспрессирующих рецепторы к CD56+

Таблица 2

Иммуногистохимические показатели в препаратах перибронхиальных лимфатических узлов (в %) при ХСН (М (m), n = 10)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы | Клетки, экспрессирующиерецепторы | | | | | |
| CD3+ | CD4+ | CD8+ | CD22+ | СD56+ | CD4+/CD8+ |
| ОСН | 45,0 (2,4) | 65,0  (3,0) | 22,0 (1,2) | 31,0  (2,0) | 16,0  (1,0) | 2,95  (0,4) |
| ХСН | 45,5 (3,2) | 62,0  (3,6) | 21,0 (1,8) | 14,0  (1,4) \*\* | 30,0  (1,8) \*\* | 3,14  (0,6) |

Продолжение таблицы 7.8

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы | IL-продуцирующие | | Ig-продуцирующие | | |
| IL-1β | IL-6 | IgM | IgA | IgG |
| ОСН | 0,9  (0,01) | 0,5  (0,02) | 2,0  (0,1) | 0,3  (0,02) | 3,0  (0,3)\* |
| ХСН | 0,6  (0,05)\* | 0,4  (0,01) | 2,4  (0,2) | 0,2  (0,01)\* | 3,5  (0,5) |

*Примечание: \*р< 0,05, \*\*,р <0,01- достоверность различий с кнтролем.*

Также отмечалось некоторое уменьшение Т - лимфоцитарной популяции и IL-продуцирующих клеток. Среди Т-лимфоцитов был выражен дефицит супрессоров и как следствие несколько повышался ИРИ, а увеличение В-лимфоцитарной популяции не сопровождалось увеличением клеток-продуцентов Ig. Отсутствие признаков активной реакции лимфоидной ткани на антигенное воздействие при ХСН указывает на наличие скрытой, вторичной иммунной недостаточности.

Перспективы дальнейших исследований в данном направлении возможны в виде изучения иммуногистохимических особенностей ткани легкого и перибронхиальных лимфатических узлов при пневмонии, риск развития которой на фоне ХСН достаточно велик.

**Выводы**

1. В легочной ткани при ХСН по сравнению с контролем отмечается выраженный дефицит макрофагальной популяциии продуцентов IgA на фоне относительной недостаточности В-лимфоидного компонента и активации Т-клеточной популяции, внутри которой нарастает супрессорная функция, что, по-видимому, обусловлено перманентной циркуляторной гипоксией

2. При ХСН также отмечается усиление дефицита IL-1, по - видимому, связанное с уменьшением макрофагальной популяции, и увеличивается содержание IL-6-продуцентов, на фоне активации Т-клеточной популяции.

3 В ткани перибронхиальных лимфатических узлов при ХСН по сравнению с ОСН нарастает дифицит как Т-, так и В-лимфоцитов и клеток - продуцентов иммуноглобулинов и интерлейкинов, а также увеличено количество клеток, экспрессирующих рецепторы к CD56+, что свидетельствуют о компенсаторной активации неспецифичекого гуморального звена иммунитета имеющего адаптивный характер и направленного на восстановление функционального состояния иммунной системы

