

Роль некоторых показателей иммунной системы в прогнозировании развития острой мезентериальной ишемии в эксперименте

З.А. АРТАМОНОВА, Е.В. НАМОКОНОВ, П.П. ТЕРЕШКОВ, В.И. ОБЫДЕНКО

Читинская государственная медицинская академия, ул. Горького, д. 39А, Чита, 672090, Российская Федерация

Актуальность Острая мезентериальная ишемия в настоящее время занимает одно из лидирующих мест по показателю летальности среди острых хирургических заболеваний.

Целью исследования явилось изучение лимфограммы крови в корреляции с морфологической структурой стенки кишки на различных стадиях острой артериальной мезентериальной ишемии в эксперименте.

Материалы и методы Исследование выполнено на 24 самцах белых беспородных крыс массой 0,2-0,22 кг, с целью изучения лимфограммы крови в корреляции с морфологическими изменениями кишки на различных стадиях острой артериальной мезентериальной ишемии. Последняя достигалась путем перевязки краниальной брыжеечной артерии у основания корня брыжейки. Все животные разделены на 3 группы, кровь на иммунограмму у животных забирали до перевязки и, затем, через 2, 6, и 8 часов в каждой группе, соответственно.

Результаты и их обсуждение Установлено, что с первых часов окклюзии краниальной брыжеечной артерии в общем кровотоке прогрессивно снижается общее число лимфоцитов, в основном за счет снижения B- cells и NK- cells. При этом наибольшее снижение числа лимфоцитов наблюдалось в некротическую стадию заболевания ($p < 0,05$).

Заключение Результаты исследования свидетельствуют о том, что прогрессивное снижение количества лимфоцитов центральной венозной крови у животных подтверждает течение острой артериальной мезентериальной ишемии и может являться фактором неблагоприятного исхода заболевания.

Ключевые слова Острая артериальная мезентериальная ишемия, лимфограмма, диагностика

The Role of Some Immune System Parameters in Forecasting Development Acute Mesenteric Ischemia Experiment

Z.A. ARTAMONOVA, E.V. NAMOKONOV, P.P. TERESHKOV, V.I. OBYDENKO

Chita State Medical Academy, 39A Gor'kogo Str., Chita, 672090, Russian federation

Relevance Acute mesenteric ischemia currently holds a leading position in terms of mortality in acute surgical diseases.

The purpose of the study The aim of our study was to investigate limfogrammy blood correlated with the morphological structure of the bowel wall at different stages of acute arterial mesenteric ischemia in the experiment.

Materials and methods The study was performed on 24 male albino rats weighing 0,2-0,22 kg. limfogrammy to examine correlation with the blood in the gut morphological changes in different stages of acute arterial mesenteric ischemia. The latter is achieved by ligation of the cranial mesenteric artery at the base of the root of the mesentery. All animals were divided into three groups on blood taken at animals immunogram to ligation, and then after 2, 6, and 8 hours in each group, respectively.

Results and their discussion It was established that the first hours of the cranial mesenteric artery occlusion in the general circulation is progressively reduced the total number of lymphocytes, mainly due to the decrease in B cells and NK- cells. The largest decrease in the number of lymphocytes was observed in necrotic stage of the disease ($p < 0,05$).

Conclusion Results of the study indicate that the progressive reduction in the number of lymphocytes central venous blood in animals confirmed for acute arterial mesenteric ischemia and may be a factor in the adverse outcome.

Key words Acute arterial mesenteric ischemia, limfogramma diagnosis

Острая мезентериальная ишемия (ОМИ) в настоящее время занимает одно из лидирующих мест по показателю летальности среди острых хирургических заболеваний. Одной из причин высокой летальности является трудность своевременной диагностики заболевания даже в условиях специализированных медицинских учреждений и, как следствие, запоздалое и малоэффективное оперативное пособие [1, 6, 7, 8]. Изучение патофизиологических реакций развивающихся при ОМИ, с последующим созданием новых способов диагностики и методов лечения этой патологии является актуальной проблемой хирургии [3, 5, 7, 8].

