

АНАЛИЗ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОНКОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ С БЕЛОК-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТЕРОПАТИЕЙ

Шуматова Т.А.¹, Приходченко Н.Г.¹, Григорян Л.А.¹

¹*Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Владивосток, Россия (690002, г.Владивосток, проспект Острякова 2), mailto:prikhodchenko_n@mail.ru*

Проведена оценка состояния межклеточных взаимодействий и определение роли дендритных клеток и интраэпителиальных лимфоцитов в формировании оральной толерантности у детей раннего возраста с белок-индуцированной энтеропатией. Методами фазово-контрастной микроскопии и иммуногистохимии были изучены клетки иммуно-фагоцитарного звена в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки и ее мукозном слое, рассмотрена возможность их участия в формировании пищевой толерантности. Важная роль в формировании энтеральной толерантности отводится антиген-презентирующим клеткам, в частности, дендритным клеткам. Полученные данные способствуют расширению представлений о роли межклеточных взаимодействий при развитии пищевой гиперчувствительности, могут служить основой для разработки патогенетической терапии. Метод фазовоконтрастной микроскопии мазков, полученных из пристеночной слизи, может быть рекомендован для мониторинга состояния слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у детей с пищевой гиперчувствительностью.

Ключевые слова: оральная толерантность, дендритные клетки, интраэпителиальные лимфоциты, белок-индуцированная энтеропатия, дети

THE CELL INTERACTIONS ANALYSIS IN THE INTESTINAL MUCOSA IN CHILDREN WITH PROTEIN INDUCED ENTEROPATHY

Shumatova T.A.¹, Prikhodchenko N.G.¹, Grigoryan L.A.¹

¹*Pacific State Medical University, Russian Federation (690002, Vladivostok, Prospect Ostryakova 2), mailto:prikhodchenko_n@mail.ru*

It was study the local mucosal immunity of the intestine in children with protein induced enteropathy. Histological and immunohistochemical methods were used to study the immuno-phagocytic cell in the duodenum. It was in first consider the role of immune cells-phagocytic in duodenum mucosa and cell interactions in the development of food tolerance. The data obtained contribute to the disclosure of the role of cell-cell interactions with food hypersensitivity in children; can serve as a model for the development of the algorithm in the application of pathogenetic therapy medicinal products. Phase contrast microscopy smears obtained from parietal mucus can be used to monitor the morphological analysis of the mucosa of the gastrointestinal tract in children with various pathological processes involving food hypersensitivity.

Keywords: oral tolerance, dendritic cells, intraepithelial lymphocytic, protein induced enteropathy, children

Введение

В настоящее время рядом работ показано, что нарушение процессов оральной толерантности и формирование пищевой гиперчувствительности (ПГ) может являться одной из значимых причин формирования хронической гастроэнтерологической патологии, полидефицитных состояний, особенно у детей раннего возраста [1, 7]. Установлено, что развитие гиперчувствительности к пище происходит в результате неспособности организма сформировать эффективную иммунологическую толерантность к пищевым антигенам [1, 6, 7]. Роль иммунной системы, ассоциированной со слизистыми оболочками, состоит в поддержании баланса между развитием иммунных реакций и процессами толерантности на фоне постоянных контактов с потенциально патогенными и непатогенными

микроорганизмами и пищевыми антигенами [8, 10]. Существуют данные, что ключевая роль в осуществлении этого баланса может принадлежать дендритным клеткам [5]. Микроокружение дендритной клетки в момент ее встречи с антигеном осуществляет регуляцию экспрессии ко-стимулирующих молекул и продукцию ряда цитокинов. Межклеточные взаимодействия контролируют антиген-специфическую активность Т-клеток, в частности, развитие других эффекторных Т-клеточных популяций (Th1/Th2), что определяет сценарий иммунного ответа [9].

Согласно современным данным, энтеропатия, индуцированная пищевыми белками (белок-индуцированная энтеропатия), является одной из частых проявлений гастроинтестинальной пищевой гиперчувствительности у детей раннего возраста, клинически проявляется симптомами персистирующей диареи, срыгиванием, рвотой, белково-энергетической недостаточностью. До настоящего времени, несмотря на многочисленные исследования механизмов формирования толерантности и пищевой гиперчувствительности, многие вопросы рассматриваются лишь гипотетически, до конца не ясна роль межклеточных взаимодействий в генезе данных процессов [4].

