

Т.Г. Филоненко

Локализация макрофагов при фиброзно-кавернозном туберкулезе с активным бактериовыделением

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь

Ключевые слова: макрофаги, туберкулез, бактериовыделение, иммуногистохимия.

Целью исследования стало определение локализации, количества и качества альвеолярных макрофагов с последующей оценкой макрофагальной активности при вторичном фиброзно-кавернозном туберкулезе с активным бактериовыделением. Анализ 30 случаев показал, что наибольшее скопление CD68+ функционально активных макрофагов обнаруживается в краевой грануляционной ткани каверны, дренированной бронхом. Этот факт объясняет активизацию макрофагальной системы для осуществления фагоцитоза. Имеет место неоднородность интенсивности экспрессии CD68+ многоядерных гигантских клеток Лангханса, что позволило выделить 2 типа макрофагов: с низким и высоким уровнем макрофагальной активности. Сниженное количество CD68+ альвеолярных макрофагов в перикавернозной зоне ателектаза, дистелектаза (9%) и эмфиземы (3%) свидетельствует о резком угнетении функционирования системы местной защиты легких и местного иммунного ответа при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких с активным бактериовыделением.

Локалізація макрофагів при фіброзно-кавернозному туберкульозі з активним бактеріовиділенням

Т.Г. Филоненко

Мета дослідження полягала у визначенні локалізації, кількості та якості макрофагів з подальшою оцінкою макрофагальної активності при вторинному фіброзно-кавернозному туберкульозі з активним бактеріовиділенням. Аналіз 30 випадків імуногістохімічного дослідження тканини легень показав, що найбільше скупчення CD68+ функціонально активних макрофагів виявляється в крайовій грануляційній тканині каверни, дренажної бронхом. Цей факт пояснює активізацію макрофагальної системи для здійснення фагоцитозу. Має місце неоднорідність інтенсивності експресії CD68+ багатоядерних гігантських клітин Лангханса, що дозволило виділити 2 типи макрофагів: з низьким і високим рівнем макрофагальної активності. Знижена кількість CD68+ альвеолярних макрофагів у перикавернозній зоні ателектазу, дистелектазу (9%) та емфіземи (3%) свідчить про різке пригнічення функціонування системи місцевого захисту легень і місцевої імунної відповіді при фіброзно-кавернозному туберкульозі легень з активним бактеріовиділенням.

Ключові слова: макрофаги, туберкульоз, бактеріовиділення, імуногістохімія.**Патологія.** – 2011. – Т.8., №1. – С. 45–48

Localization of macrophages in fibrous-cavernous tuberculosis with active bacterium excretion

T.G. Filonenko

Research aim was to determine localization, number and quality of macrophages with the following estimation of macrophage activity in the second fibrous-cavernous tuberculosis with active bacterium excretion. An analysis of 30 cases of immunohistochemic investigation of lung tissue showed, that the most accumulation of CD68+ of functional-active macrophages was in border granulation tissue of cavity drained with bronchus. This fact explains activation of the macrophage system for realization of phagocytosis. Heterogeneity of expression's intensity of multinucleated giant Langhans cells CD68+ took place, that allowed to singled out two types of macrophages: with low and high level of macrophage activity. Low number of alveolar macrophages CD68+ in the peri-cavity area of atelectasis, distelectasis (9%) and emphysema (3%) testifies to acute depression of functioning of the lung system local defense and local immunity answer in fibrous-cavernous tuberculosis with active bacterium excretion.

Key words: macrophage, tuberculosis, bacterium excretion, immunohistochemistry.**Pathologia.** 2011; 8(1): 45–48

Сегодня, согласно статистике МЗ Украины, 500 тыс. украинцев находятся на диспансерном учете по поводу туберкулезного заболевания, из них 90 тыс. – с открытой формой; ежегодно умирает 10 тыс. таких больных [2,5].

Отрицательный патоморфоз туберкулеза, рост мультирезистентных форм, изменение клинико-морфологической картины заболевания, стремительное прогрессирование которого происходит на фоне сниженного иммунного ответа и широкого спектра неспецифических поражений органов дыхания, создает немалые трудности для своевременного выявления и лечения туберкулезного процесса [4,5].