Известно, что лимфоидная ткань, связанная со слизистыми желудочно-кишечного тракта - самый большой по объему отдел иммунной системы и при этом является составляющей единой лимфоидной системы, ассоциированной со слизистыми оболочками [2]. Из всего этого следует, что острое нарушение брыжеечного кровообращения уже в ранние сроки будет приводить к изменению в лимфоидной системе организма, что отразится в иммунограмме.

Целью нашего исследования явилось изучение субпопуляции лимфоцитов крови в корреляции с морфологической структурой стенки кишки на различ-

ных стадиях острой артериальной мезентериальной ишемии в эксперименте.

Материалы и методы

В соответствии с поставленной целью нами был проведен эксперимент на 24 самцах белых беспородных крыс массой 0,2-0,22 кг, которым под общим обезболиванием выполнялась лапаротомия, забор крови и перевязка краниальной брыжеечной артерии у основания корня брыжейки.

С целью выявления динамики иммунограммы, все животные, в зависимости от времени пережатия общего кровотока, были разделены на 3 группы. У всех животных забиралась кровь до перевязки артерии, затем через 2, 6 и 8 часов соответственно в первой, второй и третьей группах выполнялась релапаротомия, проводилась оценка жизнеспособности кишечника и повторный забор крови, биопсия кишки. Для иммунофенотипирования кровь у животного забирали в пробирку, содержащую динатриевую соль ЭДТА. Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли стандартным методом прямого иммунофлюоресцентного окрашивания цельной крови с использованием лизирующего/фиксирующего раствора VersaLyse/IOTest 3 Fixative solution (Beckman Coulter) и панели моноклональных антител IOTest Anti-Rat (Beckman Coulter). Контрольные пробы инкубировали с иммуноглобулинами, мечеными флуорохромами (FITC, PC7, APC) соответствующего изотипа – мышинные IgG1, IOTest (Beckman Coulter). Цитофлюорометрию осуществляли на проточном цитофлюориметре

"Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA), регистрировали суммарно не менее 10.000 событий. Данные анализировали с помощью программы CXP Cytometer (Beckman Coulter).

Эксперименты на животных были проведены в асептических условиях операционного блока кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Читинской государственной медицинской академии. Операции и все манипуляции с животными проводились с использованием общего обезболивания, а эвтаназия - путем передозировки средств для наркоза с учетом положений, регламентируемых приложением № 8 («Правила гуманного обращения с лабораторными животными»), «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденными Главным Государственным санитарным врачом СССР 6 апреля 1973 г. (№ 1045-73), а также приказом № 724 от 1984 г. Министерства высшего образования СССР «Правила проведения работ с экспериментальными животными». Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Statistica-6 for Windows» и критерия Крускало-Уоллиса с определением достоверности различий при достигнутом уровне значимости $p \leq 0,05$. Морфологический материал подвергался стандартной проводке и заливке в парафин, полученные препараты окрашивали по методу Ван - Гизона, гематоксилин - эозином, ШИК. Фотофиксацию и морфометрию проводили на микроскопе OLYMPUS CX 31, с применением программного обеспечения МЕКОС. Статистическая

Таблица 1

Динамика изменения лимфограммы в зависимости от времени пережатия брыжеечной артерии ($M \pm SD$)

Показатели	До перевязки n= 24	После перевязки (часы)		
		Группа 1 n= 8 (2 часа)	Группа 2 n=8 (6 часов)	Группа 3 n= 8 (8 часов)
Лимфоциты (в 1 мкл)	15915±4599	7468±4331 $p < 0,005$	5231±1112 $p < 0,005; p_1 < 0,005$	1535±812 $p < 0,005; p_2 < 0,005; p_3 < 0,003$
T-клетки CD3+ клетки (в 1 мкл)	8133±3526	3150±1170 $p < 0,005$	2477±505 $p < 0,005; p_1 < 0,005$	1133±280 $p < 0,005; p_2 < 0,005; p_3 < 0,003$
B-клетки (в 1 мкл)	8133±3526	3150±1170 $p < 0,005$	2477±505 $p < 0,005; p_1 < 0,005$	1133±280 $p < 0,005; p_2 < 0,005; p_3 < 0,003$
NK-клетки (в 1 мкл)	1114,333±31	348±202 $p < 0,005$	465±113 $p < 0,005; p_1 < 0,005$	101±67 $p < 0,005; p_3 < 0,005; p_4 < 0,003$

Примечание: p – достоверность разницы показателей между исходными значениями и группами животных; p_1 - достоверность разницы показателей относительно предыдущего временного периода между группой 1 и группой 2; p_2 - достоверность разницы показателей относительно предыдущего временного периода между группой 1 и группой 3; p_3 - достоверность разницы показателей относительно предыдущего временного периода между группой 2 и группой 3.

