

Rinosinuzitele recidivante și cronice la copii: aspecte imunohistochemice

M. Maniuc¹, L. Șaptefrați², P. Ababii¹, D. Chirtoca¹

¹Catedra Otorinolarinologie, USMF „Nicolae Testemițanu”

²Catedra Histologie, Citologie și Embriologie, USMF „Nicolae Testemițanu”

Recurrent and Chronic Rhinosinusitis: Immunohistochemical Aspects

The main goal of this study was the detection of T-lymphocytes (CD3+total) and their subtypes (CD4+; CD8+) in patients with chronic and recurrent sinusitis treated by functional endoscopic surgery and supervised treatment of the physiopathological inflammatory processes in chronic sinusitis. Immunohistochemical examinations were performed endoscopically on a group of 10 children with chronic and recurrent sinusitis. All of the children treated surgically showed the presence of T-lymphocytes and their subtypes.

Key words: chronic and recurrent rhinosinusitis, immunohistochemistry, lymphocytes T.

Рецидивирующие и хронические риносинуситы у детей: иммуногистохимические аспекты

Данное исследование имело целью выявить лимфоциты T(CD3+ total) и их субгруппы (CD4+; CD8+) у детей с рецидивирующими и хроническими синуситами, у которых были произведены хирургические эндоскопические операции. Иммуногистохимическое исследование было произведено у 10 детей с выявлением разных типов лимфоцитов T.

Ключевые слова: рецидивирующие и хронические риносинуситы, иммуногистохимия, лимфоциты T.

Introducere

Sinuzitele paranasale recidivante și cronice la copii reprezintă entități patologice destul de frecvente în practica cotidiană. Afecțiunile inflamatorii ale sinusurilor paranasale, în general, și în particular rinosinuzita recidivantă și cronică la copii desemnează un capitol dificil și la vârsta copilăriei se atestă cu o frecvență de la 18-30% până la 38-42% [1, 5, 6].

Histopatologia a ridicat și continuă să ridice numeroase probleme în practica medicală. Având în vedere numărul mare de rezultate discutabile sau neconcordanțe cu datele clinice și cu evoluția afecțiunii la bolnavi, metodele diagnosticului microscopic s-au modernizat de-a lungul timpului. Astfel, au fost parcurse mai multe etape: morfologică, histogenetică, histochemică și, în perioada actuală – imunohistochemică.

De la stabilirea principiilor generale și standardizarea metodelor până la aplicarea în practică a imunohistochemiei au trecut peste 25 de ani. Doar după 1990 imunohistochemia a fost aplicată pe scară largă în diagnosticare [2, 3]. Spre deosebire de metodele morfologice și histochemice, cele specifice imunohistochemiei impun prelucrarea primară standardizată, selecția adecvată a cazurilor și a metodelor de lucru și, nu în ultimul rând, interpretarea bazată pe datele cert demonstrate în literatură [4, 5, 6].

Secțiunile colorate imunohistochemic nu oferă diagnosticul printr-o reacție de culoare. În prezent sunt bine caracterizați numeroși antigeni celulari și anticorpi specifici.

Imunohistochemia reprezintă o metodă de diagnosticare ce combină tehnicile histologice cu cele imunologice și biochimice, cu scopul de a identifica componente tisulare specifice printr-o reacție de tip antigen-anticorp, vizualizată cu o substanță revelatoare. Metodă adaptată identificării antigenilor în celule și în țesuturi, bazată pe interacțiunea

dintre antigen și anticorp. Exploatează legarea anticorpului de antigenul specific, vizualizat prin reacția de culoare la nivelul microscopiei optice. Imunohistochemia permite evaluarea distribuției și a localizării unor epitopi într-o celulă sau țesut [6, 7, 8].

