

**ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОСНОГО ОБ'ЄМУ ОСНОВНИХ КЛОНІВ ІМУННИХ
КЛІТИН В ЗАПАЛЬНОМУ ІНФІЛЬТРАТІ СТРОМИ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПРИ ГНІЙНО-СЕПТИЧНОМУ ПРОЦЕСІ,
СПРИЧИНЕНОМУ *S. aureus*****Харківський національний медичний університет (м. Харків)**

Робота є фрагментом планової науково-дослідної тематики Харківського національного медичного університету кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Вплив фізико-біологічних факторів на комунікативні властивості мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних процесів», № державної реєстрації 0112U001822.

Вступ. Проблема ролі *S. aureus* в етіології запальних захворювань залишається досить актуальною. Багатьма дослідниками доведено, що патогенез гнійно-запальних процесів, спричинених *S. aureus*, визначається особливостями первинного вогнища інфекції, локалізацією, станом, а також реактивністю організму хворого. В умовах нормально функціонуючої імунної системи генералізація гнійної інфекції не виникає. Якщо ж порушуються ранні стадії імунної реакції, а саме: хемотаксис, опсонізація, фагоцитоз, бактерицидна активність лейкоцитів і сироватки крові з одночасним зниженням активності лімфоцитів, моноцитів, утворенням специфічних імунних антитіл, то розвивається системна запальна реакція. Зв'язування з рецепторами клітин, що беруть участь у формуванні імунної відповіді, компонентів мікробної стінки призводить до активації системи внутрішньоклітинної передачі сигналів від мембрани до ядра і транскрипції генів цитокінових каскадів, які відповідальні за активацію фагоцитів та інших імунокомпетентних клітин через експресію факторів неспецифічної резистентності та системної запальної реакції. Відомо, що при проникненні *S. aureus* в макроорганізм, першими клітинами, які вступають на боротьбу з ним, є тканинні макрофаги. Вони поглинають і перетравлюють мікроби, представляючи їх антигенні пептиди Т- і В-клітинам й ініціюючи тим самим розвиток клітинної та гуморальної відповіді. При цьому макрофаги виділяють цитокіни, які активують імунні клітини: нейтрофіли, моноцити, НК-клітини, і діють на Т – і В-лімфоцити, сприяючи розвитку специфічного імунітету [4, 8].

За останні десятиліття проведено ряд досліджень, спрямованих на вивчення імунної відповіді та її порушень, а також шляхів її корекції у різних груп хворих з гнійно-запальними процесами, спричиненими *S. aureus*. [2, 3]. Імунодефіцит у хворих з

післяопераційними гнійно-септичними процесами має складний патогенез, у розвитку якого велике значення, поряд з високим рівнем ендотоксикозу, мікроциркуляторними розладами і порушеннями анаболічних процесів, мають місце кількісні та якісні зміни основних ланок імунної системи. Зниження імунного потенціалу організму у пацієнта сприяє підвищенню, як прозапальних, так і протизапальних реакцій, і не тільки ускладнює перебіг гнійно-запального процесу, але й збільшує ризик його генералізації і вторинного інфікування [5]. Тому потребує подальших досліджень визначення відносного об'єму клітин – продуцентів медіаторів запальної реакції, які беруть участь у формуванні механізму міграції клітин у вогнище запалення, а також у порушенні диференціювання імунокомпетентних клітин.

Метою даного дослідження було встановлення особливостей імуноморфологічного стану з визначенням відносного об'єму лімфо-плазматарно-макрофагальної інфільтрації в стромі органів експериментальних тварин при гнійно-септичному процесі, спричиненому *S. aureus*.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 30 мишах інбредних ліній C57Bl/6JSto [7]. Піддослідні тварини витримувались на звичайному харчовому раціоні з вільним доступом до води по 10 тварин в стандартних клітках. Досліди здійснювались відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей» [9]. Імуноморфологічне дослідження проводилося на парафінових зрізах, товщиною 5-6 мкм непрямим методом Кунса за методикою Brosnan [6]. Імунні клітини диференціювались за допомогою моноклональних антитіл (МКА) до різних типів клітин фірми Serotec. Використовувались CD8, CD4, CD3, CD21, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-4. Препарати вивчались за допомогою люмінесцентного мікроскопу МЛ-2 з використанням світлофільтрів: ФС-1-2, СЗС-24, БС-8-2, УФС-6-3. Відносні об'єми загальних клонів імунних клітин визначалися за допомогою сітки Г. Г. Автанділова в люмінесцентному мікроскопі [1].