Таблица 2

Некоторые морфометрические показатели слизистой оболочки кишки у различных групп животных в зависимости от времени пережатия брыжеечной артерии ($M \pm SD$)

Показатели	Группа 1 n= 8 (2 часа)	Группа 2 n=8 (6 часов)	Группа 3 n= 8 (8 часов)
Длина ворсин кишки (мкм)	345,28±56,63,	333,27±46,45; $p \geq 0,01$	159,32±43,68; $p_1 \geq 0,01; p_2 \geq 0,01$
Ширина ворсин кишки (мкм)	54,38±6,55	71,78±13,88; $p \geq 0,01$	72,30±15,87; $p_1 \geq 0,0; p_2 \geq 0,01$

Примечание: p – достоверность разницы показателей относительно предыдущего временного периода между группой 1 и группой 2; p_1 - достоверность разницы показателей относительно предыдущего временного периода между группой 2 и группой 3; p_2 - достоверность разницы показателей относительно предыдущего временного периода между группой 1 и группой 3.

обработка полученных результатов выполнена непараметрическим методом (критерий Манна-Уитни) с определением достоверности различий при достигнутом уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Расчет изучаемых показателей с проведением одновременного морфологического исследования стенки тонкой кишки показал, что через два часа после прекращения артериального притока у всех животных в общем кровотоке отмечалось снижение общего числа лимфоцитов на 46,9% по отношению к исходным показателям ($p < 0,005$), через шесть часов на 67,2% ($p < 0,005$), в основном за счет снижения В- и NK-клеток (табл. 1). В этот временной промежуток времени участок кишки: серозная оболочка блестящая, перистальтика отсутствует, кишка бледно-серого оттенка, отсутствует пульсация краевых сосудов. Гистологически отмечалось сохранение рельефа слизистой оболочки тонкого кишечника, ворсинки пальцевидной формы (длина $345,28 \pm 56,63$ мкм, ширина $54,38 \pm 6,55$ мкм), крипты узкие (табл. 2). Собственная пластинка слизистой оболочки и подслизистая основа утолщены и разрыхлены, за счет отека. Кровенаполнение сосудов неравномерное: артерии находятся в спавшемся состоянии, вены и капилляры слабого и умеренного наполнения, имеются локальные диапедезные кровоизлияния. На апикальной поверхности энтероцитов определяется хорошо выраженная щеточная каемка, гликокаликс сохранен, что свидетельствует о ишемической стадии

заболевания. Через 6 часов после прекращения кровотока на микропрепаратах обращает на себя внимание резкое расстройство кровообращения в виде отека, венозного полнокровия, распространенных диапедезных кровоизлияний, стазов и тромбов в венах. Особенно отек, и полнокровие выражены в подслизистой оболочке и в собственной пластинке слизистой оболочки. Длина ворсинок составляет $333,27 \pm 46,45$ мкм, ширина $71,78 \pm 13,88$ мкм. В эпителии, выстилающем ворсинки, встречаются единичные дистрофически-измененные клетки, имеющие вид крупных вакуолей, контуры ядер в таких клетках не определяются. Щеточная каемка на апикальной поверхности энтероцитов частично сохранена, в большей части энтероцитов не определяется. В единичных полях зрения на верхушке ворсинок отмечается сдувание энтероцитов в просвет кишки, с обнажением соединительнотканной основы ворсинок.