Подходы к решению этой проблемы в настоящее время не могут быть только традиционными и исторически сложившимися. Проведенный анализ научной литера-

туры показал, что начало XXI столетия ознаменовалось серией углубленных исследований, посвященных нарушениям системы местной защиты легких при туберкулезе, обусловленных взаимодействием неспецифических и специфических механизмов [2,4,5,11,12]. Существенная роль в реализации функционирования и эффективной защиты легких принадлежит макрофагальной системе, которая принимает активное участие в процессах поддержания гомеостаза организма, воспаления и регенерации, в контроле объема внеклеточного матрикса, в неспецифической противомикробной защите, в иммуногенезе и в реакциях специфического клеточного иммунитета [3,4,6,9,12].

Так как одной из причин безуспешного лечения современного туберкулеза, по общепринятому мнению, является интенсивное размножение микобактерий в

организме человека и малоэффективный фагоцитоз, способствующие выраженному экссудативному компоненту воспаления с развитием казеозного некроза, прогрессирования туберкулезного процесса и формированием каверн, становится актуальным изучение морфологических особенностей клеточных реакций в очаге специфического и неспецифического воспаления при фиброзно-кавернозном туберкулезе (ФКТ) [3,7,8,11].

В специальной литературе отсутствуют четкие и объективные сведения относительно количества и распределения макрофагов в легочной ткани в зависимости от бактериовыделения при фиброзно-кавернозном туберкулезе. Характер локализации макрофагов и оценка их активности в очаге поражения поможет выяснить степень выраженности и адекватности системного воспалительного ответа, более четко определить патогенетические механизмы нарушения местной защиты легких и пути коррекции выявленных нарушений для повышения эффективности лечения этой категории пациентов.

Цель работы

Определение локализации, количества и качества макрофагов с последующей оценкой макрофагальной активности при вторичном фиброзно-кавернозном туберкулезе с активным бактериовыделением.

Материалы и методы исследования

Материалом для гистологического, гистохимического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования взяты участки ткани легких у 30 больных, оперированных по поводу фиброзно-кавернозного туберкулеза легких с активным бактериовыделением (БК+). Возраст больных варьировал от 40 лет до 65 лет, давность заболевания – от 7 до 15 лет. По локализации каверны находились в обеих легких, в основном в верхних долях в 1 и 2 сегментах с преобладанием в правом легком.

Участки легочной ткани размером 1×0,5×0,5 см фиксировали 10% забуференным формалином, заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм с последующей обзорной окраской гематоксилином и эозином по стандартной методике [1].

ИГХ исследование проводили с использованием парафиновых блоков и реактивов компании DAKO с моноклональными антителами к CD68 (Clone PG-M1, разведение 1:50) – маркера гистиоцитов и макрофагов, системы визуализации EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link), Code K8012 на автостейнере фирмы DAKO [10].

Результаты ИГХ исследования оценивали с учетом распределения CD68+ клеток в ткани легкого, их количества, локализации и характера взаимодействия с другими структурными элементами ткани легкого. Оценку количества клеток проводили в 10 полях зрения при увеличении 200. Интенсивность экспрессии оценивали полуколичественным методом на основании выраженности окраски и количества гранул в цитоплазме по следующей схеме: низкая и высокая. Низкая степень функциональной активности характерна для клеток с мембранной экспрессией и слабым диффузным

окрашиванием цитоплазмы и рассеянным небольшим количеством зерен. Высокая степень функциональной активности характерна для клеток с интенсивным окрашиванием мембраны и цитоплазмы с компактными и тесно расположенными зернами. Количество позитивных CD68+ клеток считали на 100 клеток воспалительного инфильтрата, стромы, участков фиброза, легочной ткани в процентном эквиваленте с последующей статистической обработкой. В качестве контроля использовали участки ткани легких, взятые у 10 больных, умерших от патологии, не связанной с заболеванием легких и инфекционными заболеваниями.

