

II. АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВРЕМЕННОЙ МОРФОЛОГИИ

Алексеев С.А., Мяделец О.Д. , Алексеев В.С.* ,*

Сокол А.В., Руденок П.В., Пригун Д.П.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТАДИЙНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ ПЕРИТОНИТЕ

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск,

*Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск**

Республика Беларусь

Иммуногистохимическое исследование показало, что в брыжеечных лимфоузлах при реактивной стадии перитонита происходят гиперплазия коркового вещества; нарушение выработки субпопуляций Т-лимфоцитов; гиперактивация синтеза NO-синтазы в 1,38 раза (к контролю). Токсическая стадия процесса характеризовалась гиперплазией коркового вещества и паракортикальной зоны в 1,4 и 2,1 раза соответственно, снижением числа Т-хелперов и Т-супрессоров/ЦТЛ в 1,93 и 1,27 раза соответственно на фоне снижения активности в 2,3 раза NO-синтазы. Стадия нарастания полиорганной недостаточности сопровождалась существенной гипоплазией паренхимы Т- и В-зависимых зон брыжеечных лимфоузлов (в 12,7 и 13,2 раза соответственно), нарастанием дисбаланса субпопуляций Т-лимфоцитов с превалированием CD 8+ Т-супрессоров/ЦТЛ, практически полным отсутствием синтеза везикул индуцированной NO-синтазы.

Ключевые слова: распространенный перитонит, иммуногистохимическая оценка, брыжеечные лимфоузлы, NO-синтаза, субпопуляции Т-лимфоцитов.

Alekseev S.A., Mjadelets O.D. , Alekseev V.S.* ,*

Sokal A.V., Rudenok P.V., Pryhun D.P.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF STAGE DISORDERS IN DIFFUSE PERITONITIS.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus**

Immunohistochemical study showed the development of hyperplasia of the cortex in the mesenteric lymph nodes at the reactive stage of peritonitis; disorders in the production of T-lymphocytes subpopulations; hyperactivation of NO-synthase synthesis (1.38 times compared with the control). The toxic stage of the process was characterized by hyperplasia of the cortex and paracortical area (1.4 and 2.1 times, respectively), reduced number of T-helpers and T-

suppressors/ CTL (1.93 and 1.27 times, respectively) due to lower activity in NO-synthase (2.3 times). The stage of multiple organ failure development was accompanied by significant hypoplasia of the parenchyma of T- and B-dependent areas of the mesenteric lymph nodes (12.7 and 13.2 times, respectively), the growing imbalance of T-lymphocytes subpopulations with a prevalence of CD 8+ T suppressor / CTL and almost complete lack of vesicle fusion induced by NO-synthase.

Key words: *diffuse peritonitis, immunohistochemical evaluation, mesenteric lymph nodes, NO-synthase, T-lymphocytes subpopulations.*

Распространенный перитонит в стадиях интоксикации и полиорганной недостаточности сопровождается развитием вторичного иммунодефицита [1,2, 3]. Этому способствуют массивная бактериальная токсемия; травматичность выполненного оперативного вмешательства; ударный характер антибактериальной терапии; применение в послеоперационном периоде глюкокортикоидов и других препаратов; многократное повторение инвазивных и рентгенологических исследований [4,5]. Данные факторы во многом определяют нарушения иммунного звена, протекающие с апоптозом иммуноцитов (лимфоцитов/макрофагов и моноцитов); функциональной клеточной блокадой рецепторов и путей передачи сигнала; дисбалансом клеточных субпопуляций, дезинтеграцией индукторной и эффекторных областей иммунной системы ЖКТ. [6]. Одним из критериев оценки иммунных нарушений является иммуногистохимическая оценка местных органов иммуногенеза – брыжеечных лимфоузлов и уровня экспрессии клеточных нейротрансмиттеров (индуцированной NO-синтетазы), дающих представление о механизмах прогрессирования энтеральной недостаточности, присоединении кишечной транслокации и развитии синдрома полиорганной недостаточности [7].

В связи с этим, целью настоящего исследования было установление стадийных нарушений при распространенном перитоните с учетом иммуногистохимических изменений периферических органов иммуногенеза.

