

О. О. Мельник, І. В. Ліскіна, С. Д. Кузовкова, Л. М. Загаба, О. Л. Мельник
ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ВІЯВЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ АНТИГЕНІВ У СТРУКТУРІ
ТУБЕРКУЛЬОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЮДИНИ ЯК ІНСТРУМЕНТ МОРФОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ
ФАЗИ АКТИВНОСТІ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

ДУ «Національний інститут фізіотерії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України»

Мікобактерія туберкульозу (МБТ) — це малорухома, тонка, довга паличковидна бактерія, яка не утворює спор та капсул і є облигатним аеробом. У її клітинній стінці присутня велика кількість міколевих кислот та ліпідів, завдяки чому збудник практично не забарвлюється звичайними гістохімічними методами, проте відрізняється своєю здатністю утворювати стійкі комплекси з карболфуксином або аурамін-родаміном. Ось чому для виявлення мікобактерії в тканині застосовують забарвлення за Цілем-Нільсеном або TB-fluor [Dunn J. J. et al., 2016]. Згідно даних літератури, метод виявлення кислотостійких бактерій (КСБ) за Цілем-Нільсеном має відносно низьку чутливість (0-44 %) [Karimi S. et al., 2014]. Крім того, необхідна присутність мінімум 10^4 одиниць збудника в одному зразку (або 1 мл) для встановлення діагнозу [Ulrichs T. et al., 2005]. Приблизно такий же рівень діагностичної специфічності має аурамін-родаміновий флуоресцентний метод виявлення КСБ, але встановлено, що його чутливість в середньому на 10 % більша, ніж методу Ціля-Нільсена [Gupta S. et al., 2010; Steingart K. R. et al., 2006].

У клітинній стінці МБТ містяться численні видоспецифічні антигени, що обумовлює доцільність використання поліклональних антитіл до *M. tuberculosis*. Встановлено, що імуногістохімічний (ІГХ) метод є найбільш чутливим (89–93 %) та специфічним (95–98 %), тобто найбільш результативним — він дає змогу виявити найбільшу

кількість Мікобактерій туберкульозу (навіть від 5×10^5 до 1×10^6 одиниць збудника в одному зразку (або 1 мл)) [Mukherjee A. et al., 2002; Bekmurzayeva A. et al., 2013].

Таким чином, з метою виявлення та дослідження МБТ в тканині легень безумовно перспективним є застосування ІГХ методу щодо виявлення мікобактеріальних антигенів, оскільки метод дає змогу виявити не лише клітини, які поглинають МБТ або містять її фрагменти, але й можливість виявлення цілісних позаклітинних структур збудника.

Мета — дослідити особливості локалізації та рівня експресії мікобактеріальних антигенів *M. Tuberculosis* у різних цитологічних та гістологічних структурах туберкульозми легень людини за умов різної активності специфічного запального процесу.

Матеріали та методи

Імуногістохімічне дослідження проводилося з використанням AUTOSTAINER 360–2D (Thermo Fisher Scientific (США)) та кролячого поліклонального антитіла — *Mycobacterium tuberculosis* Antibody (PA1-7231); робоче розведення 1:2500. Застосована система візуалізації UltraVision Quanto, нова високочутлива система візуалізації на основі комбінації ферменту і мікрополімеру, виробництва компанії LabVision (США).

Досліджено 19 випадків з морфологічно визначеним високим та 15 — з помірно-низьким ступенями актив-

ності специфічного запалення. Вивчали капсулу туберкульоми — її грануляційний та фіброзний шари. Визначали типи клітин, в яких виявляли мікобактеріальні антигени та їх відносну кількість, а також оцінювали інтенсивність реакції за умовно прийнятою робочою градацією: + — подібна до фонового, блідо-жовта, дифузна; ++ — грудкова, переважно — дрібно-грудкова (світло-коричневого кольору); +++ — виразно грубо-грудкова (інтенсивно-коричневе). Мікроскопічне дослідження проводили з використанням мікроскопу OLYMPUS BX41; збільшення: $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$.

Результати

ІГХ виявлення антигенів мікобактерії в капсулі туберкульоми легень при різній активності специфічного запалення показало, що вони спостерігалися в наступних типах клітин: макрофагах, епітеліоїдних клітинах, моноцитах та гігантських багатоядерних клітинах Пирогова-Лангханса, проте рівень експресії мікобактеріальних антигенів в клітинах був різним. У грануляційному шарі туберкульоми при високому ступені активності специфічного запального процесу найчастіше крупні грудочки мікобактеріальних антигенів інтенсивно-коричневого забарвлення (градація +++) визначалися у макрофагах — 52,6 % випадків, порівняно до інших типів клітин. Тоді як при помірно-низькому ступені активності крупні грудочки мікобактеріальних антигенів інтенсивно-коричневого забарвлення взагалі не визначалися в клітинах будь-якого типу. Дрібні грудки антигену світло-коричневого кольору (градація ++) найбільш часто спостерігалися в епітеліоїдних клітинах та моноцитах за різного ступеня активності специфічного запалення, і складали відповідно 63,2 % і 68,4 % випадків при високому ступені активності та 46,7 % і 40,0 % випадків — при помірно-низькому ступені активності, що, на нашу думку, було свідченням згасання інтенсивності запального процесу.

У фіброзному шарі туберкульоми при її прогресуванні крупні грудочки мікобактеріального антигену інтен-

сивно-коричневого забарвлення (+++) найчастіше визначалися також у макрофагах — 26,3 % випадків, порівняно до інших клітин, тоді як при помірно-низькому ступені — взагалі не визначалися. Дрібні грудки антигену світло-коричневого кольору (++) спостерігалися в макрофагах, епітеліоїдних клітинах та моноцитах в однаковій кількості випадків — 47,4 % при високому ступені активності запального процесу. При помірно-низькому ступені активності дрібні грудки антигену світло-коричневого кольору зустрічалися значно рідше, найчастіше виявлялися в моноцитах — 40 % випадків.

Окрім того, усі вищезгадані клітини (макрофаги, епітеліоїдні клітини, моноцити та гігантські багатоядерні клітини) в капсулі туберкульоми легень при різних ступенях активності специфічного запального процесу також демонстрували і рівень експресії (+), подібний до фонового. Проте такий рівень експресії переважав у спостереженнях з помірно-низьким ступенем активності запалення.

Висновки

Крупні грудочки мікобактеріальних антигенів інтенсивно-коричневого забарвлення (градація +++) визначалися лише при високому ступені активності в обох шарах капсули туберкульоми легень, найчастіше — у макрофагах, порівняно до інших типів клітин.

Дрібні грудки антигену світло-коричневого кольору (градація ++) найбільше спостерігалися в епітеліоїдних клітинах та моноцитах обох шарів капсули туберкульоми за різного ступеня активності специфічного запального процесу.

Застосування саме ІГХ дослідження дозволило встановити не лише типи та кількість клітин, які приймають участь у фагоцитозі мікобактерії туберкульозу, але й чітко визначити тканинну локалізацію антигенів мікобактерії. Наше дослідження підтвердило першочергове значення саме макрофагів у реалізації фагоцитозу *M. Tuberculosis*.