Este cunoscut rolul primordial al factorului infecțios în etiologia procesului inflamator din sinusurile paranasale, dar menționăm că importanța factorului alergic în evoluția clinică a acestei maladii la copii, la moment, este subestimată. Orice proces patologic care implică ostiumul sau epiteliul anizomorf ciliat, poate conduce la o patologie a sinusului. Edemul mucoasei provoacă obstrucția ostiumului și a complexului ostiomeatal, inhibând drenarea sinusurilor, ceea ce generează tulburări de ventilare ale lor. Spațiul închis hipoventilat conduce la disfuncția ciliară, transsudarea lichidului în spațiul intracelular și, ca urmare, la îngroșarea și la edemațierea mucoasei sinusului. În aceste condiții, apare o inflamație cronică, care dereglează procesele de collagenogeneză și de collagenoliză, având drept consecință sporirea grosimii stratului situat sub membrana bazală. Rolul acestor remodelări tisulare, la pacienții cu sinuzite paranasale și cronice, rămâne deocamdată incert [3, 5, 8, 9]. Astfel, scopul studiului prezent constă în explorarea naturii acestor modificări, cu analiza datelor cantitative și calitative obținute.

Scopul cercetării determinarea stării mucoasei pituitare în regiunea complexului ostiomeatal la pacienții din loturile de studiu prin investigație imunohistochemică.

Material și metode

Materialul a fost preluat de la pacienții de la Spitalului Clinic Republican pentru Copii „Em. Coțaga”, pe parcursul anilor 2005-2008. În lotul de studiu au fost incluși 10 pacienți (6 băieți și 4 fete), cu sinuzite paranasale cronice, supuși

tratamentului chirurgical endoscopic. Lotul de control a fost format din 5 pacienți (2 băieți, 3 fete), fără patologia inflamatorie rinosinuzală recidivantă sau cronică, dar cu diagnosticul de deviație septală, supuși intervenției chirurgicale de septoplastie. Vârsta pacienților din ambele loturi a fost cuprinsă între 13 și 17 ani. La pacienții din lotul de studiu mucoasa a fost preluată din regiunea procesului uncinat și de pe bula etmoidală. La pacienții lotului de control biopsiile au fost preluate din regiunea cornetului inferior cu consimțământul rudelor apropiate ale pacienților.

Prelucrarea țesuturilor studiate

Țesuturile prelevate au fost fixate în soluție de formalină neutră tamponată 10% timp de 24 de ore, ulterior dehidratate și incluzionate în parafină. După aceea au fost efectuate secțiuni în serie de grosimea 5 mcm. Au fost utilizate două colorații histologice ale secțiunilor: colorarea panoptică cu hematoxilina și cu eozină și colorarea cu albastru de toluidină, pentru evidențierea mastocitelor.

Tehnica imunohistochimică

Examenul imunohistochimic a fost efectuat utilizând tehnica LSAB (LSAB2 și LSAB+, Dako). Blocarea peroxidazei endogene a fost efectuată cu soluție de apă oxigenată de 3%. A fost utilizată următoarea garnitură de anticorpi monoclonali: anti-CD3 (F7.2.38, N-RTU, Dako), anti-CD4 (1F6, Vector Laboratories), anti-CD8 (C8/144B, Dako), anti-CD19 (LE-CD19, Dako), anti-plasmocite (VS38c, Dako) și anti-CD68 (KP1, Dako), pentru detectarea respectiv a limfocitelor T, a limfocitelor T-helperi, a limfocitelor T-supresori, a limfocitelor B, a plasmocitelor și a macrofagelor. Pentru evidențierea imunohistochimică a fiecărui antigen au fost respectate protocoalele lor de lucru. Controlul negativ al secțiunilor a fost inclus în fiecare investigație imunohistochimică.

Evaluarea cantitativă

Secțiunile colorate cu albastru de toluidină au fost utilizate pentru stabilirea numărului de mastocite în lamina proprie a mucoasei. Numărarea a fost efectuată cu ajutorul ocularului microscopic, care conținea o rețea din 10×10 pătrate. Latura reticulului la amplificarea $\times 400$ era 0,2 mm, astfel suprafața lui totală era 0,04 mm ($0,2 \times 0,2$ mm). Calcularea a mastocitelor pe 25 de astfel de rețele a alcătuit numărul lor pe suprafața de 1 mm² a laminei proprii ($0,04$ mm² \times 25 = 1 mm²). În aceeași manieră a fost calculat numărul de limfocite T, T-helperi, T-supresori, limfocite B, plasmocite și macrofage.

Prelucrarea statistică a valorilor cantitative a fost precedată de calculul mediei aritmetice (M) și a erorii medii aritmetice (m). Compararea variabilelor în diferite grupuri independente s-a efectuat prin intermediul criteriului t-Student.

