

Теоретична і експериментальна медицина

УДК: 616-018:616-06:618-019:616-091.816

РОЗПОДІЛ ІМУННИХ КЛІТИН CD68 ТА CD3 У ШИЙЦІ МАТКИ ЖІНОК ЗА НАЯВНОСТІ ІМУНОДЕФІЦИТУ ІНФЕКЦІЙНОГО ТА НЕІНФЕКЦІЙНОГО ГЕНЕЗУ

*Литвиненко М.В.**Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна*

Окремою когортою пацієнтів, які потребують пильної уваги лікарів, соціальних працівників є жінки з імунодефіцитними станами. Метою дослідження було визначення розподілу імунних клітин CD68 та CD3 у шийці матки жінок за наявності імунодефіциту інфекційного та неінфекційного генезу, а саме за наявності ВІЛ-інфекції, хронічного алкоголізму та їх комбінації. Групи дослідження були сформовані на підставі результатів розтинів 100 жінок репродуктивного віку по 25 випадків у кожній групі: група з наявністю ВІЛ-інфекцією, група хронічного алкоголізму, група комбінації ВІЛ-інфекції та алкоголізму, група порівняння. Проводили імуногістохімічне дослідження з моноклональними антитілами до CD68 та CD3. Під час дослідження встановлено, що розподіл імунних клітин CD68 та CD3 у шийці матки жінок за наявності імунодефіциту інфекційного та неінфекційного генезу характеризується зменшення CD68 у епітеліальному шарі обох груп ВІЛ-інфікованих жінок (до $(1,06 \pm 0,13)$ клітин/мм² для групи без алкоголізму та до $(1,09 \pm 0,11)$ клітин/мм² в групі при комбінації з алкоголізмом), у той час як в групі жінок, що зловживають алкоголем цей показник збільшився до $(1,96 \pm 0,15)$ клітин/мм² ($p < 0,05$). В стромі накопичення CD68-позитивних клітин має тенденцію до зменшення в усіх групах. Динаміка розподілу CD3-позитивних клітин у різних зонах шийки матки характеризується їх зменшенням в епітелії ВІЛ-інфікованих груп, у той час як у жінок, що зловживають алкоголем їх кількість збільшена ($p < 0,05$) до $(3,86 \pm 0,14)$ клітин/мм². Одночасно інфільтрація стромі усіх трьох груп з ВІС характеризується достовірним збільшенням CD3-позитивних клітин до $(8,13 \pm 0,79)$, $(9,89 \pm 0,57)$ та $(9,04 \pm 0,75)$ клітин/мм² для груп з ВІЛ-інфекцією, зловживанням алкоголем та комбінацією хронічного алкоголізму і ВІЛ-інфекції відповідно ($p < 0,05$). За результатами дослідження можна зробити висновок, що розподіл імунних клітин CD68 та CD3 у шийці матки жінок за наявності імунодефіциту інфекційного та неінфекційного генезу характеризується варіативністю в залежності від природи імунодефіциту.

Ключові слова: слизова шийки матки, імунна відповідь, ВІЛ-інфекція, алкоголізм, лімфоцити.



Цитуйте українською: Литвиненко МВ. Розподіл імунних клітин CD68 та CD3 у шийці матки жінок за наявності імунодефіциту інфекційного та неінфекційного генезу. Медицина сьогодні і завтра. 2022;91(2):6-12. <https://doi.org/10.35339/msz.2022.91.2.lmv>

Cite in English: Lytvynenko MV. Distribution of CD68 and CD3 immune cells in the cervix of women with infectious and non-infectious immunodeficiency. Medicine Today and Tomorrow. 2022;91(2):6-12. <https://doi.org/10.35339/msz.2022.91.2.lmv> [in Ukrainian].

