

**ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ И ДИНАМИКА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК  
ГРАНУЛЕМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ  
В ФОРМЕ ТУБЕРКУЛЕМЫ****ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии  
им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины» (г. Киев)****liskina@ifp.kiev.ua**

Данная работа выполнена в рамках НИР «Дослідити місцеві імуноморфологічні реакції легеневої тканини хворих при хронічному туберкульозному запаленні», № государственной регистрации 0116U000187, 2016-2018 гг., одной из задач которой является выяснение особенностей локализации иммунокомпетентных клеток и их субпопуляций в легочной ткани при хроническом туберкулезном процессе в легких.

**Вступление.** Туберкулема легких (Тб) – это одна из форм вторичного туберкулеза, которая представляет собой инкапсулированный очаг казеозного некроза, диаметром больше чем 1,2 см. Чаще всего Тб является исходом инфильтративного, реже очагового, диссеминированного или других форм туберкулеза легких. Условием развития Тб является сниженная вирулентность и патогенность туберкулезной инфекции и/или повышенная резистентность организма к возбудителю туберкулеза. Тб формируется в результате повышенной активности фибропластических процессов и гиперэргической реакции клеточных элементов легочной ткани в зоне туберкулезного воспаления [1].

Известно, что главной отличительной морфологической чертой микобактериальной инфекции, которая играет важную роль в иммунопатогенезе туберкулеза, является формирование гранулемы (Г). По сути Г – это компактно организованные скопления разных иммунных клеток, состоящие из инфицированных и неинфицированных макрофагов, пенистых макрофагов, эпителиоидных клеток, гигантских многоядерных макрофагов, окруженных по периферии слоем лимфоцитов.

Ранее в наших исследованиях было установлено, что прогрессирование туберкулезного воспалительного процесса в ткани легких с Тб характеризуется наличием большого количества Г, – как в самой структуре Тб – ее капсуле, так и в перифокальных участках легочной ткани, а именно – в очагах специфической пневмонии и зонах, непосредственно прилежащих к бронхам и бронхиолам, среди малоизмененных альвеол.

Известно, что среди клеточных типов гранулем при прогрессировании туберкулезного процесса преобладают эпителиоидно-лимфоидные гранулемы с гигантскими многоядерными макрофагами и центральным некрозом [3]. В исследовании с применением моноклонального антитела CD68 нами

была изучена локализация клеток моноцитарно-макрофагального ряда в легочной ткани с Тб. Была отмечена выраженная экспрессия маркера CD68 в гранулемах капсулы Тб и в перифокальной области [2]. Поэтому представляло интерес также изучение отдельных популяций лимфоцитов, входящих в состав гранулем, расположенных в различных участках легочной ткани.

**Цель исследования.** Изучение в легочной ткани с туберкулезом популяций лимфоцитов, входящих в состав гранулем, на фоне различной активности воспалительного процесса.

**Объект и методы исследования.** В исследовании вошли резектаты легких с наличием туберкулемы и с морфологически установленными выскокой – 18 случаев (1 группа) и низкой – 16 случаев (2 группа) степенью активности специфического воспалительного процесса. Активность воспаления определяли по гистологическим препаратам с их традиционной окраской гематоксилином и эозином. Количество и локализацию CD3+, CD20+, CD4+ и CD8+ лимфоцитов в гранулемах определяли по серийным срезам при иммуногистохимическом исследовании. Использован AUTOSTAINER 360-2D производства компании Thermo Fisher Scientific (США) и моноклональные антитела этой же компании. Микроскопическое исследование выполняли на микроскопе Olympus BX51, рабочее увеличение x400, с получением изображения на компьютере в программе QuickPHOTO MICRO2.3. Локализацию популяций и субпопуляций лимфоцитов в гранулемах, а также подсчет их относительного количества проводили по соответствующим микрофотографиям гранулем в капсуле туберкулемы и на удалении от нее в одном препарате, с расчетом средних значений. При изучении срезов ткани по клеточному составу выделяли эпителиоидные, эпителиоидно-лимфоидные, макрофагальные, лимфоидные и фибробластические гранулемы.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В исследуемых препаратах отмечены разнообразные морфологические типы Г. Были представлены небольшие формирующиеся Г, представляющие собой достаточно рыхлые скопления мононуклеарных фагоцитов, дендритных клеток и нейтрофилов; классические эпителиоидно-клеточные Г, Г с пенистыми макрофагами и лимфоцитами, фибробластические Г с примесью лимфоидных клеток.