Rezultatele examenului imunohistochimic

La fiecare pacient, de regulă, au fost depistate modificări patologice similare, caracteristice procesului inflamator cronic. Epiteliul fragmentelor studiate era de tip anizomorf

prismatic ciliat, identic cu epiteliul căilor respiratorii (fig. 1). În majoritatea secțiunilor, epiteliul era intact în pofida reacției inflamatorii, uneori destul de pronunțată, din lamina proprie a mucoasei. Remarcăm depunerile de collagen sub membrana bazală a epiteliului care, în majoritatea cazurilor, atingeau grosimi considerabile (fig. 2). Rareori a fost observată participarea epiteliului în procesul inflamator, manifestată prin detașarea lui de la membrana bazală. Infiltrarea epiteliului cu celule inflamatorii a fost observată rar. Lamina proprie a mucoasei era edematoasă, cu focare de infiltrație limfomononucleară (fig. 3). Vasele sangvine ale microcirculației frecvent erau congestionate, uneori au fost depistate hemoragii prin diapedeză, vasculită, mai rar tromboză vasculară (fig. 4). Integritatea glandelor submucoase era păstrată, rareori erau dilatate cistic, cu mase amorfe de mucus și cu epiteliu descuamat în lumen și inflamație cronică periglandulară. Ductele excretorii glandulare nu prezentau dilatări.

Mastocitele erau situate atât în lamina proprie a mucoasei, cât și în submucoasă în teritoriul interglandular (fig. 5). Remarcăm că mastocitele submucoasei erau mai degranulate decât cele din lamina propria (fig. 5, 6). În apropierea focarelor de infiltrație limfohistiocitară, cât și în interiorul lor, au fost observate puține mastocite, de obicei, degranulate. Numărul de mastocite era mult mai mare la pacienții cu sinuzite cronice ($32,1 \pm 7,0$), în comparație cu pacienții din lotul de control ($9,4 \pm 1,7$) (tab. 2). În două cazuri, la pacienții cu sinuzite cronice, acest număr atinge valori foarte înalte.

Investigația imunohistochimică a elucidat variații considerabile în distribuția și în numărul celulelor imunocompetente. Astfel, limfocitele T erau situate cu precădere în ariile superficiale ale laminei proprii (fig. 7). Numărul de limfocite T la pacienții cu sinuzite cronice era semnificativ mai mare ($93,6 \pm 5,0$), în comparație cu pacienții din lotul de control ($21,4 \pm 4,2$) (tab. 1). Remarcăm că această creștere se datorează, mai ales, sporirii numărului de T-helperi (limfocite T CD4 pozitive) care, la pacienții cu sinuzite cronice, alcătuia $60,4 \pm 5,4$, comparativ cu pacienții din lotul de control – $9,8 \pm 2,5$ (tab. 1). În contrariu, numărul de limfocite T-supresori (limfocite T CD8 pozitive), la pacienții cu sinuzite cronice, s-a majorat moderat ($12,1 \pm 2,0$), comparativ cu pacienții din lotul de control ($3,8 \pm 1,2$) (tab. 1). Aceste date atestă faptul că raportul limfocitelor T-helperi/T-supresori, la pacienții cu sinuzite cronice, este semnificativ mai mare decât la pacienții din lotul de control. Limfocitele B (CD19 pozitive) erau localizate, în special, în straturile profunde ale laminei proprii a mucoasei, la limita cu submucoasa, în jurul vaselor microcirculației (fig. 8). Numărul lor era semnificativ mai mare la pacienții cu sinuzite cronice ($60,9 \pm 4,1$), decât la acei din lotul de control ($20,8 \pm 3,6$). Plasmocitele aveau o distribuție mai mult superficială (fig. 9) (tab. 1). Numărul lor la pacienții cu sinuzite cronice alcătuia $44,1 \pm 3,1$, comparativ cu pacienții din lotul de control, unde numărul era $3,6 \pm 0,5$. Remarcăm o creștere esențială a numărului de macrofage în lamina proprie a mucoasei la pacienții cu sinuzite cronice ($124,1 \pm 12,6$) comparativ cu pacienții lotului de control ($17,4 \pm 3,8$) (tab. 2). La pacienții cu sinuzite cronice frecvent

Tabelul 1

Numărul limfocitelor T CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ și plasmocitelor pe 1 mm², lamina propria a mucoasei

