

АНАЛІЗ КЛІТИННОГО СКЛАДУ ТА АКТИВНОСТІ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ В ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛАХ ХВОРИХ САРКОЇДОЗОМ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ ПЕРЕБІГУ ТА ЛІКУВАННЯ СИСТЕМНИМИ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОЇДАМИ

ANALYSIS OF THE CELLULAR COMPOSITION AND OF THE INFLAMMATORY RESPONSE ACTIVITY IN THE LYMPH NODES OF PATIENTS WITH SARCOIDOSIS AT DIFFERENT STAGES OF THE CLINICAL COURSE AND TREATMENT WITH SYSTEMIC GLUCOCORTICOSTEROIDS

Дмитро Є. Ніколенко, Дмитро М. Бойко

ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ «УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ», ПОЛТАВА, УКРАЇНА

РЕЗЮМЕ

Вступ: Вивченню динаміки запальних змін в лімфатичних вузлах хворих саркоїдозом на фоні лікування глюкокортикостероїдами (ГКС) та без них приділяється недостатня увага, що і обумовлює актуальність наукових пошуків у даному напрямку.

Мета: Дослідити особливості клітинного складу та активності запальної реакції у лімфатичних вузлах хворих саркоїдозом на різних етапах перебігу та лікування ГКС з урахуванням часу встановлення діагнозу і ступеня активності патології.

Матеріали та методи: До аналізу було залучено результати морфологічного дослідження біопсійного матеріалу, отриманого із уражених лімфатичних вузлів хворих на саркоїдоз. З метою встановлення клітинного складу та оцінки активності запальної реакції нами були додатково застосовані специфічні імуногістохімічні (ІГХ) маркери CD68, CD20, CD3 та Collagen IV.

Результати: Призначення терапії системними ГКС у хворих з активним саркоїдозом сприяє зменшенню інтенсивності експресії ІГХ маркерів CD68, CD20, CD3, Collagen IV в осередках продуктивного запалення. За відсутності лікування ГКС в осередках продуктивного запалення у хворих на саркоїдоз зростає кількість судин, що експресують Collagen IV з підтримкою імунного запалення в центральній та периферичній частині гранульоми, що складається переважно з активних форм макрофагів (CD68) та Т-лімфоцитів (CD3).

Висновки: Застосування ГКС для лікування активного саркоїдозу дозволяє знизити інтенсивність запальної реакції та попередити поширення процесів фіброзування в ушкоджених лімфатичних вузлах пацієнтів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: саркоїдоз, імунні маркери, глюкокортикостероїди, судини

ABSTRACT

Introduction: The study of the inflammatory changes dynamics in the lymph nodes of patients with sarcoidosis treated by glucocorticosteroids (GCS) and without them is underestimated, which just stipulates the relevance of scientific research in this field.

Aim: To study the particularities of the cellular composition of the inflammatory response activity in the lymph nodes of patients with sarcoidosis at different stages of the clinical course and treatment with GCS taking into account the time of diagnosis establishing and the degree of the pathology activity.

Materials and methods: The results of the morphological study of biopsy material obtained from the affected lymph nodes of patients with sarcoidosis were analyzed. To establish the cellular composition and to evaluate the overall reaction activity we have additionally used specific immunohistochemical (IHC) markers CD 68, CD20, CD3 and Collagen IV.

Results: Administration of systemic GCS therapy to patients with active sarcoidosis contributes to reducing the intensity of CD68, CD20, CD3, Collagen IV IHC markers expression in the foci of productive inflammation. In the absence of GCS treatment, in the foci of productive inflammation, in the patients with sarcoidosis, the number of vessels expressing Collagen IV increases with the support of immune inflammation in the central and peripheral part of the granuloma predominately consisting of activated macrophages (CD68) and T-lymphocytes (CD3).

Conclusions: The use of GCS for treatment of active sarcoidosis allows to reduce the intensity of the inflammatory reaction and to prevent the spread of the fibrosing processes in the affected lymph nodes of patients.

KEY WORDS: sarcoidosis, immune markers, glucocorticosteroids, vessels.

