

УДК 616.24 – 002.828-091: 611.018.53/.24: 57.084/.087

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛЕГКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ЛЕГОЧНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ФОРМЕ КАНДИДОЗА, ВЫЗВАННОГО CANDIDA ALBICANS

Ковнер А.В., Потапова О.В., Шкурупий В.А.

*ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН, Новосибирск,
e-mail: anya.kovner@gmail.com*

Методами иммуногистохимии, световой микроскопии и морфометрии были изучены патоморфологические изменения легких, клеточный состав, диаметр и численность гранул, а также функциональный статус легочных макрофагов самцов мышей линии СВА, инфицированных высоко патогенным *C. albicans*. Было показано, что численность макрофагов, экспрессирующих лизосомальные белки и индуцибельную NO-синтазу (iNOS) преимущественно увеличивалась через сутки после инфицирования, тогда как максимальное количество клеток с экспрессией эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) увеличивалось на 10 сутки эксперимента.

Ключевые слова: кандидоз, экспрессия лизосомальных энзимов, NO-синтазы, легочные макрофаги

PATHOMORPHOLOGICAL LUNG CHANGES AND FUNCTIONAL STATUS OF PULMONARY MACROPHAGES IN GENERALIZED CANDIDIASIS CAUSED BY CANDIDA ALBICANS

Kovner A.V., Potapova O.V., Shkurupiy V.A.

*Scientific Center of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of
Sciences, Novosibirsk, e-mail: anya.kovner@gmail.com*

By immunohistochemistry, light microscopy and morphometry have been studied pathological lung changes, the cellular composition, diameter and numerical density of granulomas and also the functional activity of lung macrophages when infected male mice CBA highly pathogenic *C. albicans*. It is shown that the number of macrophages expressing lysosomal enzymes, advantageously increases a day after infection, as well as the number of cells expressing inducible isoform of NO-synthase (iNOS), and the maximum number of cells expressing endothelial isoform of NO-synthase (eNOS) is revealed at the 10th day of the experiment.

Keywords: candidiasis, expression of lysosomal enzymes, NO-synthase, pulmonary macrophages

Одними из наиболее распространенных патогенных грибов для человека являются различные виды *Candida* [1]. *C. albicans* – диморфный комменсал, который относится к условно патогенной микрофлоре [2]. Висцеральный кандидоз относится к числу оппортунистических микозов и развивается, в основном, у больных в отделениях интенсивной терапии – больных с полиэтиологичными иммунодефицитными состояниями, особенно у детей и лиц пожилого возраста. Проблема усложняется высокой адаптационной способностью этих грибов, их способностью к внутриклеточному паразитированию, отсутствием эффективных средств лечения в связи с плохой изученностью патогенеза. Актуальность проблемы обусловлена непрерывным ростом частоты этих осложнений и сохраняющейся высокой летальностью [3].

Основой патогенеза микотического воспаления является внутриклеточное персистирование микромицетов в клетках системы мононуклеарных фагоцитов [4]. Внутриклеточное паразитирование

C. albicans возможно при неэффективности макрофагальных кислород-зависимых и кислород-независимых систем вакуолярного аппарата.

Поскольку антимикотическая терапия у большинства больных, страдающих висцеральными микозами, зачастую не приносит успеха и сопряжена с рисками развития осложнения – представляется полезным исследование состояния естественных механизмов антимикотической защиты реализуемых макрофагами.

Цель исследования – изучить изменения кислород-зависимых и кислород-независимых факторов защиты в легких мышей при генерализованном висцеральном кандидозе.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 70 мышах-самцах линии СВА двухмесячного возраста с массой тела 20-25 г, полученных из питомника Научно-исследовательского института клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск.

Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и пище. Перед про-

ведением эксперимента их адаптировали к условиям содержания в течение 2х недель. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинской декларацией (1964) и его протоколы были утверждены соответствующими комитетами по этике ФГБУ НЦКЭМ СО РАМН.

В качестве инфекционного агента был выбран высокопатогенный штамм *Candida albicans* РКПГУ-1129/13 (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург). Для достижения системного поражения инфицирование мышей проводили внутривенно (в хвостовую вену) в дозе $12,5 \cdot 10^6$ микробных тел в 0,5 мл 0,05% водного раствора хлористого натрия (NaCl). Контролем служили двухмесячные интактные мыши-самцы линии СВА.