Преобладающее количество CD3+, CD20+, CD4+ и CD8+ лимфоцитов в процентном отношении было представлено в эпителиоидно-лимфоидных Г, причем именно гранулемы этого клеточного типа также преобладали по количеству в легочной ткани, их было от 58,1 до 74,3% от общего количества Г.

Частота выявления CD3+ и CD20+ лимфоцитов, а также субпопуляций Т лимфоцитов (CD4+ и CD8+) в Г была различной в группах наблюдения и зависела от локализации Г (табл. 1). В капсуле Тб проявлялась тенденция к снижению количества Г, которые содержали в своем составе лимфоциты, по мере снижения активности специфического воспалительного процесса, а в отношении В лимфоцитов это уменьшение было достоверным (p<0,01). В легочной ткани на удалении от Тб наблюдалась тенденция к увеличению количества Г с лимфоидными клетками при снижении активности воспалительного процесса.

Современные исследования показали, что каждая Г в организме одного и того же пациента является независимой структурой относительно общего количества ее клеток, пропорционального отношению разных субпопуляций Т клеток, цитокинового ответа и бактериальной нагрузки [4]. В работе мы рассчитывали соотношение количества определенных клеток лимфоидного ряда ко всем лимфоцитам в одной Г при разной степени активности специфического воспалительного процесса (табл. 2). Т лимфоциты (CD3+ клетки) в нашем исследовании составляли от (32,6 ± 5,9) % до (51,8 ± 4,9) % клеток лимфоидного ряда в Г, причем их количество в Г, расположенных на расстоянии от Тб, во 2 группе было достоверно ниже (p<0,05) этого показателя 1 группы.

В экспериментальных исследованиях было показано, что Т лимфоциты составляют от 15 до 50% всех лейкоцитарных клеток в гранулемах мыши. Приблизительно 60-70% всех Т лимфоцитов – это CD4+ клетки, 15-30% – CD8+α/β Т лимфоциты и приблизительно 2% – γ/δ Т лимфоциты; в незначительном количестве представлены другие малые субпопуляции клеток, в частности, НКТ клетки (натуральные киллеры) [7]. В нашем исследовании CD4+ клетки составляли примерно от 28 до 47% от всех лимфоцитов, CD8+ клетки – от 20 до 35% лимфоцитов. Относительное количество клеток этих субпопуляций лимфоцитов незначительно колебалось в зависимости от места локализации Г и степени активности воспалительного процесса.

Известно, что при недостаточности или отсутствии CD8+ клеток нарушается функционирование Г, как одного из важнейших звеньев контроля над инфекцией. В таких условиях увеличивается объем центрального некроза вследствие недостаточности апоптоза и увеличивается нейтрофильная инфильтрация участков специфического воспаления. В наших исследованиях ткани легких с Тб количество CD8+ клеток в Г было вполне достаточным, только в 4-х случаях, (22,2 ± 9,8) %, 1 группы обнаружены Г с центральным некрозом и нейтрофильной ин-

Таблица 1.