ВСТУП

Саркоїдоз – найбільш розповсюджене інтерстиціальне захворювання легень невстановленої етіології, що характеризується ураженням як органів дихання, так і інших внутрішніх органів [1, 2]. Саркоїдоз є захворюванням, при якому, поряд із мультисистемним ураженням тканин внутрішніх органів, відбувається активація елементів імунної системи: Т- та В-клітин, макрофагів у місці гранулематозного запалення з вивільненням різних хемокинів і цитокінів [2, 3]. Існує обмежена кількість досліджень, що описують характеристики перебігу запалення та процесів фіброзування у судинах лімфатичних вузлів хворих на саркоїдоз [4]. Ще менше робіт присвячено саме змінам в ушкоджених гранулематозним запаленням тканинах на фоні лікування стероїдними протизапальними засобами та без нього [5], що і обумовлює актуальність наукових пошуків у даному напрямку.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідити особливості клітинного складу та активності запальної реакції у лімфатичних вузлах хворих саркоїдозом на різних етапах перебігу та лікування ГКС з урахуванням часу встановлення діагнозу і ступеня активності патології.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи № 0110U008151 та № 0114U006405 на базі Полтавського обласного клінічного протитуберкульозного диспансеру, Полтавської обласної клінічної лікарні ім. М.В. Скліфосовського. Використання біологічних зразків було схвалено етичною комісією ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Усі пацієнти підписали інформовану згоду для участі у дослідженні. До аналізу залучено результати морфологічного дослідження 5 пацієнтів (двоє жінок та 3 чоловіків; вікові межі: 42–59 років) хворих на саркоїдоз. Ступінь активності захворювання визначали за сукупністю характерних клініко-інструментальних даних [2]. Пацієнти були включені у дослідження за наявності в анамнезі результатів біопсії лімфатичних вузлів в активній фазі до лікування ГКС (1 хворий), під час загострення саркоїдозу на фоні лікування ГКС (2 пацієнта) та під час спостереження за спонтанною ремісією саркоїдозу без лікування (2 пацієнта). З метою встановлення клітинного складу та оцінки активності запальної реакції у біопсійному матеріалі отриманого із уражених лімфатичних вузлів хворих на саркоїдоз, нами були застосовані специфічні імуногістохімічні (ІГХ) маркери: до Т-лімфоцитів, асоційованих з передачею міжклітинних сигналів (CD3); до антигену специфічного для активованих форм В-лімфоцитів (CD20); до сіалмуцину, що експресується клітинами моноцитарно-макрофагальної системи (CD68); та

колагену IV типу (Collagen IV) – фібрилярного протеїну, компоненту базальних мембран [6]. У якості первинних антитіл використовували CD3 (моноклон sp7, фірма Thermo), CD20 Ab-1 (моноклон L26, фірма Thermo), CD68 Ab-3 (моноклон KP1, фірма Thermo), колаген (Collagen) IV Ab-4 (моноклон PHM-12, фірма Thermo). Титр антитіл підбирався індивідуально з використанням у якості розчинника, спеціального розчину antibody diluent (Thermo). Наступний етап ІГХ дослідження проводили з використанням системи візуалізації останнього покоління Quanto (Thermo). Ідентифікація реакції проводилась завдяки нанесенню хромогену (DAB (Thermo)). Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра. Кількісні та якісні показники експресії маркерів вивчали як мінімум на 8-10 випадково обраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів при збільшенні $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, та $\times 1000$ (коли це було необхідно). Оцінка експресії маркера проводилась індивідуально у відповідності з рекомендаціями інших дослідників [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

При оглядовому мікроскопічному дослідженні гістологічних препаратів тканини лімфатичного вузла пацієнта із загостренням саркоїдозу виявлені осередки продуктивного запалення з порушенням гістологічної будови тканини вузла. Центральна частина гранульоми містить переважно клітини макрофагального ряду із домішкою клітин лімфоцитарного походження. Навколо скупчень макрофагів розташовані судини капілярного типу, устелені сплосченим ендотелієм, далі - визначається виражена запальна круглоклітинна інфільтрація. Серед клітин даного інфільтрату розташовані фібробласти в активованому стані, що утворюють ледь помітні волокна сполучної тканини (рис. 1 (а))