Цель настоящего исследования состояла в изучении состояния межклеточных взаимодействий в слизистой оболочке тонкой кишки у детей с белок-индуцированной энтеропатией.

Материал и методы исследования. Под наблюдением находилось 39 детей с тяжелыми проявлениями аллергической энтеропатии, возникшей на фоне непереносимости белков коровьего молока (белок-индуцированная энтеропатия), в возрасте от 6 до 12 месяцев. Всем детям осуществлено комплексное клиничко-иммунологическое, биохимическое и функциональное обследование в динамике. В периоде выраженных клинических проявлений с целью дифференциальной диагностики с другими заболеваниями желудочно-кишечного тракта (целиакия, лактазная недостаточность, синдром мальабсорбции другой этиологии) пациентам была проведена эзофагогастроюноскопия с энтеробиопсией. Обследуемым пациентам производили забор пристеночной дуоденальной слизи с помощью эндоскопа с щёточной насадкой «Pentax» из двенадцатиперстной кишки (ДПК) для характеристики состояния первого звена локального иммунного барьера слизистой оболочки тонкой кишки и оценки мукозального иммунитета [3]. Из полученного материала готовили мазки для последующего анализа с помощью фазово-контрастной микроскопии при иммерсионном увеличении $\times 1000$. Изучение срезов проводили на микроскопе Olympus Vx72 с цифровой фотокамерой и фирменным компьютерным программным обеспечением. Биоптаты слизистой оболочки заливали в парафин по стандартной методике для иммуногистохимических исследований с использованием

автоматических систем заливки и получения серийных срезов [2]. Срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали с применением автоматизированных систем для иммуногистохимических методов при помощи моноклональных антител. Использованы современные высокочувствительные иммуногистохимические методы EPOS и En Vision [2]. Для выявления CD4, CD8, CD68 использовали маркёры фирмы DAKO. Идентификация иммунокомпетентных клеток проводилась по одинаковой схеме, несмотря на различную локализацию антигена в клеточных структурах: мембраны, лизосомы, ядра, комплекс Гольджи. Демаскировка антигенных детерминант проводилась в стеклянном контейнере, заполненном восстанавливающим раствором, и созданием условий водяной бани в течение 1 часа. Часть препаратов обработана с помощью микроволнового излучения, которое даёт лучший демаскировочный эффект, в течение получаса. Для демаскировки антигенов применяли 10 ммоль/л цитратный буфер, pH 6,0 или DAKO TRS (Target retrieval solution, code № S 1700). Остывшие препараты промывали в дистиллированной воде. Использовали антитела в разведении 1:50 и 1:100. Окрашивание коричневого цвета свидетельствовало о положительной реакции. Подсчёт клеток производили в 100 полях зрения, при этом определяли общее количество клеток в поле зрения и анализировали степень их окрашивания. Фон и неспецифическое окрашивание исключали, строго соблюдая условия и алгоритм протокола методики – температуру, pH, время. Для блокирования неспецифического окрашивания срезы в течение 20 минут инкубировали с неиммунной сывороткой, а уже затем инкубировали с первичными антителами. Для контроля и исключения артефактов при выполнении исследований часть препаратов обрабатывали дважды только неиммунной сывороткой.

Результаты. Проведенный анализ показал, что при фазово-контрастной микроскопии в мазках пристеночной слизи ДПК данной категории больных выявляются дендритные клетки, лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы и слущенные каёмчатые эпителиальные клетки. Макрофаги имели размеры до 20x25 мкм, большое количество фагосом в цитоплазме и чётко идентифицирующееся ядро, расположенное центрально. Поверхность макрофагов характеризовалась многочисленными инвагинациями, глубиной до 2-х мкм. Выявленные нейтрофилы имели ядра, состоящие из 3-х и более сегментов. В цитоплазме и на клеточной поверхности идентифицировались везикулы. В пристеночной слизи выявлены лимфоциты размерами до 10 мкм. Дендритные клетки достигали размеров 20x40 мкм, на поверхности имели выросты в количестве 4-6, ядро формы с конденсированным гетерохроматином и большое количество везикул в цитоплазме. Обращало на себя внимание наличие в пристеночной слизи ДПК слущенных конусовидных эпителиальных клеток, имеющих хорошо выраженную складчатую поверхность в виде гофре. Размеры клеток достигали 14

мкм в высоту и 5 мкм в основании. Апикальная часть эпителиоцитов была расширена, достигала до 6 мкм. Основание эпителиальных клеток было закругленно, ниже центрально расположенного ядра идентифицированы многочисленные гранулы.