**Литература**

1. Барна О. М. Маркери запалення в стратифікації ризику серцево-судинних захворювань / О. М. Барна // ЛікиУкраїни. – 2007. – № 115/116. – С. 6–11.
2. Кокряков В. Н. Очерки о врождённом иммунитете / В. Н. Кокряков. – СПб. : Наука, 2006. – 261 с.
3. Воронков Л. Г. Внезапная сердечная смерть у больных с хронической сердечной недостаточностью / Л. Г. Воронков // Український медичний часопис. – 2004. – № 1. – С. 24–32.
4. Патогенетичний аналіз імунної системи: основні принципи / О. К. Фролов, Є. Р. Федотов, В. В. Копійка, Л. О. Фролова // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2004. – № 3. – С. 14–21.
5. Порядин Г. В. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дизрегуляции иммунной системы при воспалении / Г. В. Порядин, Ж. М. Салмаси, А. Н. Казимирский // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. – № 1. – С. 2–7.
6. Сапин М. Р. Лимфатическая система и ее роль в иммунных процессах// Морфология. − 2007. − Т. 131, № 1. − С. 18−22.
7. Ярилин А. А. Естественные регуляторные Т-клетки / А. А. Ярилин // Российский медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 43–48.
8. A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread / W. Kastenmüller, P. Torabi-Parizi, N. Subramanian [et al.] // Cell. – 2012. – Vol. 150, N 6. – P. 1235−1248.
9. Card C. M. Emerging roles of lymphatic endothelium inregulating adaptive immunity/ C. M Card, S. S Yu, M. A. Swartz // J.Clin.Invest. – 2014. – Vol. 124, N 3. – P. 943−952.
10. Lymphatic endothelial cells – key players in regulation of tolerance and immunity / E. F. Tewalt, J. N. Cohen, S. J. Rouhani, V. H. Engelhard //  Front. Immunol. – 2012. –Vol. 28, N 3. − P. 305.
11. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity / J. E. Moyron-Quiroz, J. Rangel-Moreno, K. Kusser [et al.] // Nat. Med. – 2004. – Vol. 10, N 9. – P. 927–934.
12. Systems biology approaches for understanding cellular mechanisms of immunity in lymph nodes during infection / H. P. Mirsky, M. J. Miller, J. J. Linderman, D. E. Kirschner // J. Theor. Biol. – 2011. – Vol. 287. − P. 160−170.
13. The immunologic profile of adoptively transferred lymphocytes influences stroke outcome of recipients / D. Zierath, J. Schulze, A. Kunze [et al.] // J. Neuroimmunol. – 2013. – Vol. 263, N 1/2. –P. 28−34.
14. Weigent D. A. Lymphocyte GH-axis hormones in immunity / D. A. Weigent // Cell. Immunol. – 2013. – Vol. 285, N 1/2. – P. 118−132.

**References**

1. Barna, O.M. (2007). Markeri zapalennja v stratifіkacії riziku sercevo-sudinnih zahvorjuvan'.[Markers inflammation in the risk stratification of cardiovascular disease]. *Lіki Ukraїni, 115/116*, 6-11 [in Ukrainian].
2. Kokrjakov, V.N. (2006) *Ocherki o vrozhdjonnom immunitete*. [Essays about innate immunity]. Sankt-Peterburg: Nauka [in Russian].
3. Voronkov, L.G. (2004). Vnezapnaja serdechnaja smert' u bol'nyh s hronicheskoj serdechnoj nedostatochnost'ju. [Sudden cardiac death in patients with chronic heart failure]. *Ukrayins'kyy medychnyy chasopys*, *1,*24-32 [in Ukrainian].
4. Frolov, O.K., Fedotov, Є.R., Kopіjka, V.V., &Frolova, L.O. (2004). Patogenetychnyj analiz imunnoi' systemy: osnovni pryncypy. [Pathogenetic analysis of the immune system: basic principles]. *Eksperymental'na ta klinichna fiziologija ta biohimija- Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry, 3*, 14-21 [in Ukrainian].
5. Porjadin, G.V., Salmasi, Zh.M., &Kazimirskij, A.N. (2006). Aktivacionnye markery limfocitov kak pokazateli dizreguljacii immunnoj sistemy pri vospalenii. [lymphocyte activation markers as indicators of dysregulation of the immune system during inflammation]. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija - Pathological physiology and Experimental Therapy, 1*, 2-7 [in Ukrainian].
6. Sapin, M.R. (2007). Limfaticheskaja sistema i ee rol' v immunnyh processah. [lymphatic system and its role in immune processes]. *Morfologija - Morphology, 131, 1*, 18-22 [in Ukrainian].
7. Jarilin, A.A. (2007). Estestvennye reguljatornye T-kletki. [Natural regulatory T cells]. *Rossijskij medicinskij zhurnal -  Russian Medical Journal, 1,* 43-48 [ in Russian ].
8. Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T., &Germain, R.N. (2012). A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. *Cell, 150(6),* 1235-1248.
9. Card, C. M, Yu, S.S, & Swartz, M.A. (2014). Emerging roles of lymphatic endothelium in regulating adaptive immunity*. J Clin Invest,124(3),* 943-952.
10. Tewalt, E.F, Cohen, J.N, Rouhani, S.J, &Engelhard, V.H. (2012). Lymphatic endothelial cells - key players in regulation of tolerance and immunity. *Front Immunol, 3,* 305.
11. Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno J., Kusser K., Hartson L., Sprague F., Goodrich S., Woodland D.L., Lund F.E., &Randall T.D. (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med, 10(9),* 927-934.
12. Mirsky, H.P., Miller, M.J, Linderman, J.J, &Kirschner, D.E. (2011). Systems biology approaches for understanding cellular mechanisms of immunity in lymph nodes during infection. *J Theor Biol. 287,* 160-170.
13. Zierath, D., Schulze, J., Kunze, A., Drogomiretskiy, O., Nhan, D., Jaspers, B., Dressel, A., & Becker, K. (2013). The immunologic profile of adoptively transferred lymphocytes influences stroke outcome of recipients. *J Neuroimmunol, 263(1-2),* 28-34.
14. Weigent, D.A. (2013). Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cell Immunol, 285(1-2),* 118-132.

