

УДК 57.083.16

ИММУНОМОРФОЛОГИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ БАКТЕРИЕЙ *AEROMONAS HYDROPHILA*

Хомякова Т.И., Макарова О.В., Козловский Ю.Е., Хомяков Ю.Н.
ГУ НИИ морфологии человека РАМН, НИИ молекулярной медицины ММА им
И.М. Сеченова, Москва

Введение

Грамотрицательные бактерии *Aeromonas* spp широко распространены в окружающей среде и способны вызывать развитие инфекционного процесса как у животных [9, 13], так и у человека [10, 11]. В последние годы интерес к аэромонадам значительно возрос [7]; в частности, было показано, что данная бактерия является одной из наиболее распространенных причин развития диареи путешественника [15], на выраженность и тяжесть течения которой связаны, с одной стороны, с вирулентностью возбудителя, а с другой стороны с иммуногенотипом макроорганизма. Влияние иммуногенотипа на морфологию тканей при инфекционном процессе, вызванном *A. hydrophila* у теплокровных не проводились.

Целью настоящего исследования было изучение иммуногенотипически обусловленных морфологических особенностей воспалительного процесса и реакции органов иммунной системы мышей Balb/C и C57Bl/6 при инфицировании бактерией *A. hydrophila*.

Материалы и методы

Работа выполнена на половозрелых мышах-самцах Balb/C и C57Bl/6 с генетически детерминированным, соответственно, преимущественно Th-2 и Th-1 типом иммунного ответа [14], 40 животных каждой линии. В работе использовали умеренно вирулентный штамм *A. hydrophila* 342-2 из коллекции НИИ ПРХ РАСХН. Мышам экспериментальных групп обеих линий (15 особей в каждой группе) подкожно в области левого паховой складки вводилось 0,1 мл суспензии

бактерий в физиологическом растворе в дозе $1,8 \times 10^8$ КОЕ. Мышам контрольной группы вводилось 0,1 мл физиологического раствора. На 3-и, 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сут мышей умерщвляли под эфирным наркозом методом цервикального смещения. Проводили высев возбудителя из внутренних органов (печени, селезенки, почки, легкого) и крови из сердца на плотную питательную среду. В крови из сердца определялось абсолютное количество лейкоцитов в камере Горяева, проводили подсчет лейкоцитарной формулы.

Для гистологического исследования проводили забор внутренних органов животных: кожи в месте введения возбудителя, регионарного лимфатического узла, тимуса, селезенки, печени, легких, почек, тонкой кишки и сердца. Органы иммунной системы фиксировали в жидкости Буэна, легкие и тонкую кишку в фиксаторе Карнуа, кожу, сердце, печень и почки — в 10% растворе забуференного формалина. Материал проводили по спиртам восходящей концентрации, заливали в парафин. Изготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином. Для выявления жировых включений криостатные срезы печени фиксировали в забуференном формалине, окрашивали суданом III. В гистологических срезах тимуса и селезенки, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи сетки Г.Г. Автандилова [1] оценивали объемную долю функциональных зон тимуса и селезенки при увеличении 160 и 200. Количество гранул в гистологических срезах печени оценивали путем подсчета их количества в поле зрения при ув.200. Достоверность разли-

чий определяли по t-критерию Стьюдента. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,01$.

Результаты

На 3 сут эксперимента *A. hydrophila* высевалась из печени, сердца, легких и крови мышей C57Bl/6 и Balb/C. На 7-е сут и в последующие сроки высеив из крови и органов мышей обеих линий был отрицательным.

На 3-7-е сут после подкожного инфицирования *A. hydrophila* 342-2 в крови мышей линии Balb/C по сравнению с контролем отмечено достоверное увеличение абсолютного количества лейкоцитов, которое достоверно снижалось на 14-е сут исследования. В лейкоцитарной формуле крови мышей Balb/C на 3-и сут после подкожного инфицирования отмечено повышение процентного содержания нейтрофилов до $50,4 \pm 7,3 \%$ (по сравнению с $35,2 \pm 3,3\%$ в контрольной группе), которое снижалось и нормализовалось к 7-м сут.

