

Лизосомально-катионные белки нейтрофильных гранулоцитов поверхности небных миндалин и CD31 молекулы при хроническом тонзиллите

Н.Д.Вартазарян, К.Г. Гюламирян

*Кафедра патологической анатомии ЕрГМУ и ЛОР отделение МЦ "Арабкир"
0025, Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: хронический тонзиллит, небные миндалины, лизосомально-катионные белки, CD31 молекула

Одним из клинико-морфологических проявлений стрептококковой инфекции является декомпенсированный хронический тонзиллит (тонзиллярная болезнь), основным методом лечения которой до сих пор остается тонзиллэктомия. Кроме небных миндалин воспалительный процесс охватывает все лимфоидные структуры, ассоциированные со слизистой оболочкой глотки [1,2,15]. Патогенез заболевания, механизмы формирования и поддержания патологического процесса до сих пор остаются мало выясненными [10]. Решающее значение имеют персистирующие внутритканевые стрептококковые очаги, которые помимо крипт появляются в межфолликулярной лимфоидной ткани, в трабекулах, а также в стенках и просветах мелких сосудов небных миндалин [3,15]. Механизмы развития хронического воспаления основаны на нарушениях как общего, так и местного иммунитета, касающихся неспецифических и специфических иммунных реакций, осуществляемых лейкоцитами, макрофагами, Т- и В-лимфоцитами [17]. Среди многочисленных неспецифических антимикробных факторов слизистой оболочки глотки и миндалин важное место занимают лизосомально-катионные белки (ЛКБ) лейкоцитов, которые в ассоциации с макрофагами, осуществляют местную защитную функцию. Происходит внесосудистая миграция лейкоцитов с участием CD31-тромбоцит-эндотелиальной клеточно-адгезивной молекулы (PECAM-1) [8], изучение которой, наряду с нейтрофилами, представляет большой интерес. Необходимость исследования указанных

факторов можно обосновать тем, что при хроническом тонзиллите воспаление не ограничено лишь небными миндалинами, а охватывает всю слизистую глотки и ее лимфоидные структуры. Поэтому для получения целостного представления о характере очага инфекции, особенно фарингита, наряду с клиническими методами исследования больных, нужно иметь также информацию о характере клеточной популяции и микробного пейзажа поверхности небных миндалин. Цито-бактериоскопическая верификация очаговой инфекции зева у больных, страдающих хроническим тонзиллитом, позволит более конкретно оценить результаты проведенного дооперационного консервативного лечения, судить об активности воспаления и определить показания тонзиллэктомии.

Цель работы дооперационное цито-бактериоскопическое исследование мазков из слизистой зева больных хроническим декомпенсированным тонзиллитом для выяснения результатов консервативного лечения на основании характера клеточной популяции, ЛКБ нейтрофильных гранулоцитов и микробного пейзажа с их сопоставлением с CD31 и морфологическими изменениями в небных миндалинах, удаленных при тонзиллэктомии.

Материал и методы

Исследовались 87 больных детей, страдающих декомпенсированным хроническим тонзиллитом (по классификации И.Б.Солдатова), поступивших

в ЛОР отделение Детской клинической больницы "Арабкир" после дооперационного консервативного лечения. У всех больных непосредственно перед тонзиллэктомией на предметные стекла брались мазки с поверхности слизистой зева и небных миндалин. Ставился лизосомально-катионный тест по Пигаревскому с окрашиванием мазка спиртовым раствором прочного зеленого и азуром А, при котором ЛКБ гранул нейтрофильных гранулоцитов (лизосомы) окрашивались в ярко-зеленый цвет. Удаленные небные миндалины делились на две части. Одна половина кусочка фиксировалась в 10% забуференном нейтральном формалине и заливалась в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону и толудиновым синим. Другая половина биоптата замораживалась при -20°C , затем готовились криостатные срезы толщиной 4-5 мкм. Для определения CD31+антигена в парафиновых и криостатных срезах пользовались иммуногистохимическими методами: а) непрямая реакция иммунофлуоресценции и б) авидин-биотин пероксидазный комплекс с использованием мышиных моноклональных античеловеческих CD31 антител (Clone JC/70A, isotype: IgG1, kappa, DAKO, Denmark) и диаминобензидина как хромогена. В контрольных срезах вместо первичных антител использовали раствор бычьего сывороточного