**Иммуногистохимические изменения в ткани легкого и перибронхиальных лимфоузлов при хронической сердечной недостаточности**

Павлова Е.А.

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

**Резюме.** При выяснении участия клеток имунной системы в местных имунных реакциях легких и перибронхиальных лимфоузлов при хронической сердечной недостаточности с помощью имуногистохмческих методов по сравнению с острой сердечной недостаточностью установлено, что в ткани легкого выявлена относительная активация Т- клеточных популяций, что приводит к увеличению продукции IL-6, в то время как уменьшение количества макрофагов приводит к снижению продукции IL-1, в то же время в ткани перибронхиальных лимфатических узлов, выражен дефицит как Т-, так и В-лимфоцитов, а также клеток-продуцентов иммуноглобулинов и интерлейкинов и увеличена популяция макрофагов экспрессирующих рецепторы к CD56+ что свидетельствует о компенсаторной активации неспецифичекого гуморального звена иммунитета имеющего адаптивный характер и направленного на восстановление функционального состояния иммунной системы

**Ключевые слова:** хроническая сердечная недостаточность, бронхоассоциированная лимфоидная ткань, перибронхиальные лимфоузлы, иммунокомпетентные клетки.

**Імуногістохімічні зміни в тканині легень і перибронхіальних лімфовузлів при хронічній серцевій недостатності**

Павлова О.О.

Харківський національний медичний університет, Украина

**Резюме.** При з'ясуванні участі клітин імунної системи в місцевих імунних реакціях легень та перибронхіальних лімфовузлів при хронічній серцевій недостатності за допомогою імуногістохімічних методів в порівнянні з гострою серцевою недостатністю встановлено, що в тканині легень виявляється відносна активація Т- клітинних популяцій, щo сприяє збільшенню продукції IL-6, у той час як дефіцит макрофагів призводить до зниження продукції IL-1. В тканині перибронхіальных лимфатичних вузлів спостерігається дефіцит як Т-, так і В-лимфоцитів, а також клітин-продуцентів імуноглобулінів та інтерлейкінів та збільшена популяція макрофагів експресуючих рецептори до CD56, останнє свідчать про компенсаторну активацію неспецифічної гуморальної ланки імунітету, що має адаптивний характер і спрямована на відновлення функціонального стану імунної системи.

**Ключові слова**: хронічна серцева недостатність, бронхоасоційована лімфоїдна тканина, пери бронхіальні лимфатичні вузли, імунокомпетентні клітини

**Immunohistochemical changes in tissue of lung and peribronchial lymph nodes during сhronic heart failure**

PavlovaYe.A.

Kharkov National Medical University, Ukraine

**Summary**. During finding out the role of cells of immune system in local immune reactions of lungs and peribronchial lymph nodes at сhronic heart failure with the help of immunohistochemical methods compared with acute heart failure it is established that: there is relative activation of T- lymphocyte populations which promotes increasing of IL-6 production, while deficit in macrophages number results in decrease of IL-1 production. In tissue of peribronchial lymphatic nodes there is expressed deficit of both T- and B- lymphocytes, as well as cells-producents of immunoglobulins and interleukins. There is also an increase of macrophage population which expresses receptors to CD56+ indicating that compensatory activation of nonspecific humoral immunity having adaptive nature and directed on restoration of the functional state of the immune system

**Key words:** сhronic cardiac insufficiency, broncho-associated lymphoid tissue, peribronchial lymph nodes, immunocompetent cells.