Вступ

Вторинний імунодефіцитний стан (ВІС) характеризується набутим зниженням кількості та/або функції імунних клітин. Найпоширенішим типом ВІС є зниження рівня антитіл, що виникає внаслідок основного захворювання або як побічний ефект ліків. Як це не парадоксально, але імунодефіцити, спочатку віднесені до вторинних причин, можуть частково бути наслідком основного первинного імунодефіцитного стану [1; 2]. Як первинний, так і вторинний імунодефіцитні стани, можуть бути пов'язані з інфекціями [3; 4], імунною дисрегуляцією, аутоімунними розладами, лімфопроліферацією та злоякісними новоутвореннями, і може бути важко з'ясувати зв'язок між цими розладами в клінічних умовах [5]. Дослідження, присвячені початковим клінічним проявам підтвердженого імунодефіцитного стану, вказують, що більшість пацієнтів мали інфекцію в анамнезі. При цьому, якщо зосередитися та вивчати виключно прояви інфекції, то початкові ланки, що пов'язані з неінфекційним процесом та можуть привести до імунної дисрегуляції, не виявляються, та кількість таких пацієнтів невідома [5; 6]. Серед хвороб, які можуть призвести до розвитку ВІС, в Україні слід визначити суттєве поширення ВІЛ-інфекції та хронічного алкоголізму [7; 8]. Особливо небезпечним є комбінація цих двох хвороб. Відомо, що пацієнти з імунодефіцитними станами мають підвищений ризик розвитку злоякісних пухлин, зокрема жіночої статеві системи [9]. Незважаючи на успіхи в веденні передракових процесів шийки матки, патогенез неопластичної трансформації, роль імунної системи взагалі та її окремих елементів залишаються полем для досліджень [10; 11].

Враховуючи все вище наведене, ми вирішили визначити **метою** нашого

дослідження розподіл імунних клітин CD68 та CD3 у шийці матки жінок за наявності імунодефіциту інфекційного та неінфекційного генезу, а саме за наявності ВІЛ-інфекції, хронічного алкоголізму та їх комбінації.

Матеріал і методи

Групи дослідження були сформовані на підставі результатів розтинів 100 жінок репродуктивного віку від 20 до 40 років (середній вік при цьому становив 32,7 років) по 25 випадків у кожній групі: група з наявністю ВІЛ-інфекцією (ВІЛ-інфекція була верифікована за допомогою імуноферментного аналізу сироватки (ELISA) з підтвердженням вестерн-блоттингом); хронічного алкоголізму (на підставі анамнезу та встановлення алкогольного цирозу печені); група комбінації ВІЛ-інфекції та алкоголізму; група порівняння (складалася з осіб жіночої статі без наявності супутньої патології репродуктивних органів та будь-яких ознак алкогольної інтоксикації). Число лімфоцитів CD4 < 100 клітин/мкл для підтвердження ВІС визначено у перших трьох описаних групах. Тютюнопаління, використання контрацептивів, вік першого статевого акту, соматична патологія пов'язана (або не пов'язана) з вживанням алкоголю, кількість вагітностей при формуванні груп не враховувалися.

Отримані під час розтину фрагменти шийки матки було фіксовано в 10 % забуференому нейтральному розчині формаліну, після чого проводилась заливка парафіном. З підготовлених блоків було виготовлено зрізи завтовшки 5×10^{-6} м. Зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Оцінку ступеня інфільтрації власної пластинки слизової оболонки (ВПС) імунокомпетентними клітинами (лімфогістіоцитами) проводили напівкількісним методом від 0 до 3 балів (0 – немає, 1 – слабка, 2 – помірна, 3 – виражена інфільтрація).

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження проводилося непрямою імунопероксидазною реакцією з моноклональними антитілами (mAb) до CD68 та CD3 (компанія Thermo Scientific, США) [12]. Візуалізацію реакції проводили за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo Scientific, США). Підрахунок кількості CD68 та CD3 позитивних клітин проводився на 1×10^{-6} м² площі тканини [13]. Усі дослідження проведено відповідно до Гельсінської декларації, затверджено комісією з етики Одеського національного медичного університету (протокол № 3 від 17 жовтня 2011 р).