Объектом исследования были легкие экспериментальных животных. Образцы легких забирали через 1, 3, 7 и 10 суток после инфицирования. Животных выводили из эксперимента путем дислокации позвонков в шейном отделе.

Образцы органов фиксировали в 10% водном нейтральном растворе формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ксилолах при помощи аппарата для автоматической проводки STP-120 («Micotom», Германия), затем помещали в синтетическую парафиновую среду («HISTOMIX», Россия).

Для светооптического исследования срезы толщиной 3,5 мкм готовили на ротационном микротоме («Micotom», Германия), окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизон (для выявления волокон соединительной ткани).

Методом иммуногистохимии (ИГХ) с использованием непрямого стрептавидин-пероксидазного комплекса с помощью специфических первичных антител к маркерам: индуцибельной NO-синтазы (iNOS) («Novocastra»), эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) («Abcam»), Cathepsin D («DBS»), Myeloperoxidase («DBS»), Lysozyme («DBS»), TNF- α («SpringBioScience») исследовали концентрацию легочных макрофагов, экспрессирующих комплексы (антиген-антитело). Для проведения ИГХ исследования срезы легких подвергали депарафинизации, регидратации, демаскировке антигенов в микроволновой печи мощностью 700W. Время экспозиции с первичными антителами составляло 30 мин при температуре 37°C. Затем срезы инкуби-

ровали со стрептавидин–пероксидазным комплексом, DAB–субстратом и дополнительно докрашивали гематоксилином Майера.

Срезы образцов органов изучали на микроскопе – AxioImager A1 с фотокамерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрию структурных элементов легкого осуществляли с помощью окулярной сетки на 100 точек площадью $3,52 \cdot 10^4$ мкм² [5] и инструментов программы AxioVision (rel. 4.12). Учитывали численную плотность (Nai) и клеточный состав гранулем и их размеры, объемную плотность (Vv) локусов с патологическими изменениями (кровоизлияния, инфильтраты и разрастание соединительной ткани), а также количество клеток, экспрессирующих исследуемые маркеры. Средние величины исследованных параметров вычисляли с использованием стандартного пакета программ «Statistica» вероятность достоверности различия сравниваемых средних величин определяли по t-критерию Стьюдента и при условии нормального распределения величин исследуемых параметров, кроме того проводили корреляционный анализ по Пирсу. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Генерализованный характер микотического воспаления был подтвержден наличием гранулем во внутренних органах, в частности печени, почках и легких, где наблюдали различные формы грибов.

Численная плотность гранулем в легких инфицированных животных увеличивалась с 1 по 10 сутки эксперимента в 7,8 раза, увеличивался их диаметр, по величине которого судили о размерах гранулем, к 10 суткам инфекционного процесса на 30% (табл. 1). Эти данные позволяют сделать предположение о том, что в крови вплоть до 10 суток циркулировали бактериальные тела, поскольку с 7 по 10 сутки количество гранулем увеличилось на 72%, а формирование гранулем происходило достаточно быстро, поскольку их размер за этот же период увеличился только на 6%.

Таблица 1

Результаты исследования численных плотностей и диаметров гранулем в легких мышей-самцов линии СВА, инфицированных высокопатогенным штаммом *C. albicans* РКПГУ-1129/13 ($M \pm m$)

Орган	Сроки исследования (сутки после инфицирования)	Численная плотность гранулем, (Nai)	Диаметр гранулем
Легкие	1	$0,4 \pm 0,1$	$15,25 \pm 0,7$
	3	$1,5 \pm 0,1^a$	$16,86 \pm 0,4^a$
	7	$1,8 \pm 0,2^a$	$18,76 \pm 0,4^a$
	10	$3,1 \pm 0,2^a$	$19,73 \pm 0,3^a$

Примечание. «а» – достоверные различия величин исследованных параметров по срокам эксперимента, при $p < 0,05$.

