

Состояние местного иммунитета слизистой оболочки и ультразвуковые образы стенки толстого кишечника у больных тяжелым острым панкреатитом

Белорусский государственный медицинский университет

Изучено содержание макрофагов и плазмоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки поперечно-ободочной кишки 14 пациентов с тяжелым острым некротизирующим панкреатитом и ультразвуковые образы стенки толстого кишечника у больных с панкреатогенным параколитом. Выявлено снижение содержания иммунных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки, более выраженное на поздних сроках заболевания. Патологическое утолщение стенки толстой кишки прилежащей к параколиту связано с таким же изменением клеточного состава собственной пластинки слизистой оболочки.

Ключевые слова: тяжелый острый панкреатит, макрофаги и плазмоциты слизистой оболочки толстого кишечника.

Согласно определению, принятому в 1992г. в Атланте, и современной общепринятой терминологии тяжелый острый панкреатит это такая форма заболевания, которая сопровождается системными осложнениями или полиорганной дисфункцией [4]. В настоящее время основной причиной развития полиорганной дисфункции принято считать универсальные микроциркуляторные нарушения в виде эндотелиита, повышенной сосудистой проницаемости, тромбоза и шунтирования, возникающие как результат системного воспалительного ответа на очаг деструкции в поджелудочной железе [10]. Другие патологические механизмы, такие как активация протеазных систем, провоспалительных цитокинов, свободных радикалов, апоптоза и медиаторов воспаления, также вовлечены в прогрессирование тяжелого острого панкреатита [9]. В этой связи очевидно, что полиорганная дисфункция не ограничена поражением жизненно-важных органов и систем, а может затрагивать и другие системы, повреждение которых не заметно при физикальной и лабораторной оценке состояния пациента.

В пользу недостаточности барьерной функций желудочно-кишечного тракта при остром панкреатите свидетельствует повышение кишечной проницаемости для микро- и макромолекул, являющаяся причиной эндотоксинемии, коррелирующей с клиническими проявлениями полиорганной недостаточности, септическими осложнениями и вероятностью летального исхода [1]. Экспериментально установлено влияние нарушения целостности кишечного эпителия, состояния местного иммунитета и энергетического голода на повреждение кишечного барьера [2].

В доступной нам литературе, а также на основании поиска в базе MEDLINE мы нашли два клинических исследования морфологического и иммунологического состояния слизистой оболочки подвздошной кишки и рентгенологического описания толстого кишечника при остром панкреатите. Первое построено на оценке глубины кишечных крипт и количества тучных клеток в собственной пластинке (СП) слизистой оболочки подвздошной кишки у трех больных тяжелым острым панкреатитом [3], второе описывает компьютерно-томографическую (КТ) картину распространения забрюшинного жирового некроза к толстой кишке 10 пациентов [11].

Целью настоящего исследования явилось определение возможной связи местного иммунитета толстой кишки с течением острого панкреатита, а также с ультразвуковой картиной стенки кишечника.

Материал и методы

Были проанализированы истории болезни и результаты иммуногистохимического исследования препаратов слизистой оболочки поперечной ободочной кишки 14 пациентов с тяжелым острым некротизирующим панкреатитом, находившихся на лечении в 9-й клинической больнице г. Минска в 2003-2004г.г. В 4-х случаях препараты слизистой оболочки кишечника были получены при аутопсии, в 10 – при биопсии во время колоноскопии. Колоноскопическое исследование проводилось с письменного согласия пациентов в установленном для исследования порядке. Критерием тяжести заболевания была выбрана прогностическая шкала Ranson [8]. Для сравнения были использованы препараты биопсий поперечно-ободочной кишки 3 амбулаторных пациентов, полученные при колоноскопии для диагностики синдрома раздраженной кишки. Протоколы ультразвукового исследования были изучены в историях болезни 145 больных тяжелым острым панкреатитом находившихся на лечении в отделении реанимации 9-й клинической больницы с 10.1999 по 08.2005г.

Фрагменты слизистой оболочки поперечно-ободочной кишки были фиксированы в 10% нейтральном формалине и заключены в парафин. Срезы толщиной 4 мкм были окрашены гематоксилином и эозином и правильно ориентированные отобраны для иммуногистохимической окраски. Для оценки местного иммунитета были выбраны плазмоциты и макрофаги собственной пластинки слизистой оболочки, так как они играют важную роль в местном иммунитете кишечника. Для идентификации иммунных клеток использовались маркеры CD68 (макрофагов) и CD79 (плазмоцитов). Подсчет иммунных клеток проводился с использованием микроскопа Leica Qwin при увеличении Ч200 в 4-5 полях зрения (п/з) для каждого препарата.