Иммуногистохимические исследования биоптатов показали наличие интраэпителиальных лимфоцитов в слизистой оболочке ДПК (рис. 1).

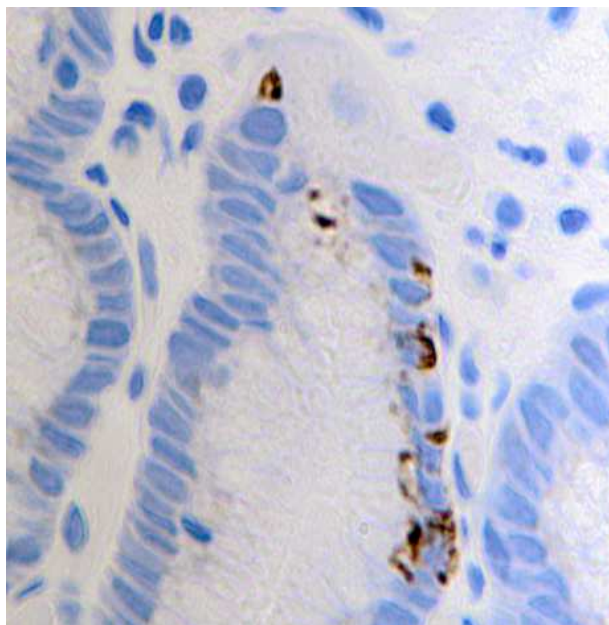


Рис. 1. Интраэпителиальные лимфоциты. Иммуная гистохимия. Микрофото. Ув.х 800.

При этом клетки лимфоцитарного дифферона были идентифицированы не только в эпителиальном пласте, но и в просвете ДПК, что подтверждает наши данные, полученные при изучении пристеночной слизи с помощью фазово-контрастной микроскопии.

С помощью иммуногистохимического анализа были выявлены ДК - CD68 в слизистой оболочке ДПК (рис. 2).

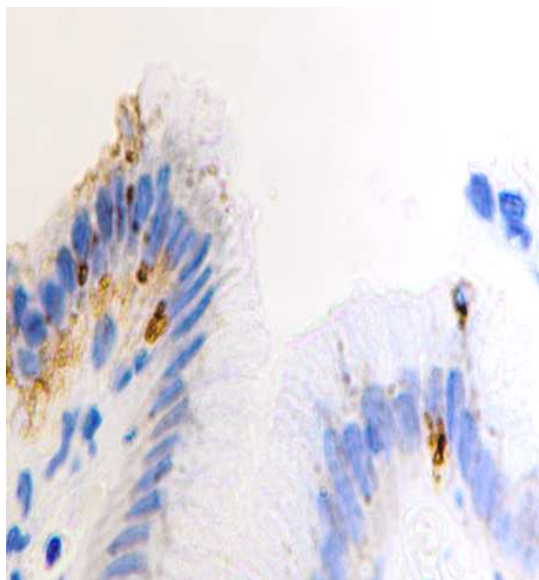


Рис. 2. Дендритные клетки CD68. Иммуногистохимия. Микрофото. Ув.х 800.

ДК Лангерганса локализовались в базальном слое эпителиальной пластинки в количестве 8–12. Клеточные отростки были разветвленными и имели различное направление. Характерной была их локализация в базальном слое эпителия в виде скоплений клеток, что свидетельствует об усиленной миграции ДК из эпителия. В толще собственной пластинки ДК было меньше, их отростки располагались в основном биполярно и были направлены к поверхности эпителия и к базальной мембране, что свидетельствует об активации их передвижения. В собственной пластинке наблюдалось значительное увеличение количества ДК клеток по сравнению с нормой, отражающее их интенсивный приток. Отростки ДК ориентировались по ходу соединительно-тканых волокон, что также служит признаком движения.