Наибольшее снижение количества абсолютного числа лимфоцитов отмечалось через 8 часов после пережатия краниальной брыжеечной артерии и составляло 90,4 % от исходных показателей ($p < 0,005$), «табл. 1». В эти же сроки макроскопически регистрировалась картина инфаркта кишечника. Гистологически отмечалось укорочение и утолщение кишечных ворсинок за счет выраженного отека. Длина ворсинок составила $159,32 \pm 43,68$ мкм, ширина ворсинок - $72,30 \pm 15,87$ мкм., (табл. 2). Очаги кровоизлияний увеличиваются, отек распространяется на мышечную оболочку. Встречаются очаговые кровоизлияния в брыжейку кишечника. Практически все энтероциты были изменены по

Table 1

Dynamics of change limfogrammy depending on the time of clamping mesenteric artery (M±SD)

Indicators	Prior to ligation n= 24	After ligation (hours)		
		Group 1 n= 8 (2 hours)	Group 2 n=8 (6 hours)	Group 3 n= 8 (8 hours)
Lymphocytes (cells/mkl)	15915±4599	7468±4331 $p < 0,005$	5231±1112 $p < 0,005$; $p_1 < 0,005$	1535±812 $p < 0,005$; $p_2 < 0,005$; $p_3 < 0,003$
T-cells CD3+ (cells/mkl)	8133±3526	3150±1170 $p < 0,005$	2477±505 $p < 0,005$; $p_1 < 0,005$	1133±280 $p < 0,005$; $p_2 < 0,005$; $p_3 < 0,003$
B-cells (cells/mkl)	8133±3526	3150±1170 $p < 0,005$	2477±505 $p < 0,005$; $p_1 < 0,005$	1133±280 $p < 0,005$; $p_2 < 0,005$; $p_3 < 0,003$
NK-cells (cells/mkl)	1114,333±31	348±202 $p < 0,005$	465±113 $p < 0,005$; $p_1 < 0,005$	101±67 $p < 0,005$; $p_3 < 0,005$; $p_4 < 0,003$

Note: p - significance of difference scores between baseline values and groups of animals; p_1 - the accuracy of the performance difference compared to the previous interim period between group 1 and group 2; p_2 - the accuracy of the performance difference compared to the previous interim period between Group 1 and Group 3; p_3 - a significant difference compared to the previous figures of the time period between the group 2 and group 3.

Table 2

Some morphometric parameters of the intestinal mucosa in different groups of animals depending on the time of clamping mesenteric artery (M±SD)

Indicators	Group 1 n= 8 (2 hours)	Group 2 n=8 (6 hours)	Group 3 n= 8 (8 hours)
The length of the villi intestine (mkm)	345,28±56,63,	333,27±46,45; $p \geq 0,01$	159,32±43,68; $p_1 \geq 0,01$; $p_2 \geq 0,01$
The width of the intestine villi (mkm)	54,38±6,55	71,78±13,88; $p \geq 0,01$	72,30±15,87; $p_1 \geq 0,0$; $p_2 \geq 0,01$

Note: p - significance of differences in the indices compared to the previous interim period between group 1 and group 2; p_1 - the accuracy of the performance difference compared to the previous interim period between group 2 and group 3; p_2 - the accuracy of the performance difference compared to the previous interim period between Group 1 and Group 3.

типу баллонной дистрофии, что можно расценивать как фокальную форму колликвационного некроза. Наблюдается десквамация целых пластов эпителиальных клеток в области верхушек и на боковых поверхностях кишечных ворсин, что указывает на развитие некротической стадии заболевания.

Заключение

Таким образом, прогрессивное снижение количества лимфоцитов центральной венозной крови у

животных свидетельствует о течении острой артериальной мезентериальной ишемии и может являться неблагоприятным прогностическим признаком заболевания. При снижении абсолютного количества лимфоцитов центральной венозной крови более чем на 90% от исходного следует диагностировать некротическую стадию острой мезентериальной ишемии.