На протяжении всего эксперимента среди клеток гранулемы в легких мышей, инфицированных *C. albicans*, преобладали макрофаги, количество которых к 10 суткам увеличивалось на 50 % (табл. 2). В то время как количество лимфоцитов и нейтрофилов уменьшалось в 1,4 и 3 раза соответственно (табл. 2). Возможно, уменьшение количества лимфоцитов связано с недостаточностью иммунного ответа и имму-

носупрессорным воздействием грибов *C. albicans*, выделяемых ими токсинов и повышающейся цитотоксичностью [6]. Увеличивалось и количество эпителиоидных клеток в гранулемах к 10 суткам заболевания в 10,3 раза. Единичные фибробласты наблюдали в ранние периоды исследования, а к 10 суткам эксперимента их количество увеличивалось в 3,3 раза (табл. 2).

Таблица 2

Клеточный состав гранулем в легких мышей линии СВА, инфицированных высокопатогенным штаммом *C. albicans* РКПГУ-1129/13 ($M \pm m$)

Клеточный состав гранулем (%)	Сроки исследования (сутки после инфицирования мышей)			
	1	3	7	10
Эпителиоидные клетки	$0,4 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,5$	$5,3 \pm 1,1^a$	$7,5 \pm 0,9^a$
Макрофаги	$55,3 \pm 1,1$	$60,1 \pm 1,3^a$	$64,5 \pm 1,7^a$	$68,7 \pm 1,1^a$
Лимфоциты	$19 \pm 0,9$	$17,3 \pm 1,2$	$14,2 \pm 1,5^a$	$10,1 \pm 1,1^a$
Нейтрофилы	$25,7 \pm 1,3$	$20,8 \pm 1,2^a$	$13,9 \pm 1,2^a$	$10,3 \pm 1,1^a$
Фибробласты	$0,7 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,4$	$2,1 \pm 1,4$	$3,3 \pm 1,1$

Примечание. «а» – достоверность различий параметров по срокам, при $p < 0,05$.

Через сутки после инфицирования мышей линии СВА в интерстиции легких регистрировали инфильтраты, преимущественно нейтрофильно-макрофагального характера, масштабы которых были неизменными с 1 по 10 сутки. Также наблюдали наличие кровоизлияний, максимальный масштаб которых был на 7 сутки исследования (в 2 раза), с дальнейшим незначительным уменьшени-

ем к 10 суткам эксперимента (рис. 1). В совокупности это свидетельствует об остром характере воспаления и является морфологическим свидетельством состояния острой дыхательной недостаточности.

Наряду с этим увеличивалась содержание волокнистой соединительной ткани в интерстиция легких с 1 по 10 сутки эксперимента в 3,5 раза (рис. 1).

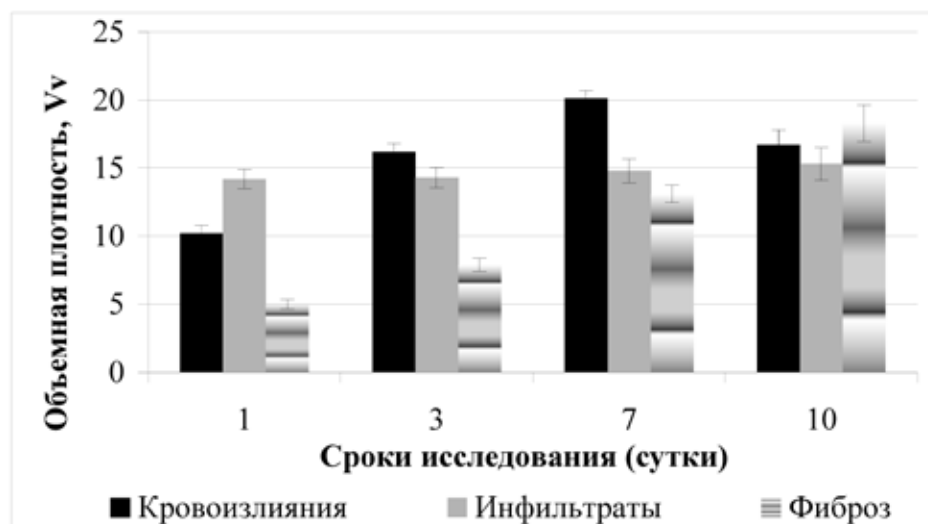


Рис. 1. Объемная плотность локусов кровоизлияний, клеточных инфильтратов и фиброза в легких мышей линии СВА, инфицированных *C. albicans*

Клетки системы мононуклеарных фагоцитов – одна из первых линий противогрибковой защиты. В легких они представлены макрофагами, которые проявляют свои фунгицидные свойства за счет окислительных (NO-синтазы) и неокислительных (лизосомальные ферменты) механизмов.