Статистический анализ выполнен с применением программного пакета STATISTICA 6. Средние величины представлены как среднее \pm стандартная ошибка.

Результаты

Средний возраст в изучаемой группе пациентов составил $43,6 \pm 2,7$ (24-71) лет, мужчин было 11, женщин-3. Средний балл тяжести по Ranson составил $5,5 \pm 0,17$ (от 3 до 7). Средний срок получения биопсийного/аутопсийного материала составил $12,5 \pm 0,98$ (от 2 до 30) дней от момента госпитализации. Основываясь на предположении, что состояние местного клеточного иммунитета слизистой оболочки кишечника может быть связано с выраженностью системного воспалительного процесса в организме, мы сравнили количество иммунных клеток в подгруппах менее тяжелого (балл Ranson 3-4) и более тяжелого (балл Ranson 5-7) панкреатита с таковым в контрольной группе. Среднее содержание макрофагов в СП слизистой поперечной ободочной кишки в одном поле зрения в подгруппе более тяжелого панкреатита, $47,5 \pm 2,0$, было достоверно меньше, чем в подгруппе менее тяжелого панкреатита, $57,5 \pm 4,3$ (Mann-Whitney U тест, $p = 0,04$) и в целом меньше чем в контрольной группе $76,9 \pm 3,3$ (Kruskal-Wallis ANOVA тест, $p < 0,01$). Имела место тенденция к меньшему содержанию плазмоцитов в СП слизистой оболочки поперечно-ободочной кишки при более тяжелом панкреатите, $72,3 \pm 4,7$, чем при менее тяжелом панкреатите, $83,3 \pm 10$ (Mann-Whitney U тест, $p = 0,51$) и в контрольной группе, $116 \pm 5,4$ (Kruskal-Wallis ANOVA тест, $p < 0,01$).

Корреляционный анализ (рис.1) показал тенденцию к уменьшению содержания макрофагов в СП слизистой оболочки поперечно-ободочной кишки в зависимости от давности заболевания (Спирмен, $\rho = -0,23$; $p = 0,12$) и обратную зависимость содержания плазмоцитов (Спирмен, $\rho = -0,32$; $p = 0,033$; рис.2). При этом, наибольшему колебанию было подвержено содержание иммунных клеток при менее тяжелом панкреатите (для макрофагов $\rho = -0,87$, $p < 0,01$; для плазмацитов $\rho = -0,84$, $p < 0,01$) в то время как при более тяжелом панкреатите количество иммунных клеток исходно уже было меньшим и в меньшей степени менялось со временем (для макрофагов $\rho = -0,09$, $p = 0,6$; для плазмацитов $\rho = -0,21$, $p = 0,23$).