У хворого на саркоїдоз, який отримував призначене лікування ГКС при оглядовому мікроскопічному дослідженні гістологічних препаратів тканини лімфатичних вузлів, виявлені осередки продуктивного запалення, що мають менш поширений характер. Так, у центральній частині гранульоми макрофагальні клітини менш чисельні, зустрічаються поодинокі лімфоцити. У периферійній частині скупчення макрофагів запальна кругло-клітинна інфільтрація пригнічена, що проявляється менш щільним, переважно навколосудинним розташуванням клітин імунної системи. Сполучна тканина має вигляд ледь помітних волокнистих структур навколо вогнищ макрофагальних інфільтратів, що демонструє зниження активуючого впливу на синтетичну функцію, з боку останніх, на фібробласти, як наслідок імуносупресуючої дії стероїдної терапії (рис. 1 (b)).

При дослідженні осередків продуктивного запалення у тканині реактивного лімфатичного

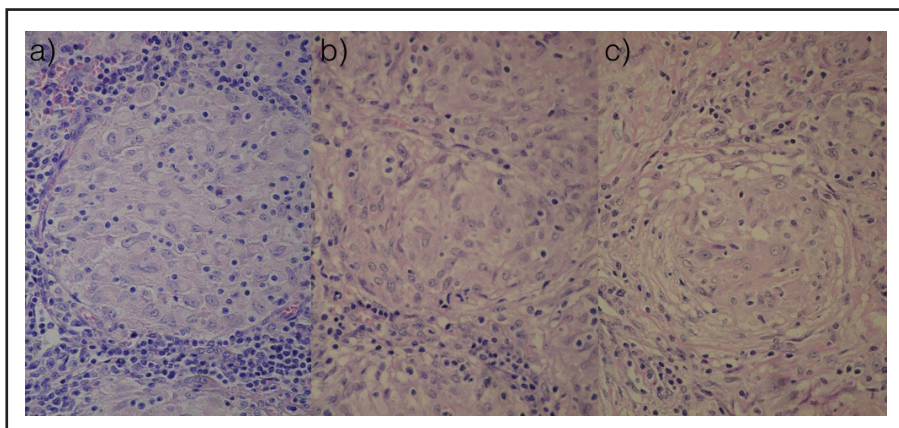


Рис. 1. Осередки продуктивного запалення у лімфатичному вузлі хворого на саркоїдоз під час загострення захворювання до призначення лікування (а)), на фоні терапії ГКС (b)), спонтанної ремісії хвороби без лікування кортикостероїдами (с)). Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. х400.

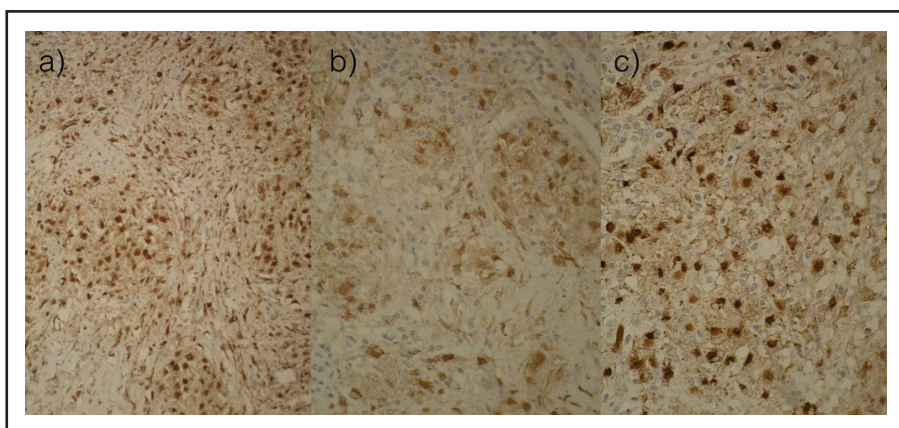


Рис. 2. Експресія маркеру CD68 в осередках продуктивного запалення в лімфатичному вузлі хворого на саркоїдоз під час загострення до призначення лікування (а)), на фоні терапії ГКС (b)), без лікування кортикостероїдами (с)). Забарвлення ІГХ методом, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. Зб. х400.