Entitate relevantă	Limfocite T CD3+	Limfocite T CD4+	Limfocite T CD8+	Limfocite B CD19+	Plasmocite
Pacienți cu sinuzite cronice (n = 9)	93,6±5,0	60,4±5,4	12,1±2,0	60,9±4,1	44,1±3,1
Lotul de control (n = 5)	21,4±4,2	9,8±2,5	3,8±1,2	20,8±3,6	3,6±0,5
Criteriul Student	28,72	24,10	9,84	18,97	38,47
P	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001

Tabelul 2

Numărul mastocitelor și macrofagelor pe 1 mm², lamina propria a mucoasei

Entitate relevantă	Mastocite	Macrofage CD68+
Pacienți cu sinuzite cronice (n = 10)	93,6±5,0	60,4±5,4
Lotul de control (n = 5)	21,4±4,2	9,8±2,5
Criteriul Student	9,24	23,72
P	P<0,001	P<0,001

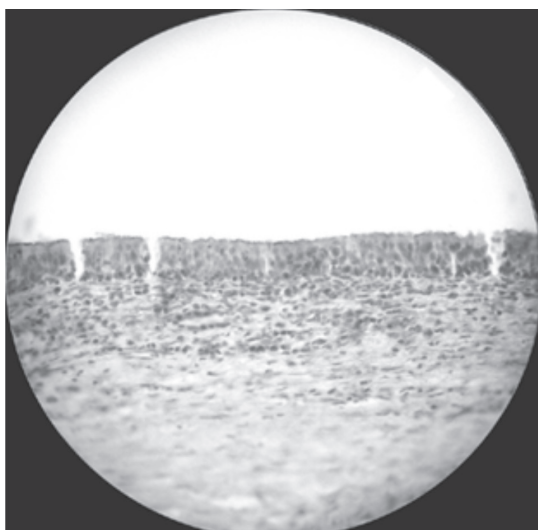


Fig. 1. Aspectul general al mucoasei la pacienții cu sinuzite cronice (hematoxilină și eozină, × 400).

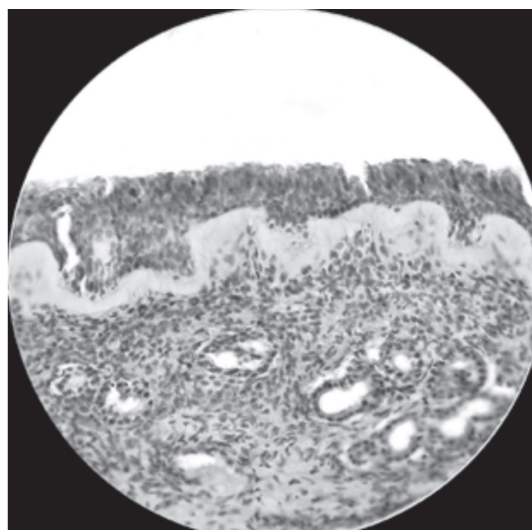


Fig. 2. Depuneri de colagen sub membrana bazală a epitelului la pacienții cu sinuzite cronice (HE, x 400).

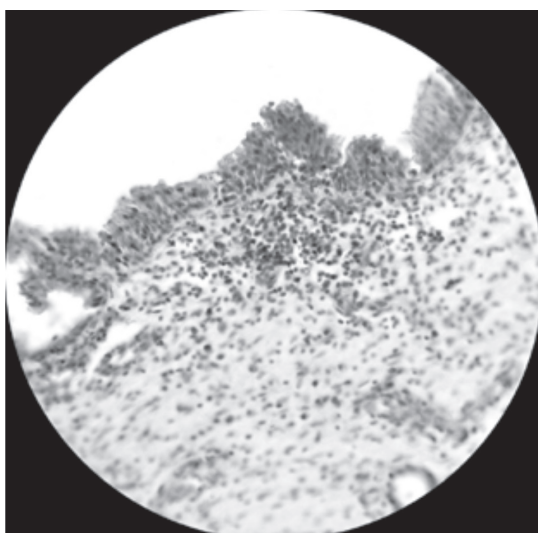


Fig. 3. Infiltrație limfohistiocitară în lamina propria a mucoasei la pacienții cu sinuzite cronice (HE, × 400).