Кількість клітин-продуцентів цитокінів підраховувалися у полі зору $\times 400$.

Результати досліджень та їх обговорення.

При вивченні імуноморфологічного стану серця дослідних тварин було встановлено, що епікард, строма якого слабо фуксифільна, потовщений за рахунок набряку і еозинофільних накладень фібрину, з вогнищево-дифузними запальними інфільтратами, в яких переважають сегментоядерні лейкоцити (CD18), зустрічаються лімфоцити (CD3, CD4, CD8, CD45RA), плазмоцити з IgM, IgG, макрофаги (ED1), в тому числі багатоядерні, а також поодинокі колонії *S. aureus*, а також клітини – продуценти IL-1 β , IL-6, TNF (рис. 1).

При цьому помітно збільшення, порівняно з інтактною групою тварин, відносної кількості плазмобластів макрофагів і клітин-продуцентів інтерлейкінів (табл.). Нейтрофіли, плазмоцити і макрофаги багаті РНП, лімфоцити з інтенсивною реакцією Фельгена-Россенбека в ядрах. Крім того, відзначалася внутрішньосудинна фіксація CD18 нейтрофілів до поверхні.

Клапанний і пристінковий ендокард зі слабкою фуксифільною набряклою стромою, з явищами фібриноїдного набухання і осередкового некрозу, навколо якого розташовуються запальні інфільтрати з лімфоцитів, гістіоцитів і багатоядерних макрофагів, в цитоплазмі останніх виявляються колонії бактерій.

У печінці в дослідній групі тварин спостерігається виражене повнокров'я центральних вен і прилеглих міжбалкових капілярів. Строма набрякла, в портальних трактах периваскулярно з поширенням на междолькову сполучну тканину виявляється очагово-дифузна інфільтрація лімфоцитами (CD3, CD4, CD8, CD45RA), гістіоцитами з численними макрофагами (ED1) й поодинокими нейтрофілами (CD18), в цитоплазмі яких відзначається виражена реакція Браше.

Відмічено внутрішньосудинну фіксацію CD18 нейтрофілів до поверхні (рис. 2). Крім того, також як і в стромі серця виявлялися клітини-продуценти IL-1 β , IL-6, TNF.

Порівняно з інтактною групою, кількість плазмобластів макрофагів і клітин-продуцентів інтерлейкінів збільшено.

У нирках визначається очагово-дифузна інфільтрація набряклої стромі лімфоїдними клітинами, в цитоплазмі яких визначається слабка реакція

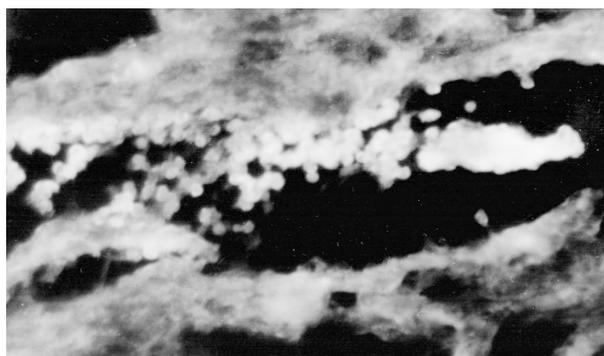


Рис. 1. Виражена дифузна інфільтрація в інтерстиції міокарда тварин дослідної групи. Непрямий метод Кунса з МКА до IL-1 β . $\times 400$.