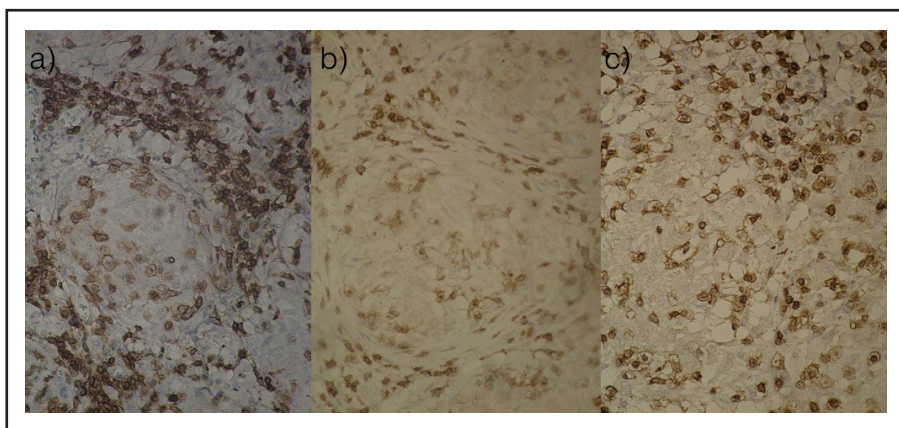


Рис. 3. Експресія маркеру CD3 в осередках продуктивного запалення в лімфатичному вузлі хворого на саркоїдоз під час загострення до призначення лікування (а)), на фоні терапії ГКС (b)), без лікування кортикостероїдами (с)). Забарвлення ІГХ методом, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. Зб. х400.

вузла шиї хворого на саркоїдоз, який тривалий час не отримував лікування, встановлені виражені зміни фіброзного характеру. Так, у гістологічних препаратах, забарвлених гематоксилином та еозином, встановлені осередки макрофагів з фібробластами, що утворюють колагенові волокна. Периферійні відділи даних клітинних скупчень оточені клітинним інфільтратом, де активовані форми фібробластів утворюють пухкі волокна сполучної тканини, а також зустрічаються більш зрілі колагенові волокна рожевого кольору. Лімфоцитарна інфільтрація даних ділянок незначна, здебільшого периваскулярна. Серед клітин центральної частини гранульоми більше до периферії, виявлені контури клітин, що мають оптично порожню цитоплазму і, подекуди, сплющене

бліде ядро в периферійних відділах (рис. 1 (с)).

ІГХ аналіз гістологічних препаратів лімфатичних вузлів пацієнтів на саркоїдоз до отримання лікування, з використанням маркеру CD68, виявило його виражену (+++) внутрішньо-ядерну експресію клітинами, розташованими у центральному відділі осередку гранульоматозного запалення при саркоїдозі. Останнє підтверджує їх моноцитарно-макрофагальне походження, як антиген-презентуючих клітин з фагоцитарною активністю. Крім того, встановлено, що експресію даного маркеру виявили клітини, розташовані здебільш навколо мікросудин (рис. 2 (а)).

Маркер CD68, в тканинах лімфатичних вузлів пацієнтів із саркоїдозом на фоні лікування ГКС мав помірну (++) і слабку (+) експресію у ядрах клітин