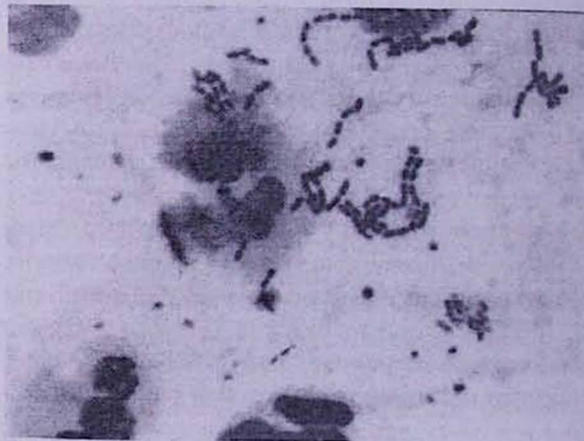
альбумина (kit "Zimed" USA). Иммуногистохимические реакции на парафиновых срезах проводили после их предварительного кипячения под давлением в течение 8 минут с последующим докрасиванием гематоксилином. Срезы обезжировали и заключали в полистирол. При определении CD31 адгезивных молекул в не прямой реакции иммунофлуоресценции криостатные срезы после нанесения мышиной античеловеческой моноклональной сыворотки промывались физиологическим раствором и на них наслаивалась меченая флуоресцеином антимышинная кроличья сыворотка. Предварительно определялось рабочее разведение сывороток до полного отсутствия неспецифического свечения.

Результаты и обсуждение

При цито-бактериоскопическом исследовании мазков с поверхности зева и небных миндалин детей, больных декомпенсированным хроническим тонзиллитом, у 19,3% определялись воспалительные клетки, состоящие главным образом из нейтрофильных гранулоцитов, единичных макрофагов, лимфоцитов и клеток слущенного плоского эпителия (рис. 1а). В 29 случаях выявлялся широкий спектр микроорганизмов, однако, в подавляющем большинстве случаев и грам + и грам - стрептококки (рис. 1б). Микробы встречались как



а



б

Рис.1. Мазок из зева больного декомпенсированным хроническим тонзиллитом: а – дегранулирующие ЛКБ+ нейтрофильные гранулоциты, х 400; б – микробы поверхности небных миндалин. Окраска прочным зеленым по Пигаревскому, х 1000

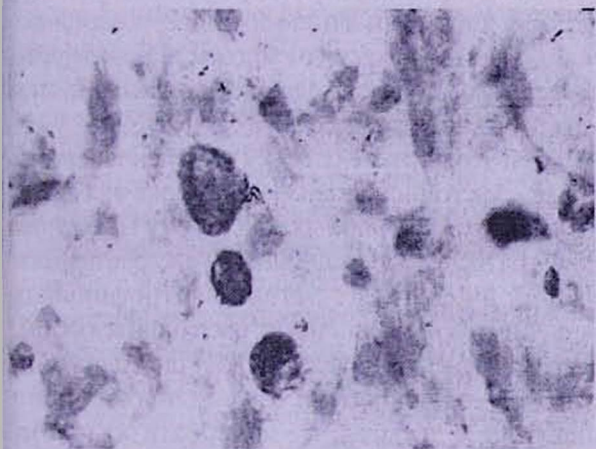
внеклеточно, так и в цитоплазме единичных лейкоцитов, макрофагов, а также редких эпителиоцитов. В мазках, окрашенных методом Пигаревского, в 58 случаях выделялись множественные скопления нейтрофильных гранулоцитов, содержащих ЛКБ. Большинство из них активно дегранулировали. В этих участках обнаруживались также распавшиеся нейтрофилы и множественные катионизированные внеклеточные микроорганизмы, окрашенные в зеленый цвет. У 16,48% больных в мазках ЛКБ+ нейтрофильные гранулоциты или не обнаруживались, или же были единичными, хотя количество лейкоцитов было значительное.