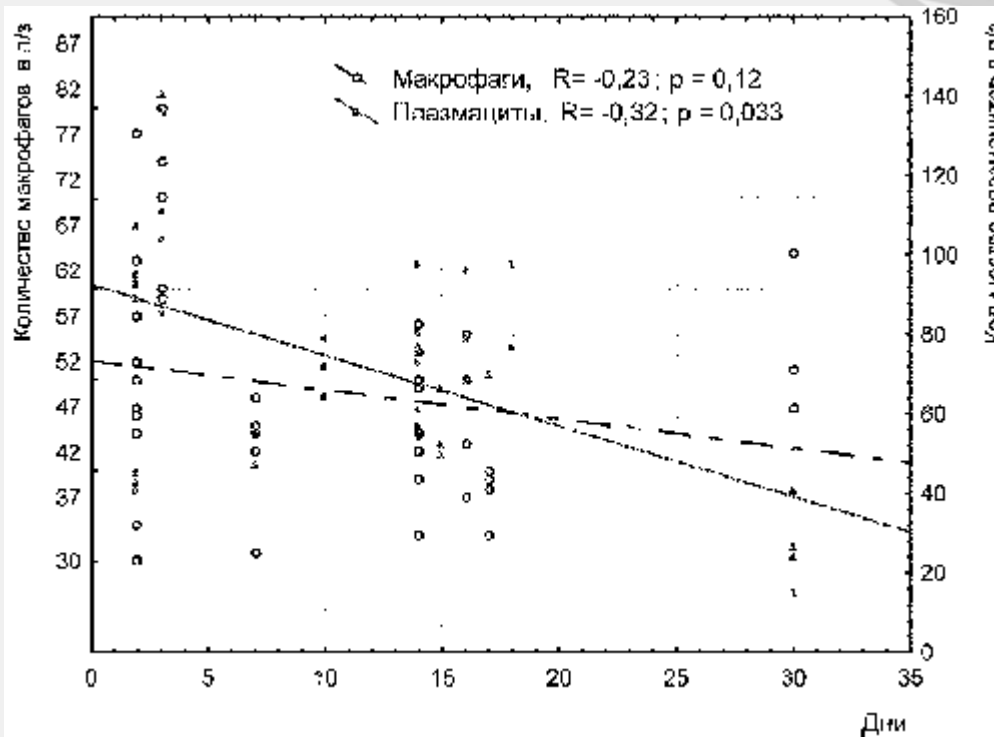


Рис.1. Зависимость количества макрофагов (прерывистая линия) и плазмоцитов (непрерывная линия) в СП от срока исследования.

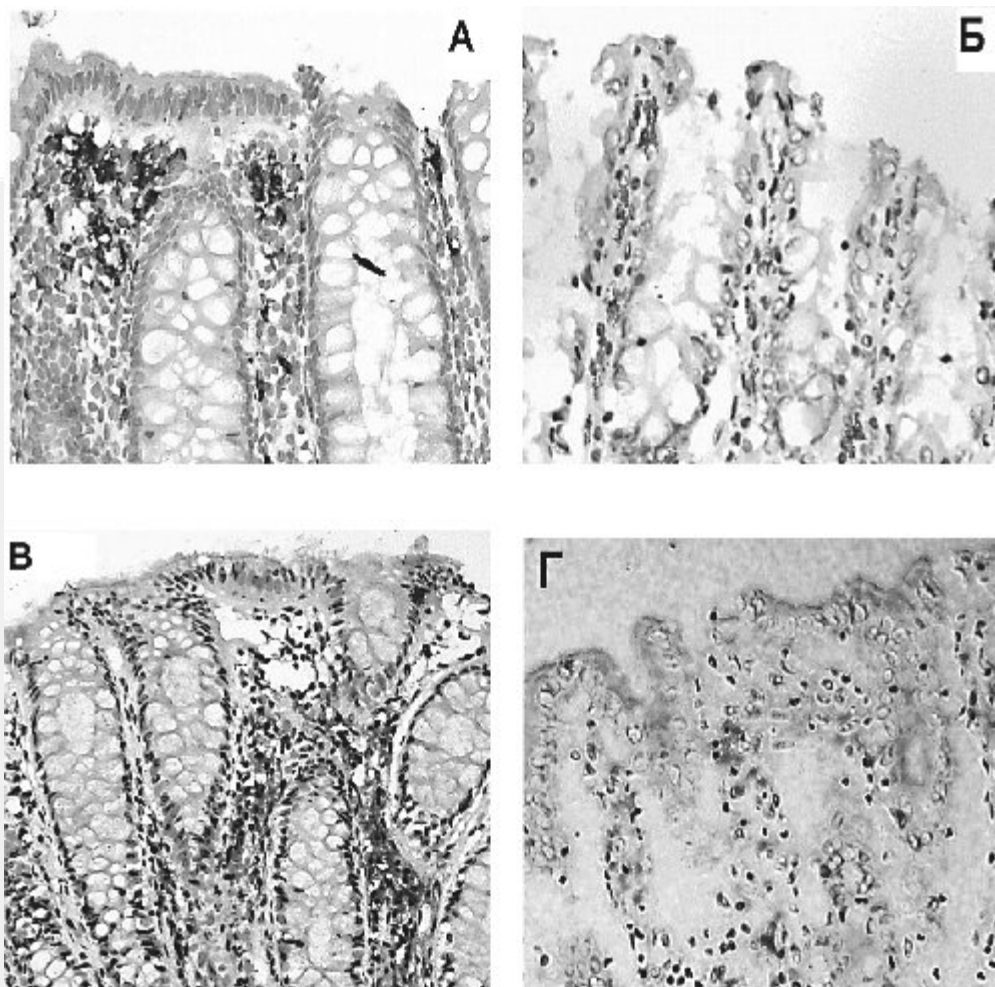


Рис.2. Изменение количества макрофагов (А, Б) и плазмацитов (В, Г) в собственной пластинке слизистой оболочки поперечной ободочной кишки в зависимости от срока исследования (А и В – 14 сутки, скопления макрофагов и плазмацитов; Б и Г – 30 сутки, единичные клетки). Иммуногистохимическая окраска с антителами к CD 68, 78, хромоген – ДАБ, Ч200.