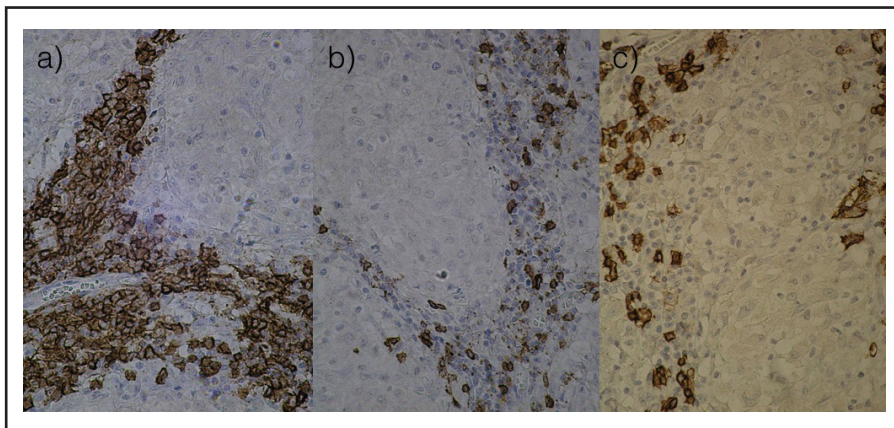


Рис. 4. Експресія маркеру CD20 в осередках продуктивного запалення в лімфатичному вузлі хворого на саркоїдоз під час загострення до призначення лікування (a)), на фоні терапії ГКС (b)), без лікування кортикостероїдами (c)). Забарвлення ІГХ методом, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. 3б. х400.

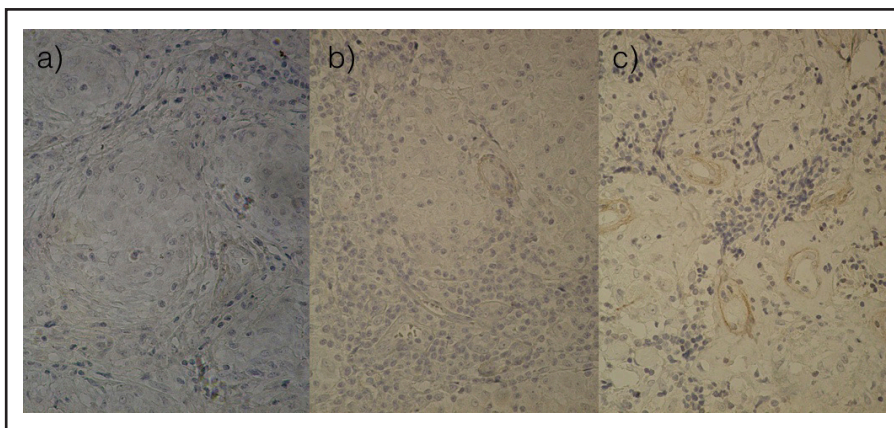


Рис. 5. Експресія маркеру Collagen IV в осередках продуктивного запалення у лімфатичному вузлі хворого на саркоїдоз під час загострення до призначення лікування (a)), на фоні терапії ГКС (b)), без лікування кортикостероїдами (c)). Забарвлення ІГХ методом, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. 3б. х400.

центральної частини гранульоми у вигляді світло-коричневого забарвлення вищепозначених структур. Останнє демонструє зниження інтенсивності моноцитарно-макрофагальної активності у даному осередку запалення на фоні отриманої терапії. Також виявлено зниження кількості клітин периферійного відділу осередку продуктивного запалення навколо мікросудин, що експресують даний маркер (рис.2(b)).

У хворих з саркоїдозом, що не отримували ГКС, виявлено виражену (+++) і помірну (++) експресію CD68 у ядрах клітин центральної і периферичної частини гранульоми у вигляді темно і світло-коричневого забарвлення вищенаведених структур. На нашу думку, це демонструє персистування інтенсивної моноцитарно-макрофагальної активності у даному осередку запалення пацієнта без лікування ГКС (рис. 2 (c)).

Застосування маркеру CD3 до Т-лімфоцитів при ІГХ дослідженні гранульом у лімфатичних вузлах пацієнтів під час загострення захворювання до призначення лікування, виявило його внутрішньо-цитоплазматичну експресію високого ступеня інтенсивності (+++). Клітини з вираженою експресією маркеру CD3 переважно оточують макрофагальний інфільтрат центральної частини гранульоми. Це дозволило верифікувати серед кругло-клітинного інфільтрату, скупчення Т-лімфоцитів високої щільності. Також спостерігалася помірна (++) та слабка (+) експресія даного маркеру у цитоплазмі та цитоплазматичній

мембрані клітин, що розташовані у центральній частині гранульоми (рис. 3(a)). Дана лімфоцитарна реакція навколо вогнища продуктивного запалення демонструє наявність відповіді з боку клітинного імунітету, котру, як характерну для саркоїдозу, підтверджують і інші дослідники [2, 5].