**Частота обнаружения гранулем, содержащих разные популяции CD позитивных клеток**

| Лимфоциты | Гранулемы в капсуле туберкулемы |              | Гранулемы в легочной ткани |             |
|-----------|---------------------------------|--------------|----------------------------|-------------|
|           | 1 группа                        | 2 группа     | 1 группа                   | 2 группа    |
| CD3+      | 61,1 ± 11,5                     | 43,8 ± 12,4  | 66,7 ± 11,1                | 81,3 ± 9,8  |
| CD20+     | 61,1 ± 11,5 *                   | 18,8 ± 9,8 * | 77,8 ± 9,8                 | 68,8 ± 11,6 |
| CD4+      | 50,0 ± 11,8                     | 37,5 ± 12,1  | 55,6 ± 11,7                | 75,0 ± 10,8 |
| CD8+      | 61,1 ± 11,5                     | 37,5 ± 12,1  | 61,1 ± 11,5                | 75,0 ± 10,8 |

Примечание. \* – статистически достоверное различие между соответствующими группами (p<0,01).

Таблица 2.

**Относительное количество изучаемых иммунокомпетентных клеток в гранулемах**

| Лимфоциты | Гранулемы в капсуле туберкулемы |             | Гранулемы в легочной ткани |              |
|-----------|---------------------------------|-------------|----------------------------|--------------|
|           | 1 группа                        | 2 группа    | 1 группа                   | 2 группа     |
| CD3+      | 44,8 ± 5,2                      | 32,6 ± 5,9  | 51,8 ± 4,9 *               | 39,2 ± 4,8 * |
| CD20+     | 32,7 ± 4,6                      | 23,9 ± 8,0  | 35,1 ± 3,4                 | 26,9 ± 3,9   |
| CD4+      | 28,7 ± 5,3                      | 43,0 ± 10,6 | 42,3 ± 6,3                 | 47,7 ± 4,6   |
| CD8+      | 29,4 ± 3,6                      | 31,4 ± 6,6  | 29,9 ± 3,3                 | 35,4 ± 3,5   |

Примечание. \* – статистически достоверное различие между группами (p<0,05).

фильтрацией, а во 2-й группе такие изменения отсутствовали.

Известно, что В клетки составляют 1,0-10,0% от всех клеток лейкоцитарного ростка в гранулемах [7]. В нашем исследовании В лимфоциты составляли от (23,9 ± 8,0) % до (35,1 ± 3,4) % в Г от всех клеток лимфоидного ряда. Достоверных различий их количества между группами исследования не выявлено. Регулирующие механизмы, связанные с В-клетками при туберкулезе легких, еще недостаточно изучены, они могут быть многоуровневыми и сложными, с учетом многочисленных иммунологических функций этих клеток [6]. Имеются данные о том, что при

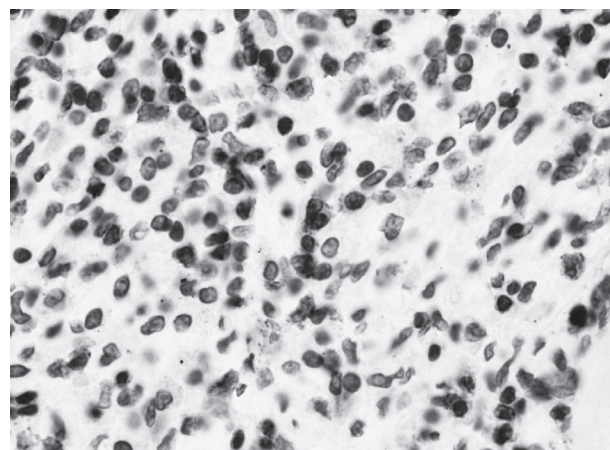


Рис. 1. Периферический участок гранулемы, представленный диффузно рассеянными клетками лимфоидного ряда, среди которых определяются CD4+ клетки. Иммуногистохимическое окрашивание моноклональным антителом к CD4, доокрашивание гематоксилином. Ув. : x400.