Материал и методы. Распределение экспрессии NO-синтетазы в брыжеечных лимфоузлах и учет содержания в них основных клеточных субпопуляций лимфоцитов Т-хелперов/индукторов и Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов выполнено пероксидазно-антипероксидазным

методом. Всего исследовано 27 брыжеечных лимфоузлов, полученных путем интраоперационной биопсии, непосредственно перед основным этапом оперативного вмешательства у пациентов с распространенным перитонитом, поступивших в разных стадиях процесса. Контрольную группу составили 7 брыжеечных лимфоузлов, полученных интраоперационно у пациентов, оперированных по поводу плановых вмешательств на органах брюшной полости, после их информированного письменного согласия. Интраоперационно из брыжеечных лимфоузлов получали участок лимфоидной ткани 10x10 мм, который фиксировали в 2%-ном растворе Замбони. После фиксации материал последовательно промывали в 0,1М фосфатном буфере (pH 7,4); 50%-ном этиловом спирте; 0,1 молярном фосфатном буфере (pH 7,54); 20% растворе сахарозы, после чего из них готовили криостатные срезы толщиной 8-10 мкм, которые затем монтировались на обработанных хром-желатином предметных стеклах. После повторной промывки в 0,1М фосфатном буфере на срезы наносился 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakoratts; x 907) и препараты помещались в теплую увлажненную камеру на 30 мин. После удаления нормальной козьей сыворотки на срезы наносилась сыворотка, содержащая поликлональные антитела к NO-синтазе, СД 4+ и СД 8+ Т-лимфоцитам в разведении 1:1000 и препараты оставлялись в увлажненной камере на 12 часов.

После удаления вторичных антител на срезы наносился раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный комплекс (Dakoratts; Z113) в разведении 1:100 с повторной инкубацией в увлажненной темной камере в течении 12 часов. В качестве хромогена для выявления продуктов реакции применялся диаминобензидин. Оценка результатов проводилась на светооптическом уровне с помощью микроскопа "Axiphot" ("Zeiss", Германия). Морфометрическое исследование включало подсчет числа иммуноположительных клеток на площади срезов, равной 0,15 мм², которые переводили из иммерсионной системы микроскопа в видеопамять компьютера с помощью цветной телекамеры стандарта S-VHS через фреймграббер и увеличивали до размера

экрана монитора (в 3 раза) с помощью алгоритма линейной аппроксимации. Это позволяло вывести из области шумов и сделать доступным для измерения внутриклеточные стриктуры. Обработка изображения включала в себя медианную фильтрацию, контрастирование по яркостному компоненту (посредством RGB-LSH-преобразования), увеличения резкости и бинаризации по цвету продуктов иммуногистохимических реакций. Определяли также количество внутриклеточных стриктур, их геометрические и оптические параметры: площадь, периметр, средний диаметр, факторы формы круга и эллипса, оптическую плотность, среднее насыщение цвета в градусах (от 0 до 360), среднюю насыщенность в относительных единицах (отн. Ед.) от 0 до 100.

Результаты исследования показали, что в брыжеечных лимфоузлах пациентов, поступивших в реактивной стадии перитонита ($n=7$) увеличивается количество и площадь лимфоидных вторичных фолликулов в 2,7 раза ($p<0,01$) и герминогенных зон в 6,2 раза ($p<0,01$); отмечается гиперплазия коркового вещества и паракортикальной зоны. Одновременно установлено увеличение в 2,1 раза по отношению к контролю ($p < 0,05$) числа Т-хелперов; снижение в 1,4 раза Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов в Т-зависимой паракортикальной зоне. Одновременно в корковой зоне лимфоузлов выявлено увеличение содержания В-лимфоцитов/антигенпредставляющих клеток (АПК) в 2,7 раза по отношению к контролю ($p < 0,01$); увеличение площади мозговой зоны в 1,28 раза к контролю, при одновременном увеличении в 1,38 раза синаптических везикул индуцированной NO-синтетазы, располагавшихся в области пресунусоидального пространства и в зоне краевого синуса. При иммуногистохимическом исследовании брыжеечных лимфоузлов у пациентов, находившихся в токсической стадии перитонита ($n=12$), отмечены выраженные сосудистые изменения с клеточной инфильтрацией, отёком капсулы, значительным расширением краевых синусов и заполнением их серозно-фиброзным содержимым. Установлено также изменение чёткости строения лимфоузлов: уменьшение их общей площади (в 1,3 раза по сравнению с контролем) и размеров коркового вещества (в 1,4 раза), паракортикальной зоны

– в 2,1 раза соответственно ($p < 0,05$).