Фотографирование осуществляли цифровой камерой OLYMPUS C 5050Z, установленной на микроскопе OLYMPUS CX 41.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ООО «Альфа», г. Донецк.

Результаты и их обсуждение

При морфологическом исследовании ткани легкого у больных ФКТ с активным бактериовыделением обнаруживается полиморфизм воспалительных реакций, проявляющийся как альтеративно-экссудативными, так и пролиферативными процессами с образованием специфических туберкулезных гранул различной степени активности и образованием каверн. Наибольшие изменения в зоне прогрессирующей фиброзной каверны определяются в бронхах, дренирующих каверну с признаками туберкулезного бронхита экссудативно-некротического характера, распространяющегося на все генерации дренирующего бронха. В отдаленных от каверны зонах имеют место неспецифические признаки бронхита, сопровождающиеся картиной панацитарной эмфиземы.

В контрольных гистологических срезах экспрессия CD68+ равномерно распределяется в эпителиальной выстилке альвеол среди пневмоцитов и свободно располагаются в просвете альвеол, что составляет 30% из расчета на 100 клеток, из них всего 12% с низкой функциональной активностью. В строме межальвеолярных перегородок экспрессия CD68+ отмечается в единичных клетках, в основном, вокруг сосудов (2%) с низкой функциональной активностью.

ИГХ исследование ткани легких у больных ФКТ показало, что CD68+ макрофаги наиболее широко распространены в стенке прогрессирующей фиброзной каверны.

В зоне казеозного некроза на внутренней поверхности каверны визуализируется диффузная слабой интенсивности экспрессия CD68+, предположительно представленная некротическими фрагментами макрофагов, сохраняющих остаточный антиген.

В среднем слое прогрессирующей хронической каверны, гистологически представленной грануляционной тканью и характеризующейся наличием пролиферативного гранулематозного специфического воспаления,

экспрессия CD68+ перераспределяется следующим образом. В зоне воспалительного инфильтрата грануляционного слоя каверны обнаруживается наибольшее количество CD68+, что составляет 60%. Функциональная активность таких клеток неоднородна: 40% из них имеют интенсивную цитоплазматическую окраску с компактным расположением зерен, свидетельствующее о повышенной антигенной нагрузке клеток, что является критерием высокой функциональной активности; остальные 20% имеют менее интенсивную окраску, наиболее выраженную в клеточной мембране, что свидетельствует о перераспределении антигенов по периферии цитоплазмы макрофага. Известно, что процесс прикрепления микобактерий к фагоцитам осуществляется посредством рецепторов комплемента, маннозных рецепторов и других рецепторов клеточной поверхности макрофага, а взаимодействие между маннозными рецепторами и инфектом происходит при помощи гликопротеина клеточной стенки микобактерий, имеющего маннозный остаток на обращенной во внешнюю среду части молекулы [3,4,6]. В связи с этим можно предположить, что такие макрофаги с мембранной экспрессией имеют низкую функциональную активность и в настоящий момент либо готовятся к фагоцитозу микобактерий, либо находятся в состоянии покоя. Учитывая тот факт, что микобактерии туберкулеза размножаются как внутри макрофагов, так и внеклеточно в условиях повышенной аэрации [3], большее их количество перераспределяется в эту зону, выполняя свои функции.

Накопление CD68+ в очагах специфических туберкулезных гранул является неоднородным и зависит от степени активности и «возраста» гранулемы. В стенке каверн, где обнаруживаются активные гранулемы с мелким очагом казеозного некроза, окруженные клеточным инфильтратом с выраженной экспрессией CD68+ – 77% эпителиоидных макрофагов с преобладанием функционально-активных форм (рис. 1, цв. вкладка 1).

Такое распределение CD68+ определяет высокую функциональную активность клеток макрофагальной генерации, направленную на ограничение распространения персистирующей инфекции.

В неактивных гранулемах (меньших размеров без наличия казеозного некроза, по сравнению с активной гранулемой CD68+) эпителиоидных макрофагов обнаружено 40% с преобладанием низкофункциональных клеток.