В крови мышей C57Bl/6 экспериментальной группы на 3-и сут было отмечено повышение количества лейкоцитов в 3,6 раза по сравнению с контрольной группой. К 7-м сут абсолютное количество лейкоцитов у мышей линии C57Bl/6 экспериментальной группы было досто-

верно выше по сравнению с контролем и предыдущим сроком. На 14-е сут отмечалось снижение количества лейкоцитов, которое достигало уровня контрольной группы на 21-е сут. В лейкоцитарной формуле крови мышей C57Bl/6 на 3-и сут после инфицирования было отмечено повышение относительного содержания нейтрофилов до $34,3 \pm 3,5\%$ по сравнению с $22,5 \pm 4,3\%$ в контроле с последующим снижением показателя на 7-21-е сут.

В гистологических срезах кожи на 3-7-е сут исследования у мышей контрольных групп обеих линий в месте введения физиологического раствора отмечалась скудная инфильтрация кожи и подкожной клетчатки лимфоцитами и гистиоцитами. У мышей экспериментальных групп обеих линий на 3-14-е сут в зоне введения возбудителя был выявлен очаг гнойного воспаления. На 21-28-е сут диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация была слабо выражена, клетки инфильтрата были представлены преимущественно гистиоцитами, лимфоцитами с примесью нейтрофилов.

В печени мышей Balb/C на 3-14-е сут после инфицирования определялась выраженная вакуольная дистрофия гепатоцитов, которая сочеталась с мезенхи-

мально-воспалительной реакцией (рис. 1А). При окраске срезов суданом III в гепатоцитах выявлялись мелкие капли липидов. На 21-28-е сут выраженность и распространенность дистрофических изменений гепатоцитов снижалась. У мышей C57Bl/6 на 3-и сут после инфицирования *A. hydrophila* в печени также была выявлена дистрофия гепатоцитов,

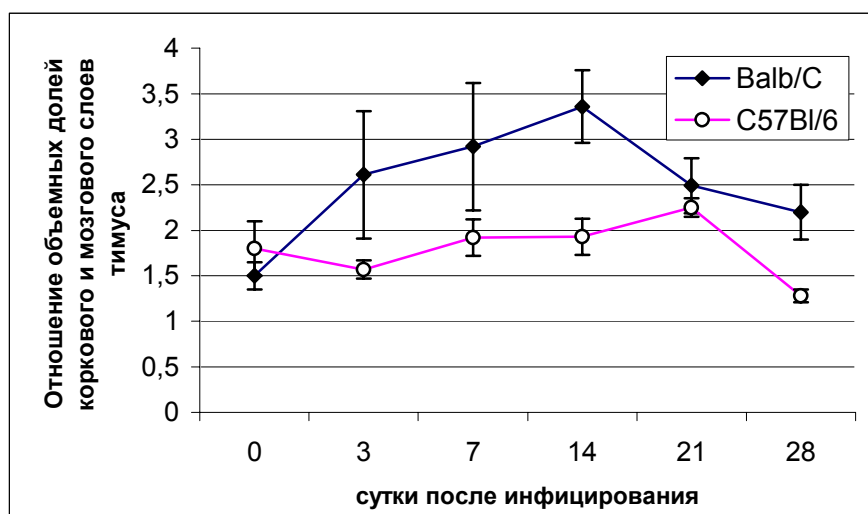


Рис. 2. Динамика морфометрических показателей тимуса мышей Balb/C и C57Bl/6 после инфицирования *A. hydrophila* 342-2

которая прогрессировала на 7-14-е сут. Выраженность ее проявлений снижалась к 28-м сут. На 7-е сут на фоне выраженных дистрофических изменений гепатоцитов в дольках печени обнаруживались макрофагальные гранулемы, состоящие из 5-40 клеток (рис. 1Б). Кроме макрофагов в гранулемах встречались единичные нейтрофилы и лимфоциты. Число гранулем составило $2,20 \pm 0,28$ при ув.200. На 14-21-е сут количество гранулем достоверно не изменялось ($2,00 \pm 0,20$). На 21-е сут эксперимента гранулемы состояли из 5-20 клеток, представленных эпителиоидными клетками и макрофагами с небольшим ядром и эозинофильной цитоплазмой. На 28-е сут эксперимента число гранулем достоверно уменьшалось ($1,20 \pm 0,28$).