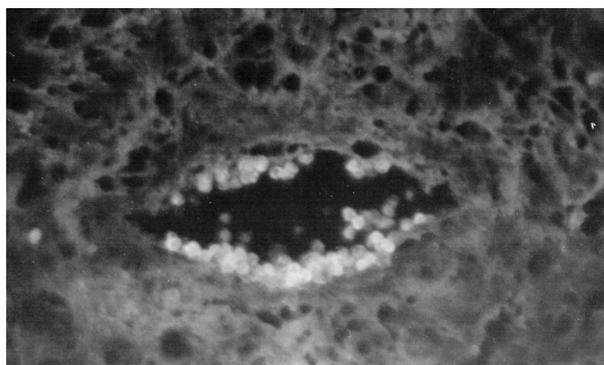


Рис. 2. Внутрішньосудинна фіксація CD18 нейтрофілів до поверхні ендотелія в судинах печінки тварин дослідної групи. Непрямий метод Кунса з МКА до CD18. $\times 400$.



Рис. 3. Плазмобласти з IgM в інтерстиції нирок. Відкладення імунних комплексів, що містять IgM на базальних мембранах клубочків у дослідній групі тварин. Непрямий метод Кунса з МКА до IgM. $\times 400$.

Таблиця

Відносні обсяги основних клонів імунних клітин в запальному інфільтраті стромі внутрішніх органів експериментальних тварин ($M \pm m$) (у перерахунку на 100 клітин в полі зору $\times 400$)

Відносні обсяги імунних клітин	Дослідні тварини				
	нирки	міокард	печінка	селезінка	лімфатичний вузол
CD3, CD4, CD8, CD45RA	59,0 \pm 3,0	55,0 \pm 3,1	58,0 \pm 3,6	43,0 \pm 2,1	46,0 \pm 1,6
ED1-макрофаги	12,0 \pm 1,5	14,0 \pm 1,1	13,0 \pm 1,4	11,0 \pm 1,3	16,0 \pm 1,7
Плазмобласти з IgM й IgG	13,0 \pm 1,9	16,0 \pm 1,3	12,0 \pm 1,1	16,0 \pm 1,3	13,0 \pm 1,8
Клітини продуценти IL-1 β , IL-6, IL-4, TNF	34,0 \pm 2,5	36,0 \pm 2,2	38,0 \pm 2,9	36,0 \pm 2,2	41,0 \pm 2,1

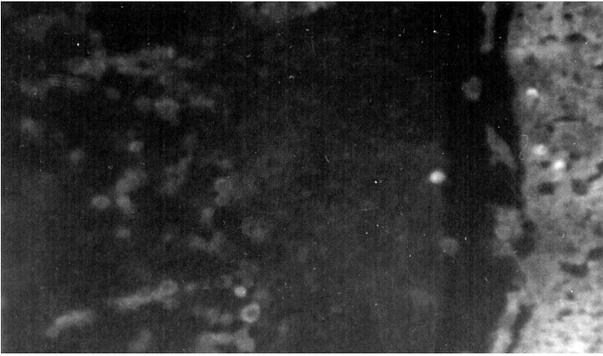


Рис. 4. Велика кількість плазмобластів IgG у запальній інфільтрації дослідної групи тварин. Непрямий метод Кунса з МКА до IgG. X 400.

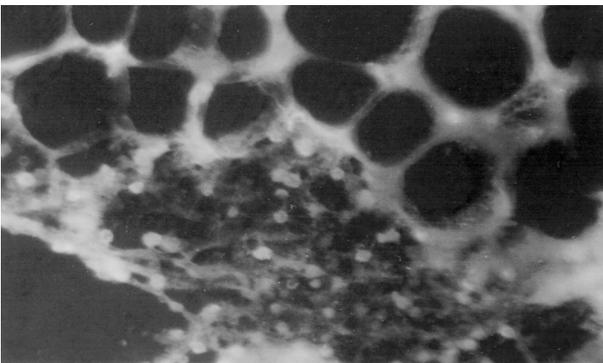


Рис. 5. Клітини – продуценти IL-6 в інтерстиції у тварин дослідної групи. Непрямий метод Кунса з МКА до IL-6. X400.