Обсуждение полученных результатов. Полученные в исследовании данные позволяют расширить имеющиеся представления о первом (мукозном) звене местного иммунного гомеостаза слизистой оболочки и роли межклеточных взаимодействий при формировании оральной толерантности. Согласно современным представлениям, в механизмах пищевой толерантности участвуют не только клетки иммунной системы слизистой оболочки тонкой кишки, решающая роль в ее развитии принадлежит процессу межклеточных взаимодействий Т-клеток с АГ-презентирующими клетками (АПК) и присутствию при этом взаимодействия ко-стимулирующих молекул [6]. Одним из уникальных представителей мукозального иммунитета, не зависимо от общей мукозальной системы, является субпопуляция интраэпителиальных Т-лимфоцитов, обнаруженных нами при фазово-контрастной микроскопии и с помощью методов иммунной гистохимии. К настоящему времени сформировалось представление об интраэпителиальных Т-лимфоцитах как о сторожевых клетках эпителиальных тканей (первой линии защиты), способных распознать и разрушить как антиген, в том числе пищевой, так и собственную эпителиальную клетку, стрессовое состояние которой достигло критического уровня, не совместимого с продолжением нормального функционирования [5, 8]. Важная роль в формировании энтеральной толерантности отводится и антиген-презентирующим клеткам, в частности, дендритным клеткам. Дендритные клетки захватывают антиген и после процессинга протеолитическими ферментами связывают антиген молекулами МНС класса I или II. Причем презентация антигена дендритными клетками (поглощение антигена, его внутриклеточный захват и расщепление с последующим транспортом) отличается от презентации другими антиген-презентирующими клетками, что подчеркивает уникальную роль незрелых дендритных клеток в индукции толерантности. Наличие дендритных клеток в пристеночной слизи свидетельствует о том, что антиген-представление происходит не только

на уровне внутриэпителиального барьера, а на его поверхности, в зоне действия первого звена иммунной защиты. Обильная миграция этих клеток на поверхность эпителиального пласта, выявленная нами при проведении исследования, их длительная персистенция, может служить ранним маркером пищевой гиперчувствительности.

Таким образом, полученные данные способствуют расширению представлений о роли межклеточных взаимодействий при пищевой гиперчувствительности, могут служить основой для дальнейшей разработки патогенетической терапии. Фазовоконтрастная микроскопия мазков, полученных из пристеночной слизи ДПК, может применяться для мониторинга состояния слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у детей при различных патологических процессах, сопровождающихся пищевой гиперчувствительностью.

Список литературы

1. Балаболкин И.И., Юхтина Н.В., Денисова С.Н. Пищевая аллергия. – Москва, 2006. – 44с.
2. Карпенко М.Н., Кирик О.В., Коржевский Д. Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство). Под ред. Д. Э.Коржевского. СпецЛит. – Спб., 2012 г. – С.110.
3. Патент РФ № 2011128509/15, 08.07.2011.
4. Первичная профилактика аллергии у детей / Согласительный документ Ассоциации детских аллергологов и иммунологов России. – М., 2010. – 72 с.
5. Рева Г.В., Толмачев В.Е., Первов Ю.Ю. Опыт проведения дентальной имплантации у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта на фоне контроля местного иммунного гомеостаза // Фундаментальные исследования. – 2013. - № 5. – С. 129-134.
6. Barbi E, Berti I, Longo G. Food allergy: from the of loss of tolerance induced by exclusion diets to specific oral tolerance induction // Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. – 2008. – Т. 2 - № 3. – P. 212-214.
7. Berin MC, Sampson HA. Mucosal immunology of food allergy // Curr Biol. – 2013. – Т. 6, - № 23. – P. 389-400.
8. Ruiter B, Shreffler WG. The role of dendritic cells in food allergy // J Allergy Clin Immunol. – 2012. - № 129. – P. 921-928.
9. Scurlock AM, Vickery BP, Hourihane JO, Burks AW. Pediatric food allergy and mucosal tolerance // Mucosal Immunol. – 2010. – Т. 3. - № 4. – P. 345-354
10. Steele L, Mayer L, Berin MC. Mucosal immunology of tolerance and allergy in the gastrointestinal tract // Immunol Res. – 2012. – Т. 54. - № 1. – P. 75-82.

Рецензенты:

Шапкина Л.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой педиатрии ФПК и ППС, иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО ВГМУ Минздравсоцразвития России, г. Владивосток.

Ни А.Н., д.м.н., профессор кафедры педиатрии ФПК и ППС, иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО ВГМУ Минздравсоцразвития России, г. Владивосток.