Подкожное инфицирование мышей обеих линий *A. hydrophila* приводило к развитию реактивного лимфаденита с гиперплазией по смешанному типу в регионарном по отношению к месту введения инфекционного агента лимфатическом узле. У мышей Balb/C признаки реактивного лимфаденита уменьшались к 14-м и практически исчезали к 28-м сут. У мышей C57Bl/6 проявления лимфаденита оставались выраженными на 14-е и сохранялись на 21-28-е сут. При морфологическом исследовании тимуса у мышей Balb/C на 3-7-е сут после подкожного инфицирования *A. hydrophila* 342-2 выявлялась акцидентальная инволюция I-II стадии (по классификации О.В. Зайратьянца [4]): достоверное увеличение объемной доли коркового слоя (рис. 2), расширение субкапсулярной зоны за счет увеличения числа лимфобластов. В мозговом слое и на грани-

це коркового и мозгового слоя определялись тимические тельца 3-4 фаз развития. Отдельные кистоподобные тимические тельца располагались в корковом слое. На 14-21-е сут морфологические признаки акцидентальной инволюции сохранялись, на 28-е сут отмечалась тенденция к нормализации функциональных зон тимуса.

В тимусе мышей экспериментальной группы C57Bl/6 на 3-7 сут после инфицирования определялась акцидентальная инволюция I-II стадии: прогрессирующее расширение субкапсулярной зоны с увеличением количества лимфобластов. На 3-и сут как в мозговом слое, так и на границе коркового и мозгового вещества встречались тельца Гассалья 2-3 фаз развития. На 14-е сут были число телец Гассалья 1-2-3 фаз развития продолжало увеличиваться, они располагались на границе коркового и мозгового вещества и в корковом слое. На 21-28 сут. было отмечено очаговое опустошение коры, уменьшение ширины субкапсулярной зоны и числа митозов в ней. Морфометрический анализ обнаружил изменение отношение объемных долей коркового и мозгового слоев тимуса (рис. 2).

Подкожное инфицирование *A. hydrophila* 342-2 мышей Balb/C приводило к активации В-зон селезенки (рис. 3А),

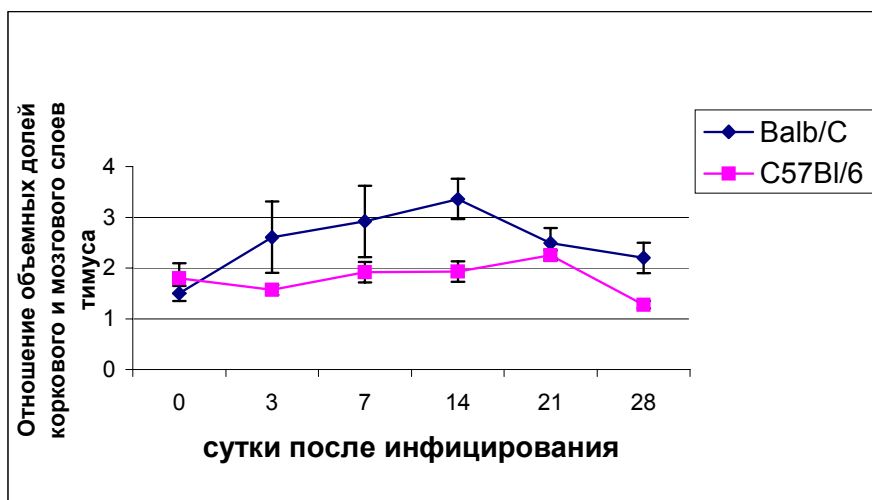


Рис. 2. Динамика морфометрических показателей тимуса мышей Balb/C и C57Bl/6 после инфицирования *A. hydrophila* 342-2

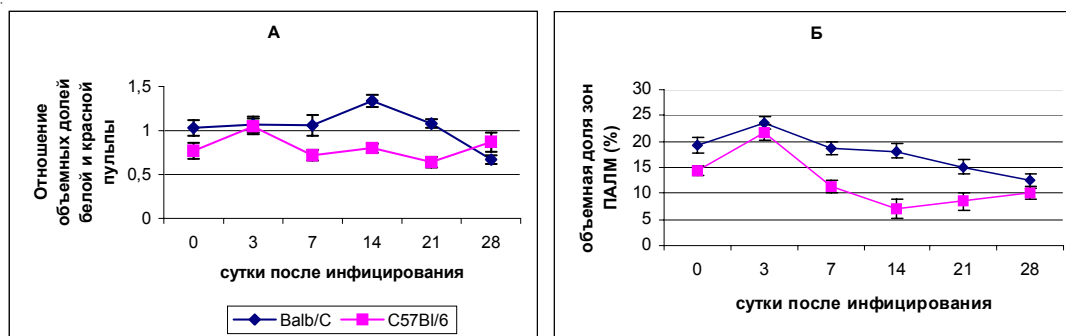


Рис. 3. Динамика морфометрических показателей селезенки мышей Balb/C и C57Bl/6 после инфицирования *A. hydrophila* 342-2