Раньше в противогрибковую защиту вступают лизосомальные ферменты: количество клеток, экспрессирующих cathepsin D и myeloperoxidase было максимальным в 1 сутки эксперимента. Количество макрофагов, экспрессирующих cathepsin D к 10 суткам эксперимента уменьшалось в 2,7 раза.

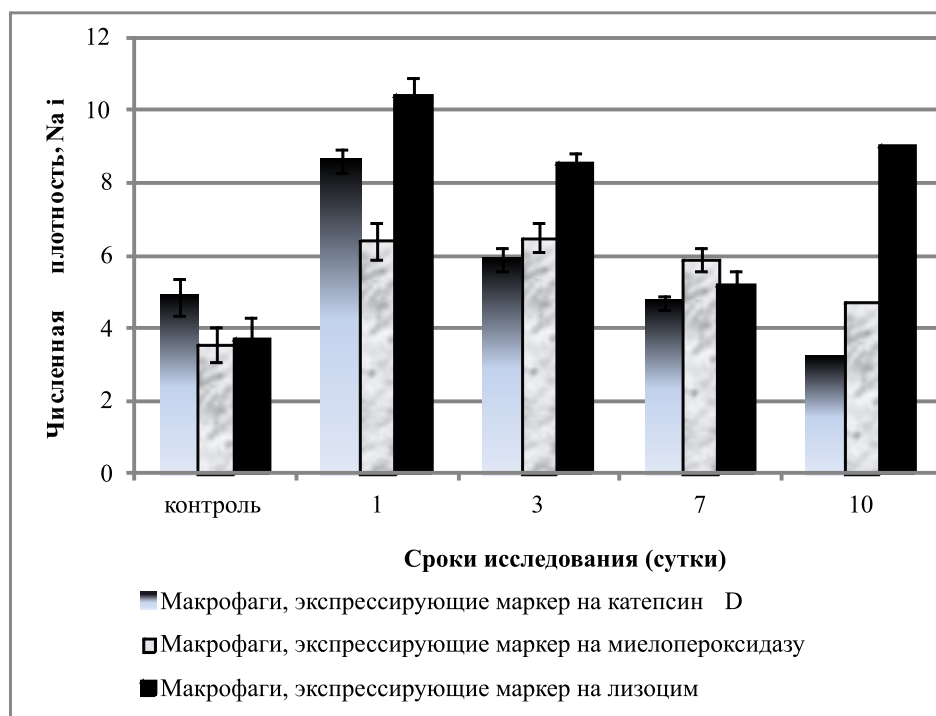


Рис. 2. Численная плотность легочных макрофагов, экспрессирующих маркеры лизосомальных ферментов (гидролаз) у мышей линии CBA, инфицированных *C. Albicans*

Количество макрофагов, экспрессирующих lysozyme уменьшалось к 7 суткам эксперимента и увеличивалось к 10 суткам (рис. 2). Однако экспрессия лизосомальных ферментов являлась недостаточной для сдерживания развития инфекции.

С 1 суток эксперимента, в клетках интерстиция и гранулем легких отмечали положительную реакцию с антителами к эндотелиальной и индуцибельной изоформам NO-синтаз (eNOS и iNOS). Количество макрофагов, экспрессирующих eNOS увеличивалось к 10 суткам эксперимента в 1,6 раза. Однако к 10 суткам эксперимен-

та, по мере созревания гранул в эпителиоидно-макрофагальные, наблюдали снижение активности iNOS на 30% (рис. 3).