У пацієнтів із саркоїдозом на фоні терапії ГКС у центральній частині гранульоми виявлено слабку (+) внутрішньо-цитоплазматичну експресію маркеру CD3. Це, на нашу думку, вказує на зниження комунікативної активності Т-лімфоцитів у центральній частині осередку продуктивного запалення. Також спостерігається помірна (++) та слабка (+) внутрішньо-цитоплазматична експресія даного маркеру у цитоплазмі клітин, які розташовані у периферійній частині гранульоми та у навколосудинних ділянках. Зміна кількісного складу Т-лімфоцитарного інфільтрату гранульоми демонструє зниження активності клітинної ланки системи імунітету у даному вогнищі запалення та не супроводжується появою деструктивних змін цього осередку (рис. 3(b)).

У зразках тканин пацієнтів без лікування ГКС, помірна (++) і слабка (+) ступінь експресії маркеру Т-лімфоцитів - CD3 вказує на наявність нечисленних клітин даного типу серед скупчень макрофагів центральної частини гранульоми. Це виявилось темно- та світло-коричневим забарвленням, переважно цитоплазматичної та ядерної мембрани даних

клітин. Крім того, виявлені скупчення Т-лімфоцитів, що мають високу ступінь експресії (++++) маркеру розташовані ближче до фіброзної тканини гранульоми навколо судин мікроциркуляторного русла (рис. 3(с)).

Під час загострення саркоїдозу, до застосування ГКС, у морфологічних зразках лімфовузлів пацієнту із саркоїдозом виявлено велику кількість експресуючих маркер CD20 клітин в осередках клітинного інфільтрату периферійних відділів гранульоми, особливо навколо кровоносних судин мікроциркуляторного русла. Даний маркер має високу ступінь експресії (++++) у цитоплазмі та цитоплазматичній мембрані даних клітин, забарвлюючи їх у темно-коричневий колір. ІГХ реакція також продемонструвала відсутність даних форм лімфоцитів у центральній частині вогнища продуктивного запалення (рис. 4 (а)).

У дослідженому матеріалі, отриманому від пацієнтів на фоні терапії ГКС виявлено значне зниження кількості клітин, що експресують маркер CD20 у периферичних відділах гранульоми. Варто звернути увагу на наявність розрізаних, поодиноких клітин В-лімфоцитів з помірним (++) ступенем експресії даного маркеру в ділянках пригніченого круглоклітинного інфільтрату оточеного сполучною тканиною. У центральній частині даного вогнища запалення В-лімфоцитів не зафіксовано. Таким чином, кількісне зниження активованих форм В-лімфоцитів свідчить про зменшення активності гуморальної ланки імунітету в осередках гранулематозного запалення на фоні терапії ГКС (рис. 4 (б)).

Застосування маркеру CD20 у випадках без лікування ГКС, виявило наявність експресуючих даний маркер клітин серед запального інфільтрату у сполучній тканині периферійних відділів гранульоми та поблизу кровоносних судин. Даний маркер має високу ступінь експресії (++++) у цитоплазмі та цитоплазматичній мембрані CD20 клітин. ІГХ реакція не виявила В-лімфоцитів у центральній частині гранульоми (рис. 4 (с)).

Оцінюючи експресію маркеру Collagen IV в лімфатичних вузлах хворого, що отримував протизапальну терапію у вигляді системних ГКС (рис.5 (б)) та під час «дебюту» хвороби без лікування (рис.5 (а)), було відмічено його слабкий (+) ступінь експресії в стінках кровоносних судин навколо вогнищ продуктивного запалення.

У хворого на саркоїдоз легень, що тривалий час не отримував лікування протизапальними препаратами спостерігалось зростання інтенсивності експресії маркера Collagen IV (++) , а також збільшення числа Collagen IV-вмісних судин в периферійних відділах гранульом і тканині лімфатичного вузла (рис. 5с). Отже, за відсутності лікування ГКС осередки продуктивного запалення у хворих на саркоїдоз набувають ознак вираженого фіброзу особливо навколо судин з підтримкою імунного запалення в центральній частині гранульоми, що складається переважно з активних форм макрофагів та Т-лімфоцитів.