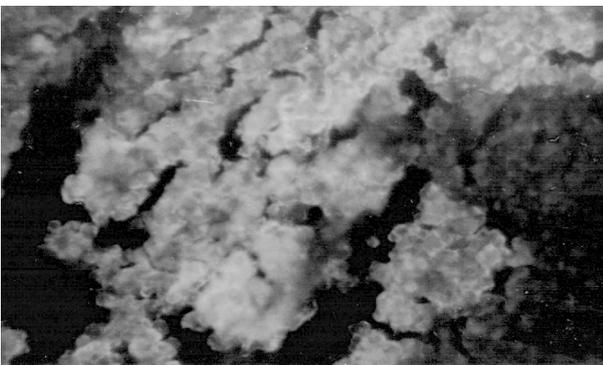


Рис. 6. Т-лімфоцити (CD3) в паракортикальній зоні лімфатичного вузла дослідної групи тварин. Непрямий метод Кунса з МКА CD3 x 400.

Браше, а в ядрах – інтенсивна реакція Фельгена-Россенбека. Характер запальної інфільтрації відповідає вищеописаній в печінці та серці.

У її складі визначалися лімфоцити (CD3, CD4, CD8, CD45RA), макрофаги (ED1), і поодинокі нейтрофільні гранулоцити (CD18), плазмобласти з IgM і IgG і клітини продуценти IL-1 β , IL-6, TNF (рис. 3).

У порівнянні з інтактною групою, макрофагальна реакція, реакція плазматизації та активність

цитокінів посилені. Так само, як і в попередніх органах, відзначалася внутрішньосудинна фіксація CD18 нейтрофілів до поверхні.

В селезінці Т-лімфоцити (CD3, CD4, CD8) локалізувалися переважно в періартеріальних зонах фолікулів, а також в червоній пульпі селезінки. В – лімфоцити (CD45RA) – у світлих центрах фолікулів, мантийних зонах фолікулів, а також в червоній пульпі (рис. 4).

У всіх зонах селезінки визначалися макрофаги, моноцити (ED1). Зустрічалися також і клітини-продуценти імуноглобулінів G і M, а також інтерлейкінів IL-1 β , IL-6, TNF, IL-2RL, IL-4 (рис. 5). Ступінь виразності макрофагальної реакції, реакції плазматизації, а також відносного об'єму клітин-продуцентів цитокінів (табл.) значно вище ніж у інтактних тварин.

При мікроскопічному дослідженні лімфатичних вузлів Т-лімфоцити (CD3, CD4, CD8) розташовувалися переважно в паракортикальній зоні кори (рис. 6), а також у мозковій речовині.

В – лімфоцити (CD45RA) – визначалися в корі й в мозковій речовині. У всіх зонах лімфатичного вузла визначалися макрофаги, моноцити (ED1), клітини – продуценти IgG і IgM, а також інтерлейкіни IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF, IL – 2RL.

Так само, як і в селезінці, визначено виражену макрофагальну реакцію, посилено ступінь плазмобластної трансформації та цитокінової реакції порівняно з інтактною групою.

Висновки. Дані імуноморфологічного дослідження свідчать про розвиток важкого септичного стану, що підтверджується вираженими дистрофічними і дегенеративними змінами строми і паренхіми, поширеним інтерстиціальним запаленням з залученням паренхіматозних структур, альтеративно-продуктивними процесами в судинах серця, печінки і нирок. Виявлено системне пошкодження строми і судин внутрішніх органів. У стромі виявлено вогнищевий фібриноїдний некроз. У судинах спостерігалось осередкове руйнування базальних мембран, проліферація ендотеліоцитів з їх осередковою десквамацією. Відзначено внутрішньосудинна фіксація CD18 нейтрофілів до поверхні. В периферичних органах імунної системи (селезінка та лімфатичні вузли) виявлено різка гіперплазія як Т-, так і В-зон на тлі вираженої макрофагальної реакції, посиленою плазматизацією і значною активацією прозапальних інтерлейкінів. Подібна закономірність з боку місцевої імунної реакції виявлена і в інтерстиції серця, нирок і печінки, де спостерігається виражена макрофагальна реакція, посилена плазматизація і активована цитокінова прозапальна система.

Перспективи подальших досліджень в даному напрямку є розробка комплексної терапії для відновлення рівня імунокомпетентних клітин та факторів неспецифічної резистентності із застосуванням імуномодуляторів та цитокінокоректорів при гнійно-септичному процесі, спричиненому *S. aureus*.