А. Отношение объемных долей красной и белой пульпы

Б. Относительная объемная доля зон ПАЛМ

что выражалось в появлении и расширении герминативных центров. Гиперплазия Т-зоны селезенки характеризовалась визуальным расширением зон ПАЛМ на 3-14 сут с последующим их опустошением на 21-28 сут, что подтверждается данными морфометрических исследований (рис. 3Б). Инфицирование мышей C57Bl/6 приводит к гиперплазии белой пульпы селезенки, проявляющейся на 3-и сут в увеличении объемной доли лимфоидных фолликулов с расширением герминативных центров и маргинальных зон. На 7-е сут выявлялось опустошение и сужение зон ПАЛМ. По сравнению с мышами C57Bl/6, обратное развитие реактивных изменений в селезенке происходило у мышей Balb/C в более короткие сроки, что, по-видимому, отражает более эффективную элиминацию возбудителя у особей с преимущественно гуморальным типом иммунного ответа.

Обсуждение

Таким образом, в проведенном исследовании было обнаружено, что штамм *Aeromonas hydrophila* 342-2 при подкожном введении вызывает у мышей Balb/C и C57Bl/6 с различным типом преимущественного иммунного ответа развитие инфекционного процесса, характеризующегося кратковременной бактериемией, развитием очага гнойного воспаления в месте введения, регионарным лимфаденитом и лейкоцитарной реакцией, более выраженной у мышей C57Bl/6. Развитие

лимфаденита и лейкоцитарной реакции отражает системный ответ организма на попадание в него возбудителя [6], и соответствует изменениям в очаге поражения у человека при раневом заражении *A. hydrophila*, имеющимся в литературе [10]. Межлинейные различия в динамике лейкоцитарной реакции, а именно большая ее выраженность и меньшее относительное содержание нейтрофилов у мышей C57Bl/6, согласуются с данными Диатроптова М.Е. [3], выявившего повышение процентного содержания нейтрофилов в крови из сердца у мышей линий Balb/C и C57Bl/6 в ответ на введение липополисахарида, при более низком относительном содержании нейтрофилов у мышей C57Bl/6 по сравнению с мышами линии Balb/C.

Дистрофические изменения в печени мышей обеих линий, выраженность которых снижается на 21-28 сут эксперимента, свидетельствует о выраженном воздействии на ткани печени бактериальных токсинов, вырабатываемых *A. hydrophila*. Развитие макрофагально-эпителиоидноклеточных гранул в печени мышей линии C57Bl/6, обнаруженных на 7-е сут после инфицирования *A. hydrophila* 342-2, видимо, связано с устойчивостью этого возбудителя к действию лизосомальных ферментов и недостаточной эффективностью этого процесса у мышей этой линии. При этом возможно персистирование бактерий,

которое может быть причиной развития гранулематозной реакции в печени мышей с преимущественно клеточным типом иммунного ответа. Персистирование как исход инфекционного процесса известно для многих бактерий, в том числе условно-патогенных, к которым относят *A. hydrophila* [2]. Формирование гранул при инфицировании бактериями, способными к внутриклеточному паразитированию, отмечается в ряде литературных источников [5, 12]. Так, например, описано образование гранул у мышей Nude при введении им *Mycobacterium tuberculosis* BCG [12]. У мышей линии C57BL/6 по сравнению с Balb/C гранулематозный воспалительный процесс в ответ на вакцину БЦЖ-М был более выраженный и распространенный [5].

Изучение реакции иммунной системы показало, что подкожное заражение *A. hydrophila* 342-2 вызывает у мышей разных линий независимо от иммуногенотипа реакцию иммунной системы: акцидентальную инволюцию тимуса и гиперплазию В- и Т- зон селезенки, более выраженную и длительную у мышей линии C57Bl/6 с преобладанием клеточного иммунного ответа. Эти данные согласуются с данными литературы, демонстрирующими преобладание клеточных иммунологических реакций в ответ на введение бактериальной вакцины БЦЖ-М у мышей C57/Bl6, оцениваемое по результатам исследования цитокинового профиля, в частности, повышению уровня продукции ФНО- α и ИФ- γ [5]. Морфологические изменения в тимусе и селезенке характерны для воспалительных реакций, развивающихся у теплокровных в ответ на попадание в организм возбудителя. Различия в морфологической картине органов иммунной системы у мышей Balb/C C57Bl/6 соотносятся с результатами, касающимися различий у мышей этих линий в реакциях на стрессорное (холодовое) воздействие [8], введение липополисахарида [3] и иммуноморфологические проявления гранулематозного воспаления, индуцированного

вакциной БЦЖ-М [5].