Сопоставляя результаты цито-бактериоскопического исследования мазков с поверхности небных миндалин, в зависимости от наличия нейтрофильных гранулоцитов, активности ЛКБ, клеток с CD31+ адгезивными молекулами и морфологических изменений в тканях небных миндалин, больных, страдающих декомпенсированным хроническим тонзиллитом, можно разделить на 3 группы:

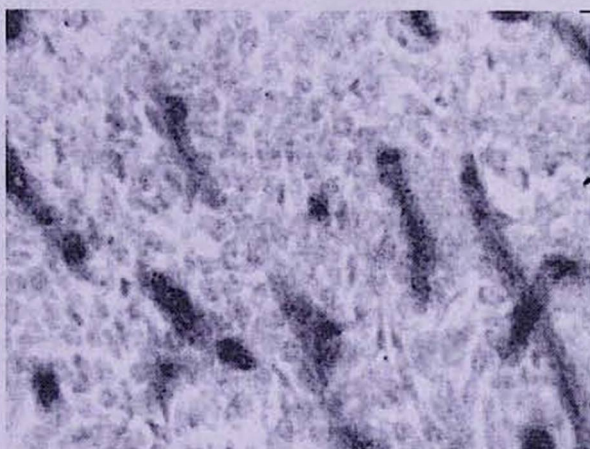
I. Скопление значительного количества функционально активных нейтрофильных гранулоцитов

содержащих ЛКБ. В поле зрения микроскопа выявляются микроорганизмы при наличии фагоцитированных особей. Большинство внеклеточных микроорганизмов катионизированные, окрашены в зеленый цвет. Определяются единичные CD31+ клетки. При параллельном морфогистохимическом исследовании удаленных небных миндалин в межфолликулярной лимфоидной ткани в стенках и просветах крипт встречаются единичные ЛКБ+ нейтрофильные гранулоциты. Эндотелиоциты большинства сосудов реагируют с CD31 антисывороткой.

II. В мазках с поверхности небных миндалин ЛКБ+ нейтрофильные гранулоциты встречаются в малом количестве. Микроорганизмы покрывают все поле зрения микроскопа, местами образуя колонии. Как у первой группы больных, здесь также встречаются единичные CD31+ клетки. Существенно не отличаются также морфологические и гистохимические изменения в тканях небных миндалин. В межфолликулярной лимфоидной ткани наблюдается лишь некоторое увеличение количества сосудов с CD31+ эндотелиальными клетками (рис. 2 а, б).



а



б

Рис. 2. Экспрессия CD31 (PECAM-1) антигена на: а – лимфоцитах и гранулоцитах поверхности и б – в эндотелии сосудов межфолликулярной лимфоидной ткани небной миндалины больного декомпенсированным хроническим тонзиллитом. Авидин - биотин пероксидазный комплекс с мышиными моноклональными CD31 античеловеческими антителами (Clone JC/70A, DAKO, Denmark), x 400

III. В мазках с поверхности небных миндалин нейтрофильные гранулоциты редкие. Выделяются макрофаги с большим количеством цитоплазматических, ярко-зеленых зернистых включений. Наряду с гранулами ЛКБ и катионизированными микробами в их цитоплазме выявляются и фагоцитированные, некатонизированные микроорганизмы синего цвета. Большинство фагоцитов тесно контактируют с окружающими 3-4 лимфоцитами (рис. 3). Встречаются редкие CD31+ клетки. В среде множественные микробы, местами образующие колонии. В таких миндалинах иммунореактивные CD31+ эндотелиальные клетки сосудов определяются мало. Воспалительный процесс слабо выражен.



Рис. 3. Феномен межклеточного взаимодействия в виде контактов фагоцита с лимфоцитами. Фагоциты с высоким содержанием лизосомально катионных белков (зеленые гранулы) и единичными фагоцитированными микробами. В межклеточной среде катионизированные микроорганизмы и клетки в состоянии распада. Мазок с поверхности небной миндалины больного декомпенсированным хроническим тонзиллитом. Окраска прочным зеленым по Пигаревскому, х 1000

Приведенные данные указывают, что имеется обратная зависимость между количеством клеток, содержащих ЛКБ, и обсемененностью слизистой зева микробами. При наличии в мазках большого количества клеток, содержащих ЛКБ, микробы встречаются редко. И наоборот, где ЛКБ+ нейтрофильных гранулоцитов мало, микроорганизмы покрывают все поле зрения. Эти данные позволяют считать, что эффективность проведенного дооперационного антибактериального консервативного