Література

1. Автандилов Г. Г. Основы патологоанатомической практики [Текст] / Г. Г. Автандилов. – Изд. 2-е. – М.: [РМАПО], 1998. – 543с., [1] с.: ил. – ISBN 5 – 7249 – 0286.
2. Бойко В. В. Распространенный гнойный перитонит / В. В. Бойко, И. А. Криворучко, С. Н. Тесленко, А. В. Сивожелезов. – Харьков : «Прапор», 2008. – 280 с.
3. Бондаренко А. Л. Актуальные вопросы этиопатогенеза и лечения сепсиса / А. Л. Бондаренко // Матеріали науч. -практ. конф. «Сепсис. Проблеми діагностики, терапії та профілактики», Харків – 2006. – С. 49-50.
4. Козлов В. К Сепсис: иммунные дисфункции в патогенезе сепсиса. Возможности диагностики / В. К. Козлов // Український журнал екстремальної медицини імені Г. О. Можаяєва. – 2005. – Т. 6, № 1. – С. 19–25.
5. Кузнецов А. А. Дискуссионные аспекты проблемы сепсиса / А. А. Кузнецов // Матеріали науч. -практ. конф. «Сепсис. Проблеми діагностики, терапії та профілактики», Харків – 2006. – С. 19-22.
6. Лилли Р. Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия [пер. с англ.] / Р. Д. Лилли. – М.: Мир, 1969. – 624 с.
7. Першин Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии / Г. Н. Першин. – М.: Медицина, 1971. – 539 с.
8. Черных Е. Р. Цитокин-зависимые механизмы Т-клеточных дисфункций при хирургическом сепсисе / Е. Р. Черных, Е. В. Курганова, В. В. Сениуков [и др.] // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 45 – 49.
9. European Study on Community-Acquired Pneumonia Committee. Guidelines for management of adult community-acquired lower respiratory tract infections // European Respiratory Journal. – 2006. – №11. – P. 986 – 991.

УДК 579. 861. 2:616-002. 3-092. 9-092. 18:612. 017

ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОСНОГО ОБ'ЄМУ ОСНОВНИХ КЛОНІВ ІМУННИХ КЛІТИН В ЗАПАЛЬНОМУ ІНФІЛЬТРАТІ СТРОМИ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПРИ ГНІЙНО-СЕПТИЧНОМУ ПРОЦЕСІ, СПРИЧИНЕНОМУ *S. aureus*

Мишина М. М.

Резюме. Дані імуноморфологічного дослідження свідчать про розвиток тяжкого септичного стану, що підтверджується вираженими дистрофічними і дегенеративними змінами строми і паренхіми, поширеним інтерстиціальним запаленням з залученням паренхіматозних структур, альтеративно- продуктивними процесами в судинах серця, печінки і нирок. Результати імуноморфологічного дослідження запального інфільтрату строми внутрішніх органів експериментальних тварин при гнійно-септичному процесі, спричиненому *S. aureus*, дозволили визначити відносні об'єми основних клонів імунних клітин й виявити з боку місцевої імунної реакції в інтерстиції серця, нирок і печінки виражену макрофагальну реакцію з посиленою плазматизацією та активацію цитокинової прозапальної системи.

Ключові слова: гнійно-септичний процес, *S. aureus*, імунні клітини.

УДК 579. 861. 2:616-002. 3-092. 9-092. 18:612. 017

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ОБЪЕМА ОСНОВНЫХ КЛОНОВ ИММУННЫХ КЛЕТОК В ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ИНФИЛЬТРАТЕ СТРОМЫ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ГНОЙНО – СЕПТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ , ВЫЗВАННОМ *S. aureus*

Мишина М. М.

Резюме. Данные иммуноморфологического исследования свидетельствуют о развитии тяжелого септического состояния, что подтверждается выраженными дистрофическими и дегенеративными изменениями строми и паренхимы, распространенным интерстициальным воспалением с привлечением паренхиматозных структур, альтеративно-продуктивными процессами в сосудах сердца, печени и почек. Результаты иммуноморфологического исследования воспалительного инфильтрата строми внутренних органов экспериментальных животных при гнойно-септическом процессе, вызванном *S. aureus*, позволили определить относительные объемы основных клонів иммунных клеток и выявить со стороны местной иммунной реакции в интерстиции сердца, почек и печени выраженную макрофагальную реакцию с усиленной плазматизацией и активацию цитокиновой провоспалительной системы.