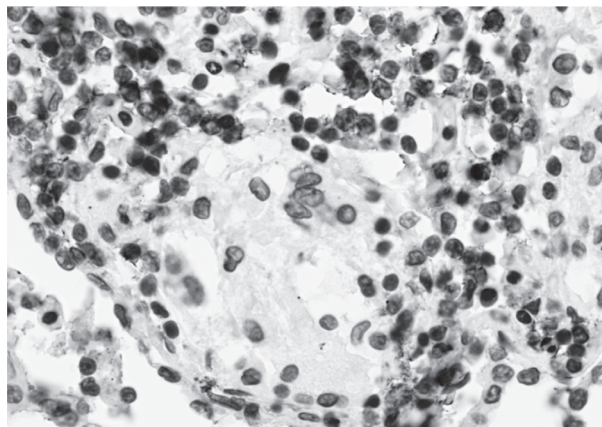
хроническом течении туберкулезного воспалительного процесса отсутствует связь количества В-клеток с обострением процесса [5].

Т-лимфоциты (CD3+) и их субпопуляции (CD4+, CD8+ клетки) в исследуемых препаратах были обнаружены преимущественно по периферии Г (рис. 1). CD4+ клетки в Г, расположенных в капсуле и на удалении от Тб, независимо от степени активности воспалительного процесса, не образовывали скоплений, а были диффузно рассеяны. CD8+ клетки в препаратах 1 группы также располагались диффузно, независимо от места расположения Г, а во 2-й группе в Г капсулы Тб были диффузно рассеяны, тогда как в перифокальной зоне располагались диффузно-очагово, формируя небольшие скопления.

В 1 группе, CD3+ клетки в Г капсулы Тб и перифокальной зоны образовывали небольшие скопления (очажки), в то время как во 2 группе CD3+ клетки в Г капсулы Тб располагались диффузно-очагово, а на удалении от Тб были диффузно рассеяны в Г. Эти данные позволяют косвенно оценивать динамику взаимоотношений CD4+ и CD8+ в гранулемах. Субпопуляции CD4+ и CD8+ клеток, диффузно рассеянных в Г, при использовании общего маркера Т-лимфоцитов (CD3+) демонстрируют клеточные скопления в Г, расположенных в капсуле Тб, в обеих группах, что косвенно свидетельствует о тесной клеточной кооперации этих субпопуляций (рис. 2). А в Г перифокальной зоны наблюдается пространственное разобщение и ослабление клеточной кооперации, о чем свидетельствует расположение клеток в Г: в 1-й группе клетки располагаются диффузно-очагово, а во 2-й группе – диффузно рассеяны.

В лимфоциты (CD20+ клетки) в Г обеих групп также располагались по периферии этих образований, но, в отличие от Т-лимфоцитов, образовывали клеточные скопления. Исключение составляли лишь CD20+ клетки, находящиеся в Г капсулы Тб в группе с низкой активностью воспалительного процесса, где эти клетки были диффузно рассеянными по всей структуре.

**Выводы.** При хроническом туберкулезе легких в форме туберкулем преобладающее количество CD3+, CD20+, CD4+ и CD8+ лимфоцитов в процентном отношении представлено в эпителиоидно-лим-



**Рис. 2.** Клетки лимфоидного ряда по периферии гранулемы с выраженной экспрессией CD3+ (диффузно-очаговое расположение). Иммуногистохимическое окрашивание моноклональным антителом к CD3, доокрашивание гематоксилином. Ув. : х400.

фоидных гранулемах. Гранулемы такого клеточного состава, содержащие вышеуказанные популяции лимфоцитов, преобладали по количеству по сравнению с гранулемами других клеточных типов. В капсуле Тб отмечалась тенденция к уменьшению количества Г, содержащих Т-лимфоциты, по мере снижения активности специфического воспалительного процесса, а в отношении В-лимфоцитов это уменьшение было достоверным. Относительное количество Т-лимфоцитов в гранулемах, расположенных на удалении от туберкулемы, было достоверно ниже в группе с низкой активностью специфического воспалительного процесса. В гранулемах, расположенных как в самой туберкулеме, так и на удалении от нее, мы не наблюдали достоверного снижения количества CD4+, CD8+ и CD20+ клеток в группе с высокой активностью туберкулезного воспалительного процесса, что косвенно свидетельствует о полноценном иммунном ответе при данной патологии.

**Перспективы дальнейших исследований.** В дальнейшем представляется полезным комплексное изучение различных типов клеток, входящих в состав гранулем, с использованием иммуногистохимического метода исследования, с целью детального уточнения и выяснения тканевых клеточных механизмов прогрессирования и регрессии туберкулезного процесса при туберкулемах.

## Литература

1. Кузик В.П. Патоморфологічні особливості туберкульоз легень (за даними аналізу операційного резекційного матеріалу) / В.П. Кузик // Патологія. – 2015. – № 1. – С. 99-101.
2. Ліскіна І.В. Розподіл макрофагів у легеневій тканині при туберкульозах легень з різною активністю специфічного запалення за результатами імуногістохімічного дослідження / І.В. Ліскіна, О.О. Мельник // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 1, Том 117. – С. 242-248.
3. Особенности формирования гранул при туберкулемах легких с высокой активностью туберкулезного воспалительного процесса / С.Д. Кузюкова [и др.] // 36. науч. работ НМАПО имени П.Л. Шупика. – Вип. 23 (3). – К., 2014. – С. 485-491.
4. Gideon H.P. Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization / H.P. Gideon [et al.] // PLoS One. – 2015. – Режим доступа: doi: 10.1371/journal.ppat.1004603.
5. Lugo-Villarino Geanncarlo Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas / Geanncarlo Lugo-Villarino [et al.] // Inflammation. – 2013. – Vol. 3. – P. 1-9.
6. Maglione P.J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with Mycobacterium tuberculosis / P.J. Maglione, J. Xu, J. Chan // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 7222-7234.
7. Miranda M.S. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? / M.S. Miranda [et al.] // Clinical and Developmental Immunol. – 2012. – Режим доступа: doi:10.1155/2012/139127.



УДК 616.24-002.5:616-002.592:612.42-07

**ПРЕДСТАВЛЕНІСТЬ І ДИНАМІКА ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИН ГРАНУЛЬОМ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ТУБЕРКУЛЬОЗІ ЛЕГЕНЬ У ФОРМІ ТУБЕРКУЛЬОМИ**

**Ліскіна І. В., Кузовкова С. Д., Загаба Л. М., Мельник О. О.**

**Резюме.** Проведене гістологічне дослідження з використанням імуногістохімічного методу для ідентифікації Т і В лімфоцитів, а також субпопуляцій Т лімфоцитів (CD4+ і CD8+ клітин) у легеневій тканині з наявністю туберкульозом та різною активністю специфічного запального процесу. Встановлені відносна кількість і особливості локалізації клітин лімфоїдного ряду в гранульомах, розташованих у капсулі туберкульозом, і в легеневій тканині поза туберкульозом. У капсулі туберкульозом відмічена тенденція до зменшення кількості гранульом, які містили Т лімфоцити (їх субпопуляції) при зниженні активності специфічного запального процесу, а відносно В лімфоцитів таке зменшення було вірогідним. Відносна кількість Т лімфоцитів у гранульомах, розташованих на віддаленні від туберкульозом, також була вірогідно менше у групі з низькою активністю специфічного запального процесу.

**Ключові слова:** туберкульозом легень, гранульозом, активність туберкульозу, CD3+, CD20+, CD4+ і CD8+ лімфоцити.

УДК 616.24-002.5:616-002.592:612.42-07

**ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ И ДИНАМИКА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ГРАНУЛЕМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ В ФОРМЕ ТУБЕРКУЛЕМЫ**

**Лискина И. В., Кузовкова С. Д., Загаба Л. М., Мельник О. А.**

**Резюме.** Проведено гистологическое исследование с применением иммуногистохимического метода для идентификации Т и В лимфоцитов, а также субпопуляций Т лимфоцитов (CD4+ и CD8+ клеток) в легочной ткани с наличием туберкулем и разной активностью специфического воспалительного процесса. Установлено относительное количество и особенности локализации клеток лимфоидного ряда в гранулемах, расположенных в капсуле туберкулемы и в легочной ткани вне туберкулемы. В капсуле туберкулемы отмечена тенденция к уменьшению количества гранул, содержащих Т лимфоциты (их субпопуляции), по мере снижения активности специфического воспалительного процесса, а в отношении В лимфоцитов это уменьшение было достоверным. Относительное количество Т лимфоцитов в гранулемах, расположенных на удалении от туберкулемы, также было достоверно ниже в группе с низкой активностью специфического воспалительного процесса.

**Ключевые слова:** туберкулема легких, гранулема, активность туберкулеза, CD3+, CD20+, CD4+ и CD8+ лимфоциты.

UDC 616.24-002.5:616-002.592:612.42-07

**PRESENTATION AND DYNAMICS OF LYMPHOID CELLS IN GRANULOMAS AT CHRONIC PULMONARY TUBERCULOSIS IN THE FORM OF TUBERCULOMA**

**Liskina I. V., Kuzovkova S. D., Zagaba L. M., Melnyk O. A.**

**Abstract.** Pulmonary tuberculoma is a form of secondary tuberculosis, which presents an encapsulated focus of caseous necrosis, with a diameter greater than 1.2 cm. Main distinguishing morphological feature of a mycobacterial infection, which is believed to play an important role in the immunopathogenesis of tuberculosis, is a formation of granulomas (G). G is compactly organized clusters of various immune cells, among which are infected and uninfected macrophages, foamy macrophages, epithelioid cells, giant multinucleated macrophages, and lymphocytes are formed an outer layer.

*The aim of the work* was to study lymphocyte populations in granulomas in lung tissue with tuberculomas at high and low degree of inflammatory activity.

The study was performed on lung tissue with tuberculoma and morphologically defined high — 18 cases (group 1) and the low — 16 cases (group 2) degree of activity of specific inflammatory process. The number and localization of CD3+, CD20+, CD4+ and CD8+ lymphocytes in the granulomas was determined by immunohistochemistry using AUTOSTAINER 360-2D Thermo Fisher Scientific (USA) and monoclonal antibodies of the same company. Microscopic examination was performed on a microscope Olympus BX51, magnification x400 with obtaining an images due to computer program QuickPHOTO MICRO 2.3.

In study, we calculated the ratio of certain type of lymphoid cells to all lymphocytes in every granuloma. It was established a relative amount and localization of certain type of lymphoid cells in granulomas which localized in the capsule of tuberculoma and in the lung tissue.

In the capsule of tuberculomas there was tendency to reducing of number of granulomas, which contained lymphocytes in its composition as far as decreased activity of specific inflammatory process, and in respect of B lymphocytes this decrease was significant ( $p < 0.01$ ).

T lymphocytes (CD3+ cells) in this study constituted from  $(32,6 \pm 5,9)\%$  to  $(51,8 \pm 4,9)\%$  of lymphoid cells in granulomas, and the number of T cells in granulomas at the distance from tuberculoma in group 2 was significantly lower ( $p < 0.05$ ) of this parameter of group 1.

Population of CD4+ and CD8+ T cells in granulomas were localized diffusely and additional using a common marker of T lymphocytes (CD3+) allow to demonstrate a concentrations of T cell that located in the capsule TB in both groups. Such observation indirectly indicates of close cooperation of these cell populations.

**Conclusion.** We observed no significant reduction of a number of CD4+, CD8+ and CD20+ cells in the group with high activity of tuberculous inflammation in granulomas which localized both in tuberculoma and at a distance, which indirectly indicates about immunocompetent response in this form of pathology.

**Keywords:** pulmonary tuberculoma, granuloma, activity of tuberculosis, CD20+, CD4+ and CD8+ lymphocytes.

*Рецензент — проф. Білаш С. М.*  
Стаття надійшла 09.12.2016 року