лечения больных, страдающих декомпенсированным хроническим тонзиллитом, находится в прямой зависимости от активности ЛКБ поверхностных воспалительных клеток слизистой оболочки зева. Именно здесь проявляется основная функция ЛКБ – модификация ферментативных процессов в клетке и сильное бактерицидное действие, основанное на нарушении структуры и функции мембран микробной клетки [5]. Однако в удаленных небных миндалинах тех же больных в покровном эпителии и просвете крипт, в лимфоидной и соединительной ткани лейкоциты встречались исключительно редко. Рассматривая лимфаденоидное глоточное кольцо как единое целое с позиции ее вовлечения в воспалительный процесс при хроническом тонзиллите, можно считать, что на поверхности небных миндалин они могут мигрировать из всех воспалительных участков слизистой оболочки глотки. Источником клеток, несомненно, могут являться очаги воспаления как в лимфоидных структурах, так и слизистой оболочке. Формируемый миндалинами иммунный барьер слизистой оболочки распространяется и на миндалины как таковые, поскольку они сами интегрированы в слизистую оболочку [2]. При этом количественные соотношения нейтрофильных гранулоцитов с клетками, содержащими ЛКБ, и микроорганизмами в поле зрения существенно меняются в зависимости от множества факторов, в конечном итоге определяющих активность воспалительного процесса.

Небезынтересным является выявленный нами факт межклеточного взаимодействия в мазках из слизи поверхности небных миндалин у III группы больных. После дооперационного консервативного лечения, на фоне отсутствия нейтрофильных гранулоцитов или наличия их распавшихся форм, обнаруживались макрофаги с ЛКБ+ цитоплазматическими включениями и фагоцитированными микробами. Учитывая, что макрофаги обычно не содержат ЛКБ [6], наличие в их цитоплазме зеленых включений ЛКБ можно считать результатом их фагоцитоза вместе с катионизированными микроорганизмами поверхности слизистой оболочки. Большинство таких фагоцитов находилось в окружении 3-4 контактирующих с ними лимфоцитов. Последние относятся к популяции CD4+ Т- лимфоцитов, так как именно они взаимодействуют с макрофагами, в цитоплазме

которых фрагментированные антигены фагоцитированных и переваренных микроорганизмов комплексируясь с молекулами МНС-II класса, презентуются на клеточную поверхность [11]. Представление антигена молекулами МНС-II осуществляется при развитии защитных иммунных реакций на внеклеточные инфекции. Поскольку комплекс антиген-пептид-молекулы МНС-II распознается CD4+ Т-лимфоцитами, то и в защите от внеклеточных инфекций главную роль играют реакции, обеспечиваемые CD4+ Т-лимфоцитами. Кроме того, общеизвестна передача информации антигенпредставляющими макрофагами также Т- и В-лимфоцитам, которая происходит в пределах крипт миндалин [16]. Активированные таким путем лимфоциты осуществляют клональную экспрессию, приобретая эффекторную иммунную функцию и память [13,14,16,17].

Полученные нами данные наводят на мысль, что уже с поверхности слизистой оболочки зева, которая обсеменена многочисленными авирулентными и вирулентными микроорганизмами, вслед за нейтрофильными гранулоцитами и их распадом, включаются механизмы лимфоцитарного иммунитета лимфоцитами с функцией молекулярного распознавания. Такое взаимодействие макрофагов с лимфоцитами вне тканей на поверхности миндалин можно считать доиммунным начальным механизмом физиологической резистентности организма к инфекциям, где ЛКБ играют существенную роль. Формирование лимфоцитарного иммунитета с феноменом иммунологической памяти направлено на эффективность санации организма от патогенов, предотвращение патологического инфекционного процесса. Эти данные дополняют имеющиеся до сих пор представления о доиммунных механизмах физиологической резистентности, санации организма от инфекционных агентов и продуктов повреждения собственных клеток [7], которые при хроническом тонзиллите проявляются более интенсивно, как местная иммунная подсистема защиты на поверхности миндалин и слизистой оболочки глотки. В этом процессе заметно участие CD31+ (PECAM-1) молекул сосудов межфолликулярной лимфоидной ткани, которые наряду с эндотелиоцитами, экспрессированы также на единичных моноцитах, лимфоцитах и гранулоцитах, инфильтрирующих

поверхность слизистой оболочки. Молекулы адгезии, обеспечивая контакты эндотелиальных клеток между собой и лейкоцитов с эндотелием сосуда, пенетрацию базальной мембраны [8,9], обуславливают преодоление эндотелиального барьера и выход клеток в очаг воспаления.