Ключевые слова: гнойно-септический процесс, *S. aureus*, иммунные клетки.

UDC 579. 861. 2:616-002. 3-092. 9-092. 18:612. 017

Determination of the Relative Volume of the Main Clones of Immune Cells in the Inflammatory Infiltrate of the Stroma of the Internal Organs of Experimental Animals with Purulent-septic Process Caused by *S. aureus*

Mishina M. M.

Abstract. The immunomorphological study with determination of the relative volume of lymph plasmacytic macrophage infiltration in the stroma of organs of experimental animals with purulent-septic process, caused by *S. aureus*, has been carried out. The experimental studies were performed on 30 mice of inbred lines C57Bl/6JSto. The experiments were carried out in accordance with the national "Ethical Principles and Guidelines for Experiments on Animals" which correspond to guidelines of "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes". The immunomorphological study was carried out on paraffin sections with thickness of 5. 6 microns by means of Koons indirect method. The relative volumes of general

clones of the immune cells were determined by using the net of G. G. Avtandilov in the fluorescent microscope. The number of cytokine producer cells was counted within sight x400.

The study of immunomorphological state of the heart of experimental animals showed that the epicardium, which was characterized by slightly fuchsinophil stroma, was thickened by edema and eosinophilic fibrin overlays with focal-diffuse inflammatory infiltrate with dominating segmental leukocytes (CD18). There were lymphocytes (CD3, CD4, CD8, CD45RA), plasmocytes of IgM, IgG, macrophages (ED1) including polykariotic and also single colonies of *S. aureus* and producer cells IL-1 β , IL-6, TNF.

Valval and parietal endocardium with weak fuchsinophil edematous stroma, with signs of fibrinoid swelling and focal necrosis surrounded by inflammatory infiltrates of lymphocytes, histiocytes and polykariotic macrophages, in the cytoplasm of which colonies of bacteria were found.

In the liver of animals of the experimental group, frank hyperemia of the central veins and adjacent capillaries was observed. The stroma was edematous; in the portal tracts the focal-diffuse infiltration by lymphocytes (CD3, CD4, CD8, CD45RA), histiocytes with numerous macrophages (ED1) and isolated neutrophils (CD18), which were characterized by marked Brashe reaction in the cytoplasm, was detected with spreading to the interlobular connective tissue. The intravascular fixation of CD18 neutrophils to the surface was marked.

In the spleen T-lymphocytes (CD3, CD4, CD8) were located mainly in the periarterial ares of follicles. B-lymphocytes (CD45RA) were found in the light centers of the follicles and also in the red pulp. In all parts of the spleen macrophages, monocytes, producer cells of IgG and IgM, and interleukins IL-1 β , IL-6, TNF, IL-2RL, IL-4 were observed. The degree of macrophage reaction, plasmatisation reaction and also relative volume of producer cells of cytokines was significantly higher of those ones in the comparison group.

In the microscopic examination of lymph nodes, T-lymphocytes (CD3, CD4, CD8) were located mainly in the paracortical area of the cortex and in the medulla as well. B-lymphocytes (CD45RA) were found in the cortex and medulla regions. Macrophages, monocytes (ED1), producer cells of IgG and IgM were observed in all areas of the lymph node.

In the case of purulent-septic process caused by *S. aureus*, the data of the immunomorphological studies indicate the development of severe septic state, which is proved by means of marked dystrophic and degenerative changes of the stroma and parenchyma, extensive interstitial inflammation with involvement of parenchymal structures, alternative and productive processes in the vessels of the heart, liver and kidney. In addition, the intravascular fixation CD18 neutrophils to the surface was marked. Acute hyperplasia both of T- and B areas against the background of marked macrophage reaction, enhanced by plasmatisation and significant activation of proinflammatory interleukins, was detected in the peripheral immune organs (spleen and lymph nodes)

Such a regularity of the local immune response is also found in the interstitium of the heart, kidneys and liver, where marked macrophage response, enhanced plasmatisation and activated cytokine proinflammatory system are observed.

Key words: purulent – septic process, *S. aureus*, immune cells.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 27. 01. 2014 р.