Список литературы

1. Алексеев Т.В., Мовчан К.Н., Безносков А.И. Пути оптимизации больных с мезентериальным тромбозом в муниципальных учреждениях здравоохранения малых городов и сельской местности. Вестник хирургии им. И.И. Грекова, 2010; 169: 2: 92–95.
2. Чепель Э. и др. Основы клинической иммунологии: перевод с английского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008; 416.
3. Хрипун А.И., Шурыгин С.Н., Прямиков А.Д. Микроциркуляция кишечника в норме и при остром нарушении мезентериального кровообращения. Ангиология и сосудистая хирургия, 2010; 16: 3: 34–36.
4. Хрипун А.И., Шурыгин С.Н., Прямиков А.Д. Лечение острой окклюзии верхней брыжеечной артерии - современный взгляд на проблему. Анналы хирургии, 2009; 5: 9-13.
5. Akpinar E. et al. Spontaneous recanalization of superior mesenteric artery occlusion following angioplasty and stenting of inferior mesenteric artery. Cardiovasc. Intervent. Radiol., 2006; 29: 1: 137-139.
6. Anadol A.Z., Ersoy E., Taneri F. Laparoscopic «second-look» in the management of mesenteric ischemia. Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech., 2004; 14: 4: 191-193.
7. Stamatacos M. et al. Mesenteric ischemia: still a deadly puzzle for the medical community. Tohoku J. Exp. Med., 2008; 216: 3: 197-204.
8. Zuccon W., Creperio G., Paternolillo R. Early diagnosis in acute mesenteric ischemia. Case series and clinical review. Ann. Ital. Chir., 2010; 81: 3: 83-192.

Поступила 06.02.2015

Сведения об авторах

1. Артамонова З.А. - ассистент кафедры общей хирургии, Читинская государственная медицинская академия. E-mail: zoyaartamonova@mail.ru;
2. Намоконов Е.В. - д.м.н., проф., заведующий кафедрой общей хирургии, Читинская государственная медицинская академия. E-mail: namokonovev@mail.ru;
3. Терешков П.П. - к.м.н., старший научный сотрудник НИИ «Экология», Читинская государственная медицинская академия. E-mail: tpp6915@mail.ru;
4. Обыденко В.И. - к.м.н., доц., заведующая кафедрой гистологии, Читинская государственная медицинская академия.

References

1. Alekseev T.V., Movchan K.N., Beznosov A.I. Ways to optimize patients with mesenteric thrombosis in municipal health care institutions in small towns and rural areas. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova*, 2010; 169: 2: 92–95.
2. Chepel' E. et al. *Osnovy klinicheskoi immunologii: perevod s angliiskogo* [Fundamentals of Clinical Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2008; 416.
3. Khripun A.I., Shurygin S.N., Priamikov A.D. Intestinal microcirculation in normal and acute disorders of mesenteric circulation. *Angiologiya i sosudistaya khirurgiya*, 2010; 16: 3: 34–36.
4. Khripun A.I., Shurygin S.N., Priamikov A.D. Treatment of acute occlusion of the superior mesenteric artery - a modern approach to the problem. *Annaly khirurgii*, 2009; 5: 9-13.
5. Akpinar E. et al. Spontaneous recanalization of superior mesenteric artery occlusion following angioplasty and stenting of inferior mesenteric artery. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, 2006; 29: 1: 137-139.
6. Anadol A.Z., Ersoy E., Taneri F. Laparoscopic «second-look» in the management of mesenteric ischemia. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.*, 2004; 14: 4: 191-193.
7. Stamatacos M. et al. Mesenteric ischemia: still a deadly puzzle for the medical community. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2008; 216: 3: 197-204.
8. Zuccon W., Creperio G., Paternolillo R. Early diagnosis in acute mesenteric ischemia. Case series and clinical review. *Ann. Ital. Chir.*, 2010; 81: 3: 83-192.

Received 06.02.2015

Information about the Authors

1. Artamonova Z. - Assistant of the Department of General Surgery, Chita State Medical Academy, Chita. E-mail: zoyaartamonova@mail.ru;
2. Namokonov E. - MD, Prof., Head of Department of General Surgery, Chita State Medical Academy, Chita. E-mail: namokonovev@mail.ru;
3. Tereshkov P. - Ph.D., Senior Research Fellow Institute "Ecology", Chita State Medical Academy, Chita. E-mail: tpp6915@mail.ru;
4. Obydenko V. - PhD, Head of the Department of Histology, Chita State Medical Academy, Chita.