Интересной представляется оценка экспрессии CD68+ в многоядерных гигантских клетках Лангханса, проявляющаяся наличием диффузной, но различной по интенсивности окрашивания цитоплазмы и количества зерен в ней. Меньшие по размеру клетки Лангханса с небольшим количеством, но компактным расположением ядер в цитоплазме имеют более интенсивную окраску, что свидетельствует о поздней стадии развития путем слияния функционально-активных эпителиоидных макрофагов и «молодой возраст» клетки (6% CD68+). Большие по размеру клетки, имеющие слабую интенсив-

ность окраски с рассеянными по цитоплазме зернами, характеризуют более раннюю стадию формирования многоядерной клетки с потерей ее функциональности и остаточным содержанием антигенов (15% CD68+). Такие клетки, по нашему мнению, можно определить как «долгоживущие», определяющие иммунную реакцию замедленного типа (рис. 2, цв. вкладка 1).

Таким образом, мобилизация CD68+ макрофагов в зоне специфического гранулематозного воспаления является показателем участия макрофагов в эффекторной фазе специфического иммунного ответа.

В окружающей прогрессирующую хроническую фиброзную каверну легочной ткани отмечаются признаки ателектаза, дистелектаза, очаговой панацинарной эмфиземы и скопления лимфоидных инфильтратов. В участках ателектаза и дистелектаза в сохранившихся альвеолярных просветах наблюдается экспрессия CD68+ функционально-активных альвеолярных макрофагов (АМ) в небольшом количестве, в основном фиксированных в альвеолярных нишах (9% CD68+) (рис. 3, цв. вкладка 1). В очагах эмфизематозного вздутия также обнаруживается небольшое количество фиксированных на альвеолярной поверхности CD68+ АМ (3%) с низкой функциональной активностью, причем свободно располагающиеся АМ в просветах альвеол отсутствуют (рис. 4, цв. вкладка 1). По сравнению с легочной тканью контрольной группы, таких макрофагов визуализируется 30%, большинство из них – высокофункциональные клетки, определяющиеся как в просвете альвеол, так и фиксированных к альвеолярной выстилке. Такое перераспределение и снижение количества АМ в патологических участках, по сравнению с нормальной тканью легкого, свидетельствует о резком снижении функционирования системы местной защиты легких, основную роль в которой играют АМ.

В строме альвеолярных перегородок зоны дистелектаза среди хронического лимфоцитарно-гистиоцитарного инфильтрата обнаруживаются 22% CD68+ тканевых макрофагов с низкой функциональной активностью, не способных к фагоцитозу, провоцирующие усиление тканевой гипоксии, пролиферацию фибробластов и склеротические процессы.

Обобщая данные специальной литературы и проведенного исследования, можно утверждать, что в патогенезе прогрессирующей хронической фиброзной каверны у больных ФКТ с активным бактериовыделением макрофагам отводится одна из ведущих ролей, анализ которой облегчается внедрением в практику методов ИГХ, позволяющих идентифицировать и визуализировать определенные генерации макрофагальной системы легких.

Выводы

Наибольшее скопление CD68+ функционально-активных макрофагов обнаруживается в грануляционно-фиброзной ткани каверны, дренированной бронхом, что свидетельствует об активизации макрофагальной системы легких.

Мобилизация CD68+ макрофагов в зоне специфического гранулематозного воспаления свидетельствует об участии макрофагов в эффекторной фазе специфического иммунного ответа.

На основании неоднородности интенсивности экспрессии CD68+ многоядерных гигантских клеток Лангханса выделено 2 типа макрофагов: с низким и высоким уровнем макрофагальной активности, определен их «возраст» в участии реакции гиперчувствительности замедленного действия.

Сниженное количество CD68+ альвеолярных макрофагов в перикавернозной зоне ателектаза, дистелектаза и эмфиземы свидетельствует о резком угнетении функционирования системы местной защиты легких и местного иммунного ответа при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких с активным бактериовыделением.

