

Артамонова З.А., Намоконов Е.В.

ЗНАЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОЙ МЕЗЕНТЕРИАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России
(672000, г. Чита, ул. Горького, 39а, Россия)

Острая мезентериальная ишемия в настоящее время занимает одно из лидирующих мест по показателю летальности среди острых хирургических заболеваний. В связи с этим поиск лабораторного критерия, который с большей вероятностью отражал бы динамику данного патологического состояния, представляет интерес. Вместе с тем до 80 % всех иммунокомпетентных клеток локализованы в слизистой оболочке кишечника. При этом первым барьером на пути проникновения в организм антигенов являются внутриэпителиальные лимфоциты. Последние представлены в основном CD8-клетками. То есть можно предположить, что окклюзия мезентериального русла, равно как и его реперфузия, приведут к изменениям в субпопуляционной структуре лимфоцитов. Целью исследования явилось изучение некоторых показателей субпопуляционной структуры лимфоцитов на различных стадиях острой мезентериальной ишемии в эксперименте. Материалы и методы. На модели острой мезентериальной ишемии были изучены абсолютное и относительное число лимфоцитов, CD4-, CD8-клеток, а также соотношение CD4/CD8. Результаты исследования. Выявлено, что полная окклюзия краниальной брыжеечной артерии сопровождается снижением уровня лимфоцитов, увеличением отношения CD4/CD8. Заключение. В условиях острой необратимой ишемии кишечника наблюдается прогрессивное снижение общего числа лимфоцитов венозной крови с развитием дисбаланса в их субпопуляции. По содержанию CD4- и CD8-клеток, соотношению CD4/CD8 можно судить о стадии острой мезентериальной ишемии. На основании полученных данных разработан способ диагностики острой мезентериальной ишемии, объективно отражающий функциональную активность иммунной системы в зависимости от интенсивности деструктивных процессов в стенке кишечника (Патент № 2552338, Российская Федерация).

Ключевые слова: мезентериальная ишемия, клеточный иммунитет, диагностика, эксперимент

SELECTED CELLULAR IMMUNITY INDICATORS IN DIAGNOSTICS OF ACUTE MESENTERIAL ISCHEMIA

Artamonova Z.A., Namokonov E.V.

Chita State Medical Academy
(ul. Gorkogo 39a, Chita 672000, Russian Federation)

Background. The problem of early diagnosis of acute mesenteric ischemia is still relevant today. In this connection, it is of interest to search for a diagnostic marker of this pathological condition. Up to 80 % of all immunocompetent cells are localized in the intestinal mucosa. So, we can assume that the mesenteric channel occlusion can result in changes in the subpopulation structure of lymphocytes. The aim of the study is to analyse some parameters of the subpopulation structure of lymphocytes at various stages of acute mesenteric ischemia in the experiment. Materials and methods. The experiment was performed on 32 adult male rats – with an average mass of 200 g. The animals were divided into 4 equal groups. The first group was a control group. All other animals underwent laparotomy, blood sampling from the posterior vena cava, ligation of the mesenteric artery at the base of the mesentery root, suturing the wound. After 3, 6 and 8 hours, blood sampling, small bowel biopsy were performed in the second, third and fourth