Из 145 протоколов ультразвукового исследования описание стенки толстого кишечника с прилежащим панкреатическим скоплением жидкости было найдено в 53 случаях, из них патологически измененная стенка толстой кишки была отражена в 5. Во всех пяти случаях изменение стенки толстой кишки при УЗИ носило характер значительного утолщения от 6 до 10 мм (рис.3,4). В 4 случаях к измененному участку кишечной стенки прилежало жидкосное скопление и в одном – инфильтрат. Четыре характерных изменения кишечной стенки были выявлены в восходящей/нисходящей кишке и одно в поперечно-ободочной. В трех случаях выявление утолщения стенки кишки предшествовало инфицированию параколита (по результатам посевов операционного материала выявлены *P. Aerugenosa*, *Proteus*, *E.Coli*) за 1, 10 и 21 день. В одном случае такая УЗИ картина была выявлена на 17 сутки после инфицирования параколита. У одного пациента утолщение стенки поперечно-ободочной кишки (рис.3) не было связано с нагноением. Была взята биопсия из измененного участка с последующим иммуногистохимическим исследованием, которое показало значительное снижение содержания макрофагов в СП слизистой оболочки (рис.5,6).

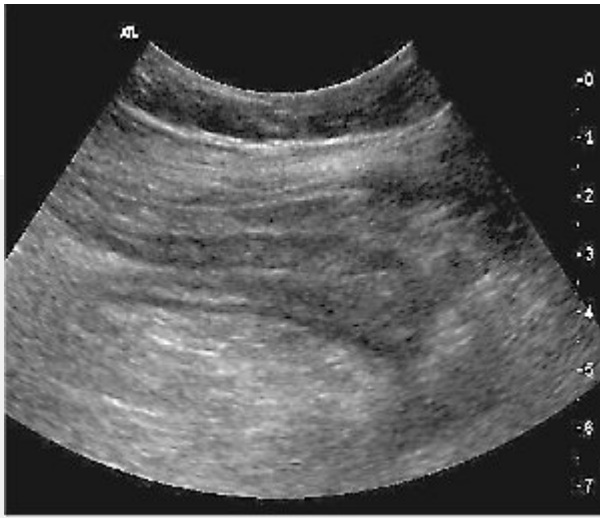


Рис.3. Утолщение стенки поперечно- ободочной кишки прилежащей к жидкосному скоплению.

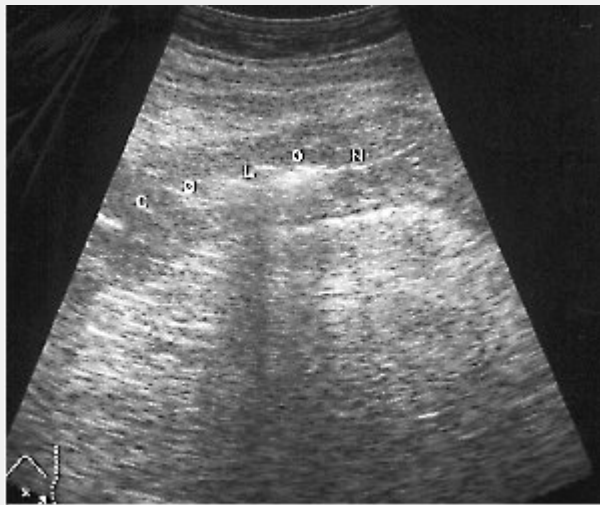


Рис.4. Утолщение стенки нисходящей ободочной кишки прилежащей к параколиту.