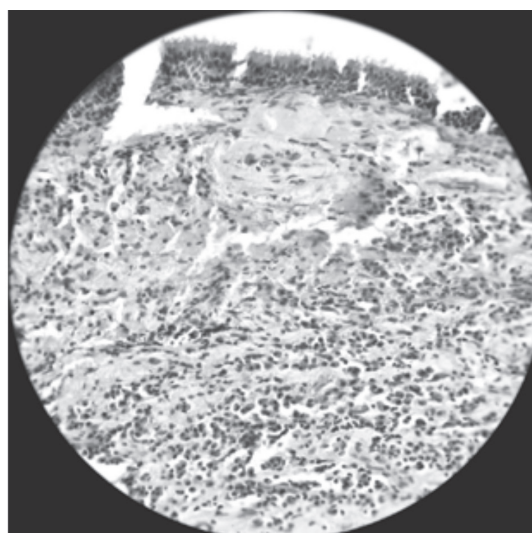


Fig. 4. Hemoragii și tromboză vasculară în lamina propria a mucoasei la pacienții cu sinuzite cronice (HE, x 400).

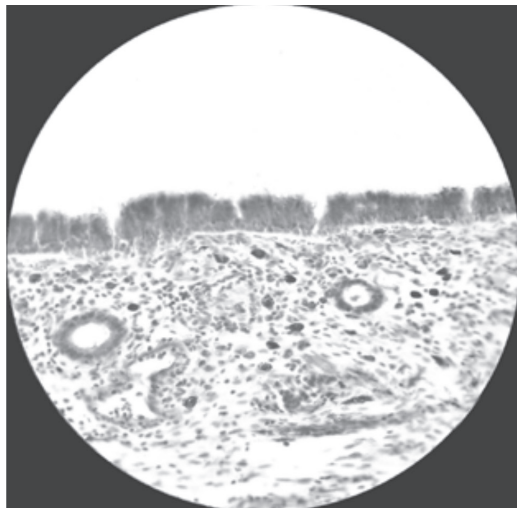


Fig. 5. Mastocite cu grad moderat de degranulare în corion și în submucoasă la pacienții cu sinuzite cronice (albastru de toluidină, $\times 400$).

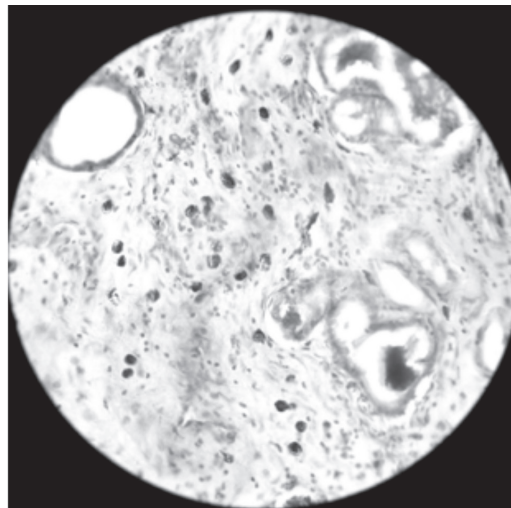


Fig. 6. Mastocite cu grad mediu de degranulare în submucoasa pacienților cu sinuzite cronice (albastru de toluidină, $\times 400$).

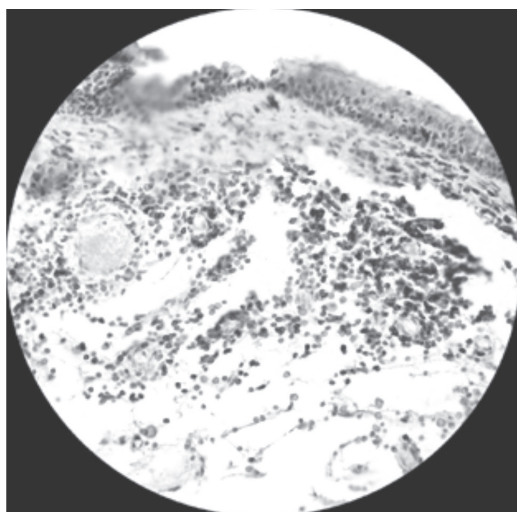


Fig. 7. Limfocite T CD3 pozitive în ariile superficiale ale lamina propria la pacienții cu sinuzite cronice (AniCD4+, $\times 400$).