Статистична обробка проводилась за допомогою програми Microsoft Excel 2010 (США) з додатком Attestat 12.0.5. Оцінку вірогідності розбіжностей порівнюваних показників проводили з використанням t-критерію Стьюдента [14].

Усі значення було виражено як середні із урахуванням стандартної помилки середнього. Прийнятий рівень достовірних значення вважався $p < 0,05$.

Результати

Оцінка ступеня інфільтрації власної пластинки слизової оболонки шийки матки імунокомпетентними клітинами (табл. 1) показала нерівномірний розподіл для різних груп. Слід зазначити, що в групі з ВІЛ-інфекцією у 4,7% випадків була виявлена відсутність інфільтрації, тобто майже повна відсутність лімфоцитів. Оцінка ступеня інфільтрації власної пластинки слизової в досліджуваних групах виявила найбільшу кількість випадків тяжкої інфільтрації (44,5 %) у групі з хронічним алкоголізмом, а в групах з ВІЛ не виявлено жодного такого випадку.

При вивченні розподілу клітин, що експресують CD3, виявлена закономірність, яка представлена у таблиці 2.

Таблиця 1. Оцінка ступеня інфільтрації власної пластинки слизової оболонки шийки матки імунокомпетентними клітинами, %.

Ступінь інфільтрації	Група			
	ВІЛ-інфекція	Хронічний алкоголізм	Хронічний алкоголізм і ВІЛ-інфекція	Контрольна
Відсутність інфільтрації	4,7	0	0	0
Слабка інфільтрація	60,2	12,9	42,9	87,5
Помірна інфільтрація	35,1	42,6	34,1	9,1
Виразена інфільтрація	0	44,5	26,1	3,4
Всього	100	100	100	100

Таблиця 2. Розподіл CD3-позитивних клітин у різних зонах шийки матки.

Зона шийки матки	Група			
	ВІЛ-інфекція	Хронічний алкоголізм	Хронічний алкоголізм і ВІЛ-інфекція	Контрольна
Епітелій	2,09±0,11*	3,86±0,14*	3,02±0,10	3,41±0,13
Субепітеліальна зона	5,73±0,32*	6,87±0,23*	5,46±0,29*	9,73±0,92
Строма	8,13±0,79*	9,89±0,57*	9,04±0,75*	6,79±0,61
Залозиста зона	3,10±0,24	3,66±0,11*	3,42±0,29	2,81±0,32

Примітка: * – наявність достовірної відмінності з контрольною групою ($p < 0,05$).

При вивченні розподілу клітин, що експресують CD68, виявлена наступна закономірність (табл. 3).

суттєво менше, що, на нашу думку, є прогалиною у розумінні пошкодження тканин при ІДС, власно чому нами

Таблиця 3. Розподіл CD68-позитивних клітин у різних зонах шийки матки

Зона шийки матки	Група			
	ВІЛ-інфекція	Хронічний алкоголізм	Хронічний алкоголізм і ВІЛ-інфекція	Контрольна
Епітелій	1,06±0,13*	1,96±0,15*	1,09±0,11*	1,52±0,14
Субепітеліальна зона	2,31±0,31*	3,80±0,20*	2,42±0,25*	4,75±0,76
Строма	6,83±0,91*	6,92±0,36*	6,84±0,69	7,44±0,51
Залозиста зона	0,98±0,09*	4,41±0,39*	1,38±0,24*	5,971±0,55

Примітка: * – наявність достовірної відмінності з контрольною групою (p<0,05).

Обговорення

Як відомо, характер запальної відповіді та її морфологічні фази визначаються сукупністю клітинних елементів органу, при цьому однією з найважливіших компонентів є система фагоцитуючих мононуклеарів [15]. Ступінь активності цих клітин забезпечує активність захисту та фагоцитозу, а також модуляцію інших клітинних типів, відповідальних імунний гомеостаз тканини [4; 5]. Проведене ІГХ дослідження для виявлення клітин, які експресують CD68, дозволило визначити наявність моноцитів (зокрема моноцитарних фагоцитів), циркулюючих макрофагів та тканинних макрофагів, а також провести кількісний аналіз, що дозволяє оцінити стан імунної готовності тканини відповідати на пошкодження різного генезу [12].