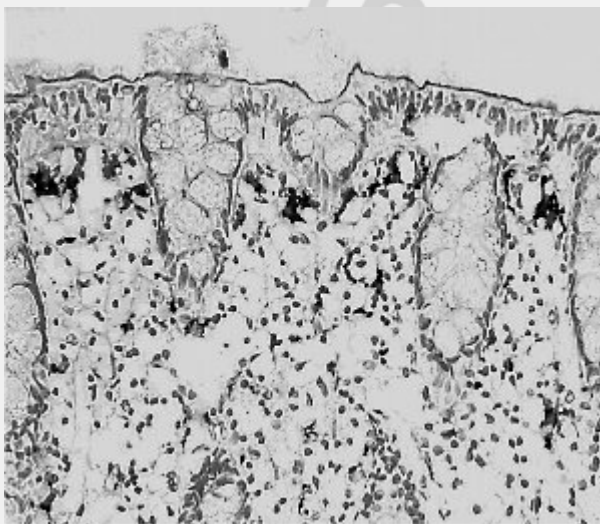


Рис.5. Снижение содержания макрофагов в СП поперечно-ободочной кишки на участке прилежащему к инфильтрату.

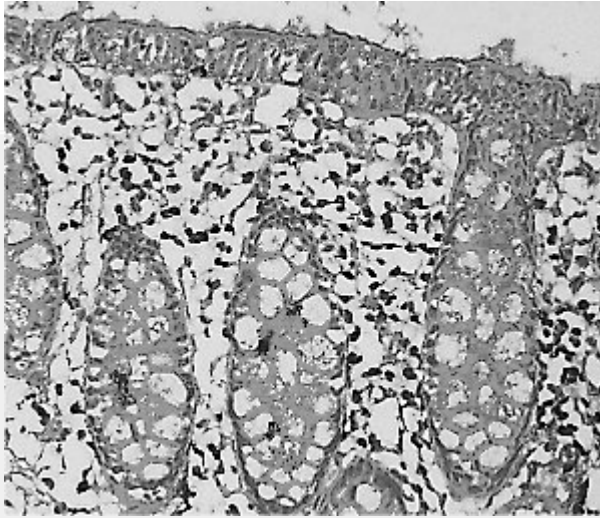


Рис.6. Нормальное содержание плазматиков на этом же участке кишки. Иммуногистохимическая окраска с антителами к CD 68, 78, хромоген – ДАБ, Ч200. Обсуждение

В настоящем исследовании показано, что слизистая оболочка и вся стенка толстого кишечника претерпевает структурные и иммунологические изменения при тяжелом остром панкреатите. Значительное уменьшение количества макрофагов и плазмоцитов в СП слизистой оболочки толстого кишечника может свидетельствовать о местном иммунодефиците. Мы не располагаем данными о состоянии местного иммунитета слизистой оболочки кишечника больных, у которых развились септические осложнения острого панкреатита. Однако связь между инфицированием параколита и предшествующим утолщением стенки кишечника с одной стороны и обеднением СП слизистой оболочки кишечника макрофагами и утолщением стенки кишечника с другой говорит о том, что для реализации функциональной недостаточности стенки кишки иммунологический дефицит в ней должен иметь определенную степень выраженности. Возможно также, что кроме иммунологического имеют место и другие механизмы «биологической несостоятельности» кишечной стенки. Известно, что дефицит макрофагов и плазмоцитов

СП слизистой оболочки толстой кишки предрасполагает к рецидивированию колита, ассоциированного с *C.difficile*, механизм повреждающего действия которой состоит в нарушении межклеточных соединений и парацеллюлярной транслокации [5,6]. L.P. Van Minnen с соавторами показали, что распространение парапанкреатического инфильтрата к стенке толстой кишки приводило к ее макроскопическим изменениям в 10 случаях, выявляемым при КТ, и микроскопическим в виде периколита, субсерозных кровоизлияний в 6 случаях и ишемии стенки кишки в 4 [11]. В нашем исследовании в четырех случаях макроскопические изменения стенки толстой кишки были связаны с гнойным параколитом в том числе предшествовали ему в трех случаях.

Сниженное содержание макрофагов и плазмоцитов может говорить об отсутствии воспаления в СП и в частности об отсутствии реакции на антигенную стимуляцию, что возможно при отсутствии транслокации. Основанием для такого предположения послужили данные о резком угнетении апоптоза макрофагов и плазматиков при воспалении в СП слизистой оболочки толстой кишки [7]. Авторами установлено, что в норме иммунные клетки СП слизистой оболочки толстой кишки в ответ на

антигенную стимуляцию подвергаются апоптозу. Авторы считают, что апоптоз иммунных клеток в данном случае ограничивает воспалительный ответ на антигенную стимуляцию из просвета кишки.