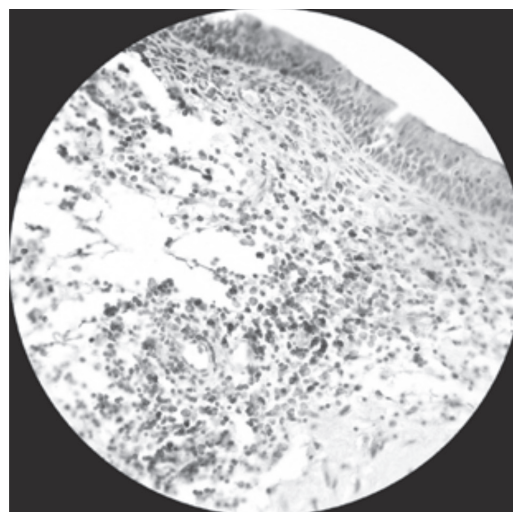


Fig. 8. Limfocite T CD19 pozitive în ariile profunde ale lamina propria la pacienții cu sinuzite cronice (AniCD19+, $\times 400$).

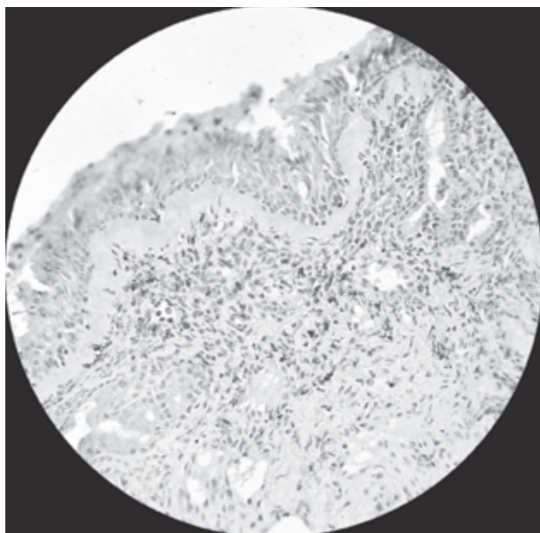


Fig. 9. Plasmocite în ariile superficiale ale corionului la pacienții cu sinuzite cronice (Aniplasmocite, $\times 400$).

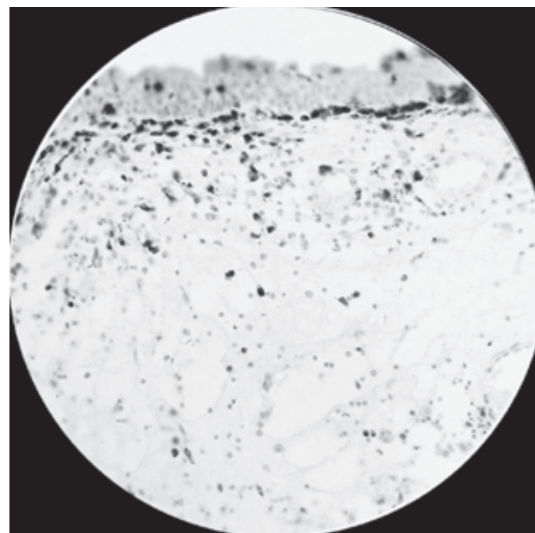


Fig. 10. Amplasarea macrofagelor sub depunerile de collagen ale membranei bazale, după tipul „epitelioid”. Infiltrarea epiteliului cu macrofage la pacienții cu sinuzite cronice (AniCD19+, $\times 400$).

a fost observată amplasarea macrofagelor sub depunerile de colagen ale membranei bazale după tipul „epitelioid” (fig. 10), adică în rânduri care mimează celulele epitelului. Un număr mare de macrofage infiltrau epitelul anizomorf ciliat la acești pacienți (fig. 10).

Concluzie

Studiul imunohistochimic atestă modificări patologice, caracteristice procesului inflamator cronic ce se manifestă prin variații considerabile în distribuția și în numărul celulelor imunocompetente. Limfocitele T au o importanță deosebită în fiziopatologia sinuzitelor recidivante și cronice, precum, în particular, limfocitele T CD4+ participă activ în procesele de inițiere și în reglarea procesului de inflamație.