В той же час CD3 (кластер диференціювання 3) є білковим комплексом і Т-клітинним корецептором, який бере участь в активації як цитотоксичних Т-клітин (CD8 позитивні Т-клітини), так і Т-хелперних клітин (CD4 позитивні Т-клітини). При цьому, якщо співвідношення CD8 та CD4 є найбільш описаним при імунодефіцитних станах, цей кластер диференціювання описано

обрано дослідження присутності у тканинах саме CD3 [15].

При вивченні тканини шийки матки наявність зрілих макрофагів шляхом оцінки експресії CD68 (клітини з цитоплазматичним забарвленням з помірною інтенсивністю) визначена в усіх досліджуваних зразках. Початкове значення для CD68 у групі порівняння було дуже низьким як в епітелії, так і в стромі ([1,52±0,14] клітин/мм² і [7,44±0,51] клітин/мм² відповідно). В обох групах ВІЛ-інфікованих жінок спостерігається достовірне (p<0,05) зменшення CD68 у епітеліальному шарі (до [1,06±0,13] клітин/мм² для групи без алкоголізму та до [1,09±0,11] клітин/мм² в групі при комбінації з алкоголізмом, у той час, як в групі жінок, що зловживають алкоголем, цей показник достовірно збільшився до [1,96±0,15] клітин/мм² (p<0,05). При тому, що в стромі накопичення CD68-позитивних клітин мало тенденцію до зменшення в усіх групах.

Динаміка розподілу CD3-позитивних клітин у різних зонах шийки матки характеризується їх зменшенням в епітелії ВІЛ-інфікованих груп. При цьому у жінок, що зловживають алкоголем, їх кількість збільшена (p<0,05) до [3,86±0,14] клітин/мм² ([3,41±0,13] клітин/мм²

в контрольній групі). Але у той же час інфільтрація стромы усіх трьох досліджуваних груп характеризується достовірним збільшенням CD3-позитивних клітин до $[8,13 \pm 0,79]$, $[9,89 \pm 0,57]$ та $[9,04 \pm 0,75]$ клітин/мм² для груп з ВІЛ-інфекцією, хронічним алкоголізмом та комбінацією хронічного алкоголізму і ВІЛ-інфекції відповідно ($p < 0,05$).

Таким чином, ми можемо стверджувати, що ВІС різного генезу характеризуються неоднаковими тканинними змінами у шийці матки, що відповідає раніше опублікованим даним [16; 17]. Хронічний алкоголізм характеризується помітним збільшенням кількості різноманітних модуляторів запалення [18]. Наявність ВІЛ-інфекції веде до різнонаправлених змін, пов'язаних зі зменшенням кількості клітин CD68. Ведення пацієнтів з імунодефіцитами потребує міждисциплінарного підходу, необхідного для забезпечення ранньої діагностики та відповідного лікування патологічних змін шийки матки за наявності ВІС. Таким чином, слід визначити, що значна варіабельність проявів імунодефіцитного стану як наслідку дефіциту антитіл (спочатку пов'язаним із імунодефіцитним станом через основне захворювання та застосуванням терапевтичних засобів для лікування злоякісних новоутворень, імунних та аутоімунних розладів) одночасно може бути наслідком первинної імунної дисрегуляції.

Література

1. Ballou M, Sanchez-Ramon S, Walter JE. Secondary Immune Deficiency and Primary Immune Deficiency Crossovers: Hematological Malignancies and Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2022;13:928062. DOI: 10.3389/fimmu.2022.928062. PMID: 35924244.
2. Rehm J, Probst C, Shield KD, Shuper PA. Does alcohol use have a causal effect on HIV incidence and disease progression? A review of the literature and a modeling strategy for quantifying the effect. *Popul Health Metr.* 2017;15(1):4. DOI: 10.1186/s12963-017-0121-9. PMID: 28183309.
3. Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res.* 2015;37(2):159-70. PMID: 26695755.