Отмечено снижение количества Т-хелперов в 1,93 раза ($p < 0,05$), Т-супрессоров / ЦТЛ – в 1,27 раза, В-клеток – в 1,2 раза (по отношению к контролю). Кроме того, выявлено достоверное снижение в 2,3 раза ($p < 0,05$) внутриклеточных структур с изменением их площади, периметра, оптической плотности. Особенно это касалось везикул, содержащих индуцированную NO-синтетазу. Наиболее отчетливо эти изменения проявились в зоне синусов, мозгового вещества лимфатических узлов и эндотелия посткапиллярных венул.

Проведенное иммуногистохимическое исследование брыжеечных лимфатических узлов, взятых у 8 пациентов, поступивших с перитонитом в стадии полиорганной недостаточности (абдоминального сепсиса), выявило атрофию паренхимы Т- и В- зависимых зон с уменьшением в 12,7-13,2 раза Т-лимфоцитов и плазматических клеток перисинусоидальных пространств ($p < 0,01$); снижение соотношения Т-хелперов к количеству Т-супрессоров/ЦТЛ в 2,5 раза к контролю ($p < 0,05$).

В эндотелии посткапиллярных венул лимфатических узлов и краевого синуса выявлялись лишь единичные внутриклеточные структуры, содержащие везикулы индуцированной NO-синтетазы.

Реактивная стадия распространенного перитонита проявляется активацией нейроэндокринной и иммунной систем, что сопровождается развитием синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), активацией иммуноцитов, цитокинов, белков острой фазы воспаления, кислородных и азотистых метаболитов, а также факторов, секретируемых лимфоцитами/макрофагами. Данные обстоятельства сопровождаются изменениями местной иммунной системы ЖКТ - гиперплазией корковой и паракортикальной зон, нарушением соотношения популяций В- и Т-лимфоцитов в характерных зонах брыжеечных лимфоузлов с активацией синтеза основного медиатора воспаления – оксида азота (NO).

Токсическая фаза распространенного перитонита проявляется гипоплазией вторичных фолликулов; снижением основных субпопуляций Т-

лимфоцитов в корковой и паракортикальной зонах, блокадой цитокиногенеза с уменьшением содержания клеточной индуцированной NO-синтетазы.

Дальнейшее нарастание полиорганной недостаточности сопровождается аплазией лимфоузлов, Т- и В- зависимых зон; снижением общего числа лимфоцитов; тенденцией к нарушению соотношения Т-хелперов к Т-супрессорам/ЦТЛ за счет роста последних; резким уменьшением содержания клеточного нейротрансмиттера NO, что в совокупности характеризует наступление апоптоза.

Литература

1. Болотников, А.И. Иммунопатогенез и цитокиноterapia тяжелой сочетанной травмы живота, осложненной перитонитом /А.И. Болотников - // Военно-медицинский журнал – 2008, №7 – с55-56.
2. Одинцова, С.В. Иммунокорректирующая терапия в комплексном лечении гнойного перитонита: Автореф. дис. к.м.н. // М., 1995.-19с.
3. Гостищев, В.К. Перитонит / В.К. Гостищев, В.П. Сажин, А.Л. Авдовенко // М.: ГЭОТАР – Медиа, 2002. – 238с.
4. Абдоминальная хирургическая инфекция: клиника, диагностика, антимикробная терапия: практ. рук-во / Под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда - // М.: Литера, 2006 - 168с.
5. Алексеев, С.А. Абдоминальный хирургический сепсис / С.А. Алексеев // Мн: Юнипак, 2005. – 256с.
6. Норкин , М.Н. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний / М.Н. Норкин, О.Ю. Лепилина, Н.С. Тихонова и др. // Мед. иммунол. – 2000 – Т.2, №1 – с.35, 42
7. Алексеев, С.А. Формулы иммунных нарушений при распространенном перитоните / С.А. Алексеев, Д.А. Черношей, В.В. Руденок и др. – Материалы IX Всероссийской конференции общ. хирургов “Перитонит от А до Я. Всероссийская школа” / под ред. проф. А.Б. Ларичева - // Ярославль: Аверс Плюс, 2016 – с.73-76.