Bibliografie

1. Bhattacharyya N., Kun Hee Lee. Chronic Recurrent Rhinosinusitis: Disease Severity and Clinical Characterization. *Laryngoscope*, 2005; 115: 306–310.
2. Kim Tae., Sang Lee., Heung Lee. D2- 40 Immunohistochemical Assessment of Lymphangiogenesis in Normal and Edematous Sinus Mucosa and Nasal Polyp. *Laryngoscope*, 2007, March; 117: 442–446.

3. Meltzer E., Hamilos D., Hadley J., Lanza D. Supplement to the journal of Allergy and Clinical Immunology, December 2004; 114(6): 156- 212.
4. Myller J., Torkkeli T., Heikkinen J. Effect of endoscopic sinus surgery on antral mucociliary clearance. *Rhinology*, December 2006; 44: 193-196.
5. Sarafoleanu C. *Rinologia*. Editura Medicală, București, 2003, 592 p.
6. Smart A., Slavin Raymond G. Rhinosinusitis and pediatric asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2005; 25: 67-82.
7. Sobol S., Manoukian J. Inflammation and Remodeling of the Sinus Mucosa in Children and Adults With Chronic Sinusitis. *Laryngoscope*, March 2003; 113: 410–414.
8. Zacharisen M., Casper R. Pediatric Sinusitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2005; 25: 313-332.
9. Berger G., Hammel I., Berger R. Histopathology of the Inferior Turbinate With Compensatory Hypertrophy in Patients With Deviated Nasal Septum. *Laryngoscope*, December 2000; 110: 2100-2105.

Polina Ababii, dr., asistent universitar

Catedra Otorinolarinologie

USMF „Nicolae Testemițanu”

Chișinău, str. V. Alecsandri, 2

Tel.: 728107

E-mail: p_ababii@yahoo.com

Recepționat 11.09.2009

Tratamentul etiopatogenetic al amigdalitei cronice la copii

L. Danilov, I. Ababii, M. Maniuc, V. Nacu, V. Gavriluță, V. Țurcan

¹Catedra Otorinolarinologie, USMF „Nicolae Testemițanu”

²Spitalul Clinic Republican pentru Copii „Em. Coțaga”

Etiopathogenic Treatment of Chronic Tonsillitis in Children

The palatine tonsils are situated at the entrance of the respiratory and alimentary tracts and represent the first site of contact with a variety of microorganism and other antigenic substances present in food and inhaled air. The purpose of this article is to present the immune physiology of the tonsils and their role as active immune organs of the entire upper aero digestive tract and the importance of conservative treatment of chronic tonsillitis. In the Pediatric Otorhinolaryngological Clinic we treated 280 children with chronic tonsillitis from 1995 to 2009. In 86% of the cases we obtained positive results after selection of methods of treatment.

Key words: palatine tonsils, chronic tonsillitis, conservative treatment.

Этиопатогенетическое лечение хронического тонзиллита у детей

Согласно современным представлениям, небные миндалины относятся к периферическим органам иммунной системы и с первых дней жизни ребенка принимают активное участие в формировании реакций клеточного и гуморального иммунитета. Это обуславливает их функцию как органа, который первый в системе иммунитета подвергается непосредственному воздействию экзогенных факторов, определенным образом реагирует на них, подготавливая организм к наиболее оптимальным вариантам иммунного ответа. В оториноларингологическом отделении ДРКБ “Ем. Коцага” в течение 1995 -2009 гг. было проведено комплексное лечение и взято под наблюдение 280 детей с хроническим компенсированным тонзиллитом. Положительные результаты были получены в 86% случаев, что позволило сохранить целостность лимфоидной ткани лимфоидного кольца.

Ключевые слова: небные миндалины, хронический тонзиллит, иммунитет.

Introducere

Inflamația cronică a amigdalelor palatine constituie una dintre cele mai frecvente patologii în domeniul otorinolarinologiei. Anual sunt elaborate noi metode de tratament cu diferite preparate medicamentoase. Cu toate acestea, afectarea

amigdalelor este în continuare o maladie de mare incidență atât la copii, cât și la maturi (15-50% din populație) [1].

Problematika tonsilitei cronice a depășit limitele științei otorinolarinologice, această patologie fiind tot mai des în centrul atenției reprezentanților medicinei teoretice și clinice,