Висновки

Розподіл імунних клітин CD68 та CD3 у шийці матки жінок за наявності імунодефіциту інфекційного та неінфекційного генезу характеризується варіативністю в залежності від природи імунодефіциту. Він характеризується зменшенням CD68 у епітеліальному шарі обох групах ВІЛ-інфікованих жінок (до $[1,06 \pm 0,13]$ клітин/мм² для групи без алкоголізму та до $[1,09 \pm 0,11]$ клітин/мм² в групі при комбінації з алкоголізмом), у той час, як в групі жінок з хронічним алкоголізмом цей показник збільшився до $[1,96 \pm 0,15]$ клітин/мм² ($p < 0,05$). В стромі накопичення CD68-позитивних клітин має тенденцію до зменшення в усіх групах.

Динаміка розподілу CD3-позитивних клітин у різних зонах шийки матки характеризується їх зменшенням в епітелії груп жінок з ВІЛ-інфекцією, у той час як у жінок групи з хронічним алкоголізмом їх кількість збільшена ($p < 0,05$) до $[3,86 \pm 0,14]$ клітин/мм². Одночасно інфільтрація стромы усіх трьох груп з ВІС характеризується достовірним збільшенням CD3-позитивних клітин до $[8,13 \pm 0,79]$, $[9,89 \pm 0,57]$ та $[9,04 \pm 0,75]$ клітин/мм² для груп жінок з ВІЛ-інфекцією, хронічним алкоголізмом та комбінацією хронічного алкоголізму з ВІЛ-інфекцією відповідно ($p < 0,05$).

Автор декларує відсутність **конфлікту інтересів** щодо цього дослідження.

4. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;386:2287-323. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00128-2. PMID: 26364544.
5. Thalhammer J, Kindle G, Nieters A, Rusch S, Seppänen MRJ, Fischer A, et al. Initial presenting manifestations in 16,486 patients with inborn errors of immunity include infections and noninfectious manifestations. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(5):1332-41.e5. DOI: 10.1016/j.jaci.2021.04.015. PMID: 33895260.
6. Bello B, Moultrie H, Somji A, Chersich MF, Watts C, Delany-Moretlwe S. Alcohol use and sexual risk behaviour among men and women in inner-city Johannesburg, South Africa. *BMC Public Health*. 2017;17(Suppl 3):548. DOI: 10.1186/s12889-017-4350-4. PMID: 28832283.
7. Fritz K, Morojele N, Kalichman S. Alcohol: the forgotten drug in HIV/AIDS. *Lancet*. 2010;376:398-400. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60884-7. PMID: 20650516.
8. Woolf-King SE, Maisto SA. Alcohol use and high-risk sexual behavior in subSaharan Africa: a narrative review. *Arch Sex Behav*. 2011;40(1):17-42. DOI: 10.1007/s10508-009-9516-4. PMID: 19705274.
9. Lytvynenko MV, Narbutova TY, Vasylyev VV, Gargin VV. Indicators of proliferative activity of endometrium in women with immunodeficiency. *Azerbaijan Med J*. 2021(2):53-60. Available at: <https://repo.odmu.edu.ua/xmlui/handle/123456789/11781>
10. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011;128(4):927-35. DOI: 10.1002/ijc.25396. PMID: 20473886.
11. Lytvynenko M, Shkolnikov V, Bocharova T, Sychova L, Gargin V. Peculiarities of proliferative activity of cervical squamous cancer in HIV infection. *Georgian Med News*. 2017;(270):10-5. PMID: 28972476.
12. Dabbs DJ, Thompson LDR. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*, Expert Consult: Online and Print, 4e 4th Edition, 2014, 960 p. Available at: <https://is.gd/qfH2ON>
13. Gargin V, Radutny R, Titova G, Bibik D, Kirichenko A, Bazhenov O. Application of the computer vision system for evaluation of pathomorphological images. *Proceedings of the 2020 IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO)*. P. 469-73. DOI: 10.1109/ELNANO50318.2020.9088898.
14. Myers JL; Well AD. *Research Design and Statistical Analysis* (2nd ed.). USA: Lawrence Erlbaum Associates; 2003. 508 p.
15. Nicol AF, Fernandes AT, Grinsztejn B, Russomano F, E Silva JR, Tristao A, et al. Distribution of immune cell subsets and cytokine-producing cells in the uterine cervix of human papillomavirus (HPV)-infected women: influence of HIV-1 coinfection. *Diagn Mol Pathol*. 2005;14(1):39-47. DOI: 10.1097/01.pas.0000143309.81183.6c. PMID: 15714063.
16. Slama J, Adamcova K, Dusek L, Sosna O, Cibula D. Umbilication is a strong predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17(3):303-7. DOI: 10.1097/LGT.0b013e31826f2532. PMID: 23486068.
17. Burke L. Comment on "umbilication is a strong predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia". *J Low Genit Tract Dis*. 2014;18(1):E25. DOI: 10.1097/LGT.0b013e3182a66351. PMID: 23486068.