ВИСНОВКИ

Для осередків продуктивного запалення (гранульом) в лімфатичному вузлі при саркоїдозі під час загострення захворювання притаманне переважання макрофагальної інфільтрації з вираженим ступенем синтезу сіалміцину CD 68 (+++), нечисельними Т-лімфоцитами CD 3 (+), відсутністю В-лімфоцитів CD 20 (-) у центральному відділі гранульоми та вираженою запальною інфільтрацією з переважанням Т – лімфоцитів CD 3 (+++) навколо кровоносних мікросудин, з помірною присутністю клітин моноцитарно-макрофагального ряду CD 68 (++) , а також великою кількістю активованих форм В-лімфоцитів CD 20 (+++) у периферичних відділах.

На фоні терапії ГКС виявлено зменшення площі продуктивного запалення у центральних відділах гранульоми у вигляді макрофагальної інфільтрації з помірним ступенем синтезу сіалміцину CD 68 (++) , поодиноких Т-лімфоцитів CD 3 (+), відсутності В-лімфоцитів CD 20 (-) та слабо вираженої периваскулярної запальної інфільтрації з переважанням Т – лімфоцитів CD 3 (++) , з нечисельними клітинами моноцитарно-макрофагального ряду CD 68 (+) і активними формами В-лімфоцитів CD 20 (+) в периферичних відділах.

Без лікування ГКС в осередках продуктивного запалення хворих на саркоїдоз зафіксована макрофагальна інфільтрація з вираженим (+++) і помірним (++) ступенем синтезу сіалміцину CD68, нечисленні CD3 Т-лімфоцити в центральній частині гранульоми та зростання кількості кровоносних мікросудин, що експресують Collagen IV (++) , виражена (+++) навколосудинна запальна інфільтрація з переважанням CD3 Т – лімфоцитів, помірною (++) присутністю клітин моноцитарно-макрофагального ряду CD 68 та активованих форм В-лімфоцитів CD20 (+++) на її периферії.

Перспективи подальших досліджень. У майбутньому планується удосконалити тактику протизапальної терапії хворих на саркоїдоз з урахуванням ступеня активності та стадії захворювання.

Дослідження виконано в рамках ініціативної науково-дослідної роботи «Клініко-функціональні та морфологічні особливості перебігу захворювань респіраторної системи (туберкульозу, саркоїдозу, дисемінованих процесів та ХНЗЛ) на різних етапах лікування, реабілітації та профілактики», номер держреєстрації 0110U008151, роки виконання 2011-2015 р.р., науковий керівник Микола Г. Бойко та «Комплексна реабілітація хворих на кардіологічну, легеневу, неврологічну патологію та довгострокова оцінка її ефективності з урахуванням ступеня фізичної активності, кардіореспіраторних і метаболічних критеріїв здоров'я», номер держреєстрації 0114U006405, роки виконання 2014-2018 р.р., науковий керівник Дмитро М. Бойко.

ЛІТЕРАТУРА

1. Grutters J.C., Drent M. van den Bosch J.M.M. Sarcoidosis. *Eur. Respir. Mon.* 2009. 46: 126–154.
2. Бойко М.Г., Бойко Д.М. Вплив глюкокортикостероїдів на динаміку клінічної симптоматики та системні значення про- та протизапальних цитокінів у хворих на саркоїдоз. *Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція.* 2012. 4 (11): 52–56.
3. Yamashita M., Mouri T., Niisato M. et al. Heterogeneous characteristics of lymphatic microvasculatures associated with pulmonary sarcoid granulomas. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2013. 10(2): 90-97.
4. Govender P., Berman J.S. The Diagnosis of Sarcoidosis. *Clin. Chest Med.* 2015. 36(4): 585-602.
5. Costabel U., Hunninghake G. W. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1999. 14: 735-737.
6. Петров С.В., Райхлин Н. Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Титул: Казань, 2008.

АДРЕСА ДЛЯ КОРЕСПОНДЕНЦІЇ

Дмитро М. Бойко

пров. Дніпровський, 9,

36008 Полтава, Україна

tel.: +380664464003

e-mail: dim.xata@gmail.com

Nadesłano: 20. 10. 2016

Zaakceptowano: 26. 01. 2017