Перспективы дальнейших исследований предусматривают разработку адекватного патогенетического лечения вторичного активного ФКТ с учетом значимости гистологических и иммуногистохимических критериев диагностики снижения клеточного механизма местной системы защиты легких.

Литература

1. Горальский Л.П. Основы гистологической техники і морфо функціональні методи дослідження у нормі та при патології / Л.П.Горальский, Хомич В.Т., Кононський О.І. – Житомир: «Полісся», 2005. – 288 с.
2. Гордиенко С.М. Туберкулез. Оценка ситуации / С. М. Гордиенко // Здоров'я України. – 2004. – №22. – С. 16–17.
3. Еремеев В.В. Взаимодействие макрофаг-микобактерия в процессе реакции микроорганизма на туберкулезную инфекцию/ В.В Еремеев // Проблемы туберкулеза. – 2004. – №8. – С. 3–7.
4. Ерохин В.В. Молекулярные, субклеточные и клеточные механизмы патогенеза туберкулезного воспаления легких / В.В. Ерохин// Саратовский научно-медицинский журнал. – 2009. – Т. 5, №2. – С. 267–269.
5. Ефективність патоморфологічної діагностики туберкульозу / Є.І. Суслов, Т.П. Підгаєвська., С.Д. Кузовкова та ін. // Укр. пульмонолог. журн. – 2007. – №3. – С. 52–55.
6. Лепеха Л.Н. Макрофаги легких / Л.Н. Лепеха // Клеточная биология легких в норме и при патологии / Под ред. В.В. Ерохина и Л.К. Романовой. – М.: Медицина, 2000. – 234 с.
7. Морфологія стінки хронічної ригідної тришарової каверни у випадках фіброзно-кавернозного туберкульозу легень з різним ступенем активності його перебігу/ І.В. Ліскіна, С.Д. Кузовкова, Л.М. Загаба, С.О. Кравченко та ін. / Український пульмонологічний журнал. – 2010. – №1. – С. 49–53.
8. Функциональная активность фагоцитирующих клеток у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом / А.В. Елькин, М.Е. Дьякова, О.Т. Титаренко и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2008. – №2. – С. 15–19.
9. Функциональная активность альвеолярных макрофагов при обострении туберкулеза легких / Л.Н. Шишкина, С.М. Егунова, С.Г. Чувакин и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – №11. – С. 29–32.
10. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry / D.J. Dabbs – Churchill Livingstone, 2006. – 828 p.
11. Mycobacterium tuberculosis Growth at the Cavity Surface: a Microenvironment with Failed Immunity/ Gilla Kaplan, Frank A. Post, Andre L. Moreira ets. // Infection and immunity. – 2003. – Vol. 71, №12. –P. 7099–7108.
12. Schlesinger L.S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors/ L.S. Schlesinger// J. Immunology. – 1993. – №150. – P. 2920–2930.

Сведения об авторе:

Филоненко Т.Г., к. мед. н., доцент каф. патологической анатомии с секционным курсом ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского».

Адрес для переписки:

Филоненко Татьяна Григорьевна. 95006, г.Симферополь, бул. Ленина, 5/7, КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Тел.: (050) 935 91 08.

E-mail: tanya-fil@mail.ru

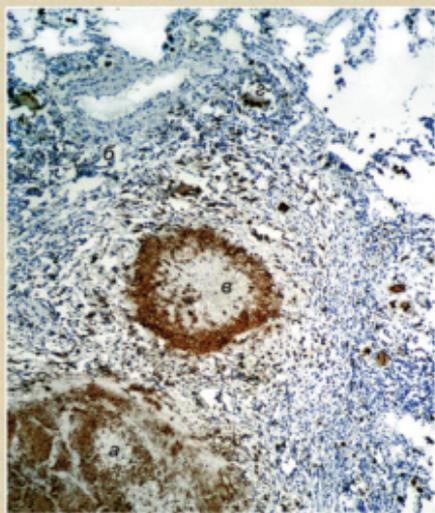


Рис. 1. ФКТ, БК+. Фрагмент стенки прогрессирующей хронической фиброзной каверны с наличием бронхо-кавернозного свища. ИГХ. Система визуализации FLEX. Ув. 100. а. Очаг казеозного некроза с диффузной слабоинтенсивной экспрессией CD68+. б. Экспрессия CD68+ в воспалительном инфильтрате стенки каверны. в. Выраженная экспрессия CD68+ вокруг активной туберкулезной гранулемы с казеозным некрозом в центре. з. CD68+ многоядерные гигантские клетки Ланганса.