Другие известные механизмы, такие как экспрессия хемоаттрактантов, колониестимулирующих факторов, цитокинов так же вовлечены в формирование воспалительной инфильтрации СП в ответ на инвазию бактерий и их антигенов [5].

В норме количество плазмоцитов СП слизистой оболочки толстой кишки больше, чем макрофагов. В нашем исследовании соотношение среднего количества плазмоцитов к среднему количеству макрофагов в контрольной группе составило 1,52, в группе менее тяжелого острого панкреатита 1,45 и в группе более тяжелого острого панкреатита 1,53. Однако корреляционный анализ (рис.1) показал, что это соотношение со временем изменилось на обратное с превалированием количества макрофагов (прерывистая линия) над плазмоцитами (непрерывная линия) к 30 суткам заболевания. Это явление может быть объяснено тем, что плазмоциты являются более короткоживущими клетками, чем макрофаги и в условиях катаболического стресса их содержание может быть более подвержено такому изменению.

Сходные изменения в иммунологическом статусе слизистой оболочки подвздошной кишки больных тяжелым острым панкреатитом были выявлены Basil J. Ammori с соавторами [3]. В этом исследовании было показано, что как на ранних, так и на поздних стадиях острого панкреатита в СП слизистой оболочки подвздошной кишки значительно снижено содержание тучных клеток и их количество коррелирует с дегенеративными изменениями строения крипт.

Таким образом, изменения количества и соотношения макрофагов и плазмацитов СП слизистой оболочки толстого кишечника больных тяжелым острым панкреатитом свидетельствуют о местном иммунологическом дефиците, выраженность которого является одним из факторов, приводящих к инфицированию парапанкреатического инфильтрата или скопления жидкости.

Выводы

1. Тяжелый острый панкреатит сопровождается морфологическими изменениями слизистой оболочки толстого кишечника, характерными для местного иммунологического дефицита. При этом существует взаимосвязь между такого рода изменениями в тонкой и толстой кишке, что может указывать на стереотипный характер реакции слизистых оболочек ЖКТ при остром панкреатите.

2. На более поздних стадиях заболевания прогрессивно уменьшается количество и меняется нормальное соотношение иммунных клеток слизистой оболочки толстого кишечника.

3. Выраженность местного иммунодефицита слизистой оболочки толстого кишечника напрямую связана со степенью тяжести острого панкреатита.

Литература

1. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality // Ammori B.J, Leeder P.C, King R.F.G.J, et al. J. Gastrointes. Surg. – 1999. – Vol. 3 – P.252 – 262.

2. Basil J. Ammori. Role of the Gut in the Course of Severe Acute Pancreatitis // Pancreas – 2003. – Vol. 26(2)-P.122-129.

3. Altered intestinal morphology and immunity in patients with acute necrotizing pancreatitis//Basil J. Ammori1, Alison Cairns, Michael F. Dixon, et al. J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. – 2002. – Vol.9 – P.490 – 496.

4. Bradley E.L. A clinically based classification system for acute pancreatitis // Archives of surgery – 1993. – Vol.128 – P.586-90.
5. J. Berkes, V. K. Viswanathan, S. D. Savkovic, G. Hecht. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation // Gut – 2003. – Vol.52 – P.439 – 451.
6. Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent Clostridium difficile associated diarrhea // S. S. Johal, C. P Lambert, J Hammond, et al. J Clin Pathol – 2004. – Vol.57 – P.973 – 979.
7. Apoptosis: One of the Mechanisms That Maintains Unresponsiveness of the Intestinal Mucosal Immune System // Ping Bu, Ali Keshavarzian, David D. Stone, et al. The Journal of Immunology – 2001. – Vol. 67 – P.6399 – 6403.
8. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis // Ranson J.H., Rifkind K.M., Roses D.F., et al. Surg. Gynecol. Obstet. – 1974. – Vol.139 – P.69-81.
9. V.P. Singh, S.T. Chari. Protease inhibitors in acute pancreatitis: lessons from the bench and failed clinical trials // Gastroenterology – 2005-Vol. 128, No. 7 – P. 2172-2174.
10. Jean-Louis Vincent, Daniel De Backer. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis // Critical Care – 2005. – Vol.9(suppl 4) – P.9-12.
11. Colonic Involvement in Acute Pancreatitis // L.P. Van Minnen, M.G.H. Besselink, K. Bosscha, et al. Dig. Surg. – 2004. – Vol.21 – P.33 – 40