Фактически проявляется особенность эндотелиальных клеток, которые мобилизуют клетки иммунной системы к участкам воспаления путем экспрессии молекул адгезии. Как важный механизм антимикробной защиты организма она усиливается при хроническом тонзиллите, сопровождаемая ангиогенезом межфолликулярной лимфоидной ткани, где образование новых сосудов имеет компенсаторный и приспособительный характер [4]. Об этом свидетельствует увеличение количества сосудов, экспрессирующих молекулы клеточной адгезии эндотелиоцитов в миндалинах с признаками активации воспалительного процесса.

Таким образом, цито-бактериоскопическое исследование мазков с поверхности зева и небных миндалин при декомпенсированном хроническом тонзиллите позволяет наряду с микроорганизмами определить наличие и характер воспалительного процесса в пределах лимфоцитарного кольца и судить об эффективности дооперационного консервативного лечения. Наличие ЛКБ+ нейтрофильных гранулоцитов на слизистой зева является показателем доиммунной физиологической резистентности организма к инфекциям. Они коррелируют с CD31+ адгезивными молекулами эндотелиоцитов сосудов межфолликулярной лимфоидной ткани небных миндалин, которые заметно увеличиваются при декомпенсированном хроническом тонзиллите наряду с ангиогенезом. В местной иммунной подсистеме антимикробной защиты слизистой зева существенную роль играет включение механизмов лимфоцитарного иммунитета, проявляющегося взаимодействием лимфоцитов с макрофагами с фагоцитированными катионизированными микроорганизмами. Однако выявленный нами факт межклеточного взаимодействия вне тканей, на поверхности эпителиального покрова, дополняет представления о физиологических механизмах антимикробной резистентности организма, которая становится неполноценной при хроническом тонзиллите.

Поступила 29.06.07

Քմային նշիկների մակերեսի նեյտրոֆիլ գրանուլոցիտների լիզոսոմային կատիոնային սպիտակուցները և CD31 մոլեկուլները խրոնիկական նշիկաբորբի ժամանակ

Ն.Դ. Վարդապետյան, Կ.Հ. Գյուլամիրյան

Դեկոմպենսացված խրոնիկական նշիկաբորբով 87 երեխաների մոտ կատարվել է քմային նշիկների մակերեսի քսուքների բջջաբանական եվ բակտերիոսկոպիկ ուսումնասիրություն, արդյունքները համադրելով հեռացված նշիկների ձևաբանական փոփոխությունների հետ: Դա հնարավորություն է տվել որոշելու ավշաբնայանային օղի սահմաններում բորբոքային պրոցեսի ակտիվությունը և մինչև վիրահատական կոնսերվատիվ բուժման արդյունավետությունը: Լիզոսոմային կատիոնային սպիտակուցներ պարունակող նեյտրոֆիլ գրանուլոցիտների առկայությունը գնահատվել է որպես վարակի հանդեպ օրգանիզմի մինչև մոնային ֆիզիոլոգիական ռեզիստենտության ցուցանիշ: Դրանք համահարաբերվել են քմային նշիկների միջֆոլիկուլային ավշային հյուսվածքի անոթների էնդոթելիոցիտների CD31 ադհեզիվ մոլեկուլների հետ, որոնք անգիոգենեզի

զուգահեռ ավելանում են խրոնիկական դեկոմպենսացված նշիկաբորբի ժամանակ:

Ընթացիկ լորձաթաղանթի հակամանրէային պաշտպանության տեղային իմունային ենթահամակարգում էական է լիմֆոցիտար իմունիտետի մեխանիզմների ներառումը, որն արտահայտում է կատիոնիզացված միկրոօրգանիզմներ պարունակող մակրոֆագերի և լիմֆոցիտների փոխազդեցությամբ:

Նշիկների մակերեսին, հյուսվածքներից դուրս, միջբջջային փոխազդեցության այս փաստը լրացնում է օրգանիզմի հակամանրէային ռեզիստենտության ֆիզիոլոգիական մեխանիզմների մասին եղած պատկերացումները, որի որոշումը ձեռք է բերում կարևոր գործնական նշանակություն, ախտորոշելու ու գնահատելու համար խրոնիկական նշիկաբորբի ժամանակ մինչև վիրահատական շրջանում տարված բուժման արդյունքները:

Lisosomal cationic proteins and CD31 molecules of neutrophil granulocytes of palatine tonsils surface in chronic tonsillitis

N.D. Vartazarian, K.H. Gulamirian

A research has been conducted among 87 children that suffer with chronic decompensative tonsillitis. Comparing the results of cytological and bacterioscopic investigation of palatine tonsils' surface with morphological changes of removed tonsils we were able to define activation of inflammatory process in pharynx and the significance of pre-operative treatment. The presence of neutrophil granulocytes containing lisosomal cationic proteins is considered as an index of pre-immune physiological resistance of the organism to the infection. There are correlations with endotheliocytes CD31 adhesive molecules interfollicular lymphoid tissue vessels of palatine tonsils, which

increase during chronic decompensative tonsillitis. The including of mechanisms of lymphocytic immunity takes great part in the local immune subsystem of antimicrobial protection of pharyngeal mucosa, which is manifested by correlation of lymphocytes and macrophages including cationised microbes. The fact of intercellular interaction outside the tissue (on the surface of tonsils) completes the conception of physiological mechanism of antimicrobial resistance of the organism, which is of a great practical importance for defining and evaluation of the efficiency of pre-operational conservative treatment of chronic tonsillitis.

Литература

1. Быкова В.П. Лимфоглоточное кольцо Пирогова-Вальдейера в системе местного иммунитета слизистых оболочек. Материалы I съезда Международного союза ассоциаций патологоанатомов, М., 1995, с.20-21.
2. Быкова В.П. Миндалины лимфаденоидного глоточного кольца Вальдейера в системе мукозального иммунитета верхних дыхательных путей. Труды II съезда Российского общества патологоанатомов, 2006, т. 1, с. 98-101.
3. Вартазарян Н.Д. Изменения небных миндалин и внутриканальные микробные очаги при хроническом тонзиллите. Архив патологии, 1981, 5, с. 10-15.
4. Вартазарян Н.Д., Арсенян К.А., Амбарцумян С.В. Иммуноморфологическая характеристика эндогенно активных факторов сосудистого барьера небных миндалин при декомпенсированном хроническом тонзиллите. Труды II съезда Российского общества патологоанатомов, 2006, т. 1, с. 109-111.
5. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М., 1978.
6. Пигаревский В.Е. Полиморфоядерный лейкоцит и макрофаг в реакциях воспаления и гиперчувствительности. Архив патологии, 1983, 11, с. 14-22.
7. Хаитов Р.М., Игнатова Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология М., 2000.
8. Bevilacqua M.P., Stengelin S., Gimbrone M.A., Seed B. Endothelial adhesion molecule 1 an inducible receptor for neutrophil related complement regulatory, Science, 2004, 247, 4895, p.1160-1165.
9. Brown E.J. Adhesive interactions in the immune system, Trends Cell. Biol., 1997, 7, p. 289-295.
10. Gaffney R.J., Cafferkey M.T. Bacteriology of normal and diseased tonsils assessed by fine-needle aspiration: Haemophilus influenzae and the pathogenesis of recurrent acute tonsillitis, Clin. Otolaryngol. Allied. Sci., 1998, 23:181-185.
11. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra J.D. Immunology. The immune system in health and disease, Current Biology Lim., 1999.
12. Janeway C.A., Kupfer C. et al. T-cell development, survival and signaling. A new concepts of the role of self-peptide: self-MHC complexes, The Immunologist, 1998, 6, 6, p.5-12.
13. Johansson-Lindbom B., Ingvarsson S., Borrebaeck C.A. Germinal centers regulate human Th2 development, J. Immunol., 2003, 171:1657-1666.
14. Hallman M., Ramet M., Ezekowitz R.A. Toll-like receptors as sensors of pathogens, Pediatr. Res., 2001, 50:315-321.
15. Lindroos R. Bacteriology of the tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hyperplasia—a short review, Acta Otolaryngol., Suppl., 2000, 543:206-208.
16. Liu Y.J., Banchemau J. The paths and molecular controls of peripheral b-cell development, The Immunologist, 1996, 4:55-66.
17. von Andrian U.H., Mempel T.R. Homing and cellular traffic in lymph nodes, Nat. Rev. Immunol., 2003, 3:867-878.