В целом, в результате проведенного исследования иммуноморфологии инфекционного процесса у мышей Balb/C и C57Bl/6 при подкожном заражении бактерией *A. hydrophila* обнаружены как общие признаки неспецифической реакции иммунной системы животных на введение возбудителя, так и межлинейные различия, определяемые генетически детерминированным преимущественным типом иммунного ответа.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии. М., Медицина, 1973.
2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий М. Медицина, 2005.
3. Диатроптов М.Е. Макарова О.В., Серебряков С.Н. с соавт. Сравнительное изучение морфофункциональных реакций иммунной системы мышей Balb/C и C57Bl/6 при однократном введении липополисахарида *E.coli* O26:B6:B. Бюлл. Волгоградского НЦ РАМН, Волгоград, 2005, 35-36.
4. Зайратьянц О.В. Патология вилочковой железы и аутоиммунные болезни. Дисс. дмн, М.1992.
5. Михайлова Л.П., Макарова О.В. Сравнительная характеристика цитокинового профиля и морфологических проявлений гранулематозного воспаления у мышей C57Bl/6 и Balb/C. Иммунология.2005, 2:95-98
6. Морозова В.Т., Луговская С.А. Лимфатические узлы. Цитологическая диагностика. М.2003.
7. Супотницкий М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии. М. Вузовская книга, 2000.
8. Трунова Г.В. Морфофункциональная характеристика популяций тучных клеток у мышей Balb/C и C57Bl/6 при холодном воздействии. Бюлл.экспер.биол. и мед.2004,8:207-209.
9. Юхименко Л.Н., Гусева Н.В. Биологи-

- ческие свойства аэромонад, их изменчивость и влияние на развитие инфекционного процесса. В: Паразиты и болезни рыб, 2000, М., Изд. ВНИРО, 152-156.
10. Collier D.N. Cutaneous infections from coastal and marine bacteria. // *Dermatol.Ther.*2002,15:1-9.
 11. Llopis F. Grau I., Tubau F.E.et al. Epidemiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by *Aeromonas* spp. as compared with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.// *Scand J. Infect Dis.*2004.36:335-341.
 12. Mariano M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion.//*Rev.Inst. Med.Trop.Sao.Paulo.*1995, 37: 161-176.
 13. Mauel M.J., Miller D.L., Frazire K.S. Bacterial pathogens isolated from cultured bull frogs (*Rana castesbeiana*).//*J.Vet.Diagn.Invest.* 2002,14:431-433.
 14. Spellberg B., Edwards J. Type1/Type2 immunity in infectious diseases.// *Immunity in Infect.* 2001,32:76-91.
 15. Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, Gascon J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance//*Emerg Infect Dis.* 2003 May;9(5):552-5.

Резюме

ИММУНОМОРФОЛОГИЯ ИНФЕКЦИЙНОГО ПРОЦЕСУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНФІКУВАННІ БАКТЕРІЄЮ *AEROMONAS HYDROPHILA*

Хом'якова Т.І., Макарова О.В., Козловський Ю.Е., Хом'яков Ю.Н.

Aeromonas spp є одним з найбільш поширених збудників діареї мандрівників. Роль імунотипу в розвитку запалення, викликаного *Aeromonas* spp, не досліджена. У роботі вивчалися імунотипологічні особливості інфекційного процесу у мишей із генетично детермінованим

переважно гуморальним (Balb/C) або клітинним (C57Bl/6) типом імунної відповіді при підшкірному зараженні бактерією *Aeromonas hydrophila* в терміни 3-28 діб. Виявлено, що слабовирулентний штам *A. hydrophila* 342-2 при підшкірному введенні викликав у мишей Balb/C і C57Bl/6 розвиток інфекційного процесу, що характеризується короткочасною бактеріемією, лейкоцитарною реакцією, розвитком вогнища гнійного запалення в місці введення і регіонарним лімфаденітом. Лейкоцитарна реакція була більш виражена у мишей C57Bl/6. На 3 добу після інфікування у мишей обох ліній було відмічено розвиток дистрофічних змін в печінці, вираженість яких знижувалася на 21-28 добу експерименту. На 7-28 добу після інфікування у мишей лінії C57Bl/6 в печінці виявлялися макрофагально-епітеліоїдноклітинні гранулеми. Незалежно від імунотипу мишей, зараження *A. hydrophila* 342-2 приводило до розвитку акцидентальної інволюції тимуса і гіперплазії В- і Т-зон селезінки, більш вираженим і тривалим у мишей лінії C57Bl/6.