Фактически экспрессия индуцибельной изоформы вышла на плато и можно предположить, что эффекты NO носят пролонгированный характер и экспрессия обеих NO-синтаз на более поздние сутки исследования будут увеличиваться. С другой стороны, исследования последних лет показывают, что повышенная экспрессия TNF- α блокирует ген, отвечающий за экспрессию индуцибельной изоформы NO-синтазы [7].

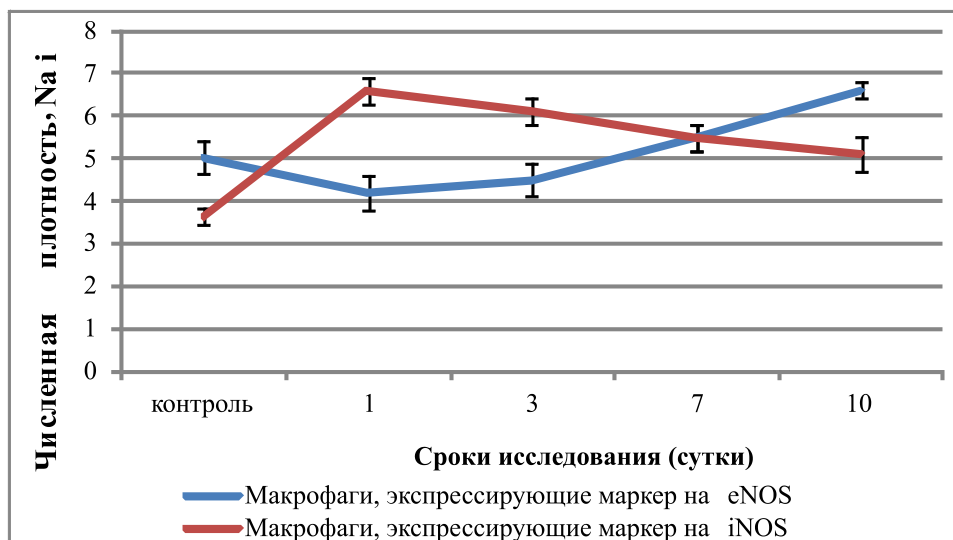


Рис. 3. Численная плотность легочных макрофагов с экспрессией маркеров на NO-синтазы у мышей линии СВА, инфицированных *Candida Albicans*

Следует отметить, что эпителиоидные клетки показали крайне слабую реакцию на NO-синтазы, что может быть связано со способностью *C. albicans* блокировать фунгицидные системы макрофагов и в дальнейшем приводить к незавершенности фагоцитоза и внутриклеточной персистенции гриба в фагоцитах, способствуя диссеминации возбудителя.

Заключение

Таким образом, при инвазивных микозах на ранних стадиях инфекционного процесса происходит активация лизосомальных ферментов и системы оксида азота преимущественно в макрофагах, а их секреция на ранних этапах исследования носит защитный характер, оказывая фунгицидный эффект на *C. Albicans*.

По мере развития заболевания, связанного с незавершенностью фагоцитоза из-за чрезмерной секреции NO и недостаточности лизосомальных ферментов, а также диссеминации возбудителя, происходит увеличение количества гранул, что приводит к легочной недостаточности, в связи с раз-

витием легочного фиброза и прогрессирующих патоморфологических изменений.

Список литературы

1. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study // Clin. Infect. Dis. – 2004. – 39. – P. 309-317.
2. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. – М.: Триада-Х. – 2000. – 472 с.
3. Hajjeh R.A., Sofair A.N., Harrison L.H. et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program // J. Clin. Microbiol. – 2004. – 42(4). – P. 1519-1527.
4. Szabo I., Guan L. and Rogers T.J. 1995. Modulation of macrophage phagocytic activity by cell wall components of *Candida albicans* // Cell Immunol. – 1995. – 164(2). – P. 182-188.
5. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина. – 2001. – 379с.
6. Лебедева Т.Н. Иммуитет при кандидозе (обзор) // Проблемы Медицинской Микологии. – 2004. – 6(4). – P. 8-16.
7. Joshi M., Kotha S.R., Malireddy S. et al. Conundrum of pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: role of vascular endothelial dysfunction, reactive oxygen species, and mitochondria // Mol. Cell Biochem. – 2013. – 386(1-2). – P. 233-249.