18. Thygesen LC, Mikkelsen P, Andersen TV, Tonnesen H, Juel K, Becker U, Gronbaek M. Cancer incidence among patients with alcohol use disorders – long-term follow-up. *Alcohol Alcohol.* 2009;44(4):387-91. DOI: 10.1093/alcalc/agg034. PMID: 19491282.

Lytvynenko M.V.

DISTRIBUTION OF CD68 AND CD3 IMMUNE CELLS IN THE CERVIX OF WOMEN WITH INFECTIOUS AND NON-INFECTIOUS IMMUNODEFICIENCY

Women with immunodeficiency conditions are a separate cohort of patients who need the close attention of doctors and social workers. The aim of the study was to determine the distribution of CD68 and CD3 immune cells in the cervix of women with infectious and non-infectious immunodeficiency, namely, HIV infection, chronic alcoholism and their combination. Research groups were formed based on the results of autopsies of 100 women of reproductive age, 25 cases in each group: a group with HIV infection, a group with chronic alcoholism, a group with a combination of HIV infection and alcoholism, and a comparison group. An immunohistochemical study was performed with monoclonal antibodies to CD68 and CD3. During the research it was established that the CD68 and CD3 immune cells distribution in the cervix of women with infectious and non-infectious immunodeficiency is characterized by a decrease in CD68 in the epithelial layer of both groups of HIV-infected women (up to (1.06 ± 0.13) cells/mm² for the group without alcoholism and up to (1.09 ± 0.11) cells/mm² in the group in combination with alcoholism), while in the group of women who abuse alcohol, this indicator increased to (1.96 ± 0.15) cells/mm² ($p < 0.05$). In the stroma, the accumulation of CD68-positive cells tends to decrease in all groups. The dynamics of the distribution of CD3-positive cells in different zones of the cervix is characterized by their decrease in the epithelium of HIV-infected groups, while in women who abuse alcohol their number is increased ($p < 0.05$) to (3.86 ± 0.14) cells/mm². Simultaneously, stroma infiltration of all three groups with HIV is characterized by a significant increase in CD3-positive cells to (8.13 ± 0.79) , (9.89 ± 0.57) and (9.04 ± 0.75) cells/mm² for groups with HIV infection, abuse alcohol and the combination of chronic alcoholism and HIV infection, respectively ($p < 0.05$). Based on the results of the study, it can be concluded that the CD68 and CD3 immune cells distribution in the cervix of women with infectious and non-infectious immunodeficiency is characterized by variability depending on the nature of the immunodeficiency.

Keywords: *cervical mucosa, immune response, HIV-infection, alcoholism, lymphocytes.*

Надійшла до редакції 22.05.2022

Відомості про автора

Литвиненко Маріанна Валеріївна – кандидат медичних наук, доцент кафедри нормальної та патологічної клінічної анатомії Одеського національного медичного університету.

Адреса: Україна, 65082, м. Одеса, Валіховський пров., 2.

E-mail: lytvynenko_marianna@ukr.net

ORCID: 0000-0001-9594-3412.