Summary

IMMUNOMORPHOLOGY OF INFECTION AT EXPERIMENTAL INOCULATION OF THE BACTERIA *AEROMONAS HYDROPHILA*

Khomyakova T.I., Makarova O.V., Kozlovsky Yu.E., Khomyakov Yu.N.

Aeromonas spp is one of the most distributive causes of the traveler's diarrhea. The role of the genetically determined prevalence of immune reaction in development of infection induced by *Aeromonas* spp was not investigated. In the present work we have studied the morphological features of tissues in mice with genetically determined preferably humoral (Balb/C) or cellular (C57Bl/6) type of immune response at subcutaneous infecting by *Aeromonas hydrophila* at terms 3-28 days were investigated. It was found that low virulent strain *A. hydrophila* 342-2 induces the development of infectious process in mice Balb/C and C57Bl/6

The process is defined by short-term

bacteremia, extension of the focal pyogenic inflammation at the zone of the inoculation of the pathogen, regional lymphadenitis and the leukocytic reaction. The regional lymphadenitis and the leukocytic reaction were more expressed in mice C57Bl/6. On the 3rd day after the infecting in mice of both lines the development of dystrophic changes was established. Its expression decreased on the 21-28 days. On the 7–28 days after the inoculation macrophage-platelet granulemas were revealed in liver of mice C57Bl/6.

Independently of the genotype of the mice the infecting by *A. hydrophila* 342-2 induced the accidental involution of the thymus and hyperplastic reaction of the T- and B-zones of the spleen, which were more expressed and long in mice C57Bl/6.

*Впервые поступила в редакцию 21.12.2008 г.
Рекомендована к печати на заседании учёного совета НИИ медицины транспорта
(протокол № 1 от 20.01.2009 г.).*

УДК:656.052.8.629.113/.115:616.839

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА МЕТАБОЛИТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССАХ, ПРИ РЕАБИЛИТАЦИИ ВОДИТЕЛЕЙ-АВТОМОБИЛИСТОВ

Горша О.В., Гуляр С.А., Насибуллин Б.А., Гоженко А.И.

*Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса,
Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев*

Автомобильный транспорт является наиболее массовым и динамично развивающимся видом транспорта, это определяет многочисленность профессиональных водителей автомобиля среди транспортных рабочих. В то же время отсутствие соответствующей ведомственной медицинской службы затрудняет получение полных систематизированных сведений о состоянии здоровья водителей [7,10].

Профессиональное использование автотранспорта сопряжено с систематическим воздействием ряда факторов, оказывающих неблагоприятное влияние на организм человека [7,9,10], а также создающих условия для возникновения и модификации ряда заболеваний. К таким факторам относятся: хронический стресс, вибрация, нарушение температурного режима, депривация геомагнитного поля, комплекс токсических веществ (окись углерода, пары бензина, токсические вещества выхлопных газов – бензипирен, акролеин и др.) [7,10]. Их неблагоприятное влияние реализуется через нарушение

работы многих систем организма, в том числе – гуморальной регуляции [5]. Наличие стойких неблагоприятных последствий систематического влияния условий работы на водителей влечет за собой необходимость решения задач по разработке мероприятий, направленных на сглаживание этих нарушений, в том числе по коррекции состояния регуляторных процессов.

К числу механизмов процессов адаптации к внешним факторам относится участие в нем катехоламинов, цикла оксида азота, мочевой кислоты и других управляющих молекул [1, 5]. Согласно данным Аксентийчука С. Л. [1] мочевая кислота выступает не только как конечный продукт азотного обмена, но и как управляющая молекула широкого спектра действия (вегетативный тонус, липидный, белковый обмены и т.д.). Исследования взаимодействий этих регуляторных механизмов в ответ на систематическое влияние производственных (физических) условий немногочисленны [7,10].

Проведенные нами ранее иссле-