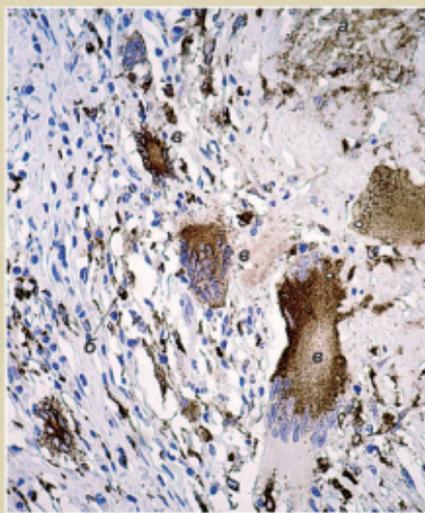


Рис. 2. ФКТ, БК+. Фрагмент стенки прогрессирующей хронической фиброзной каверны с наличием бронхо-кавернозного свища. ИГХ. Система визуализации FLEX. Ув. 400. а. Очаг казеозного некроза с диффузной слабоинтенсивной экспрессией CD68+. б. Экспрессия CD68+ в воспалительном инфильтрате стенки каверны. в. CD68+ многоядерные гигантские клетки Ланганса в различных стадиях формирования.

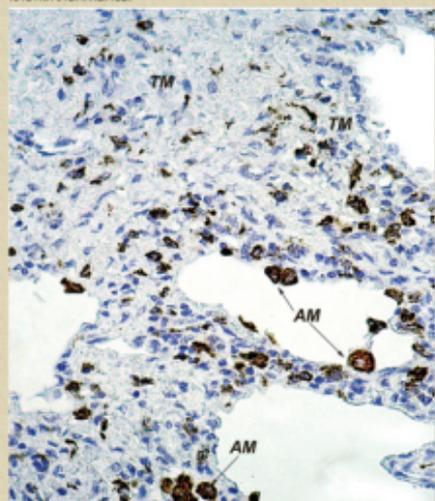


Рис. 3. ФКТ, БК+. Фрагмент ткани легкого с признаками дистелектаза, расположенного вблизи прогрессирующей хронической фиброзной каверны. Перераспределение CD68+ альвеолярных макрофагов в просветах альвеол. ИГХ. Система визуализации FLEX. Ув. 400. а. Альвеолярные макрофаги (AM), локализующиеся в просвете альвеол и на альвеолярной выстилке. б. Тканевые макрофаги (TM), локализующиеся в строме альвеолярных перегородок.

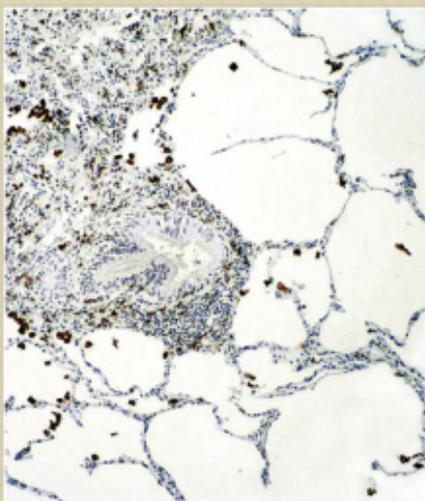


Рис. 4. ФКТ, БК+. Перераспределение CD68+ альвеолярных макрофагов в участках дистелектаза и эмфиземы в перикавернозной зоне. ИГХ. Система визуализации FLEX. Ув. 400.

(Рис. 1–4 к статье Т.Г. Филоненко «Локализация макрофагов при фиброзно-кавернозном туберкулезе с активным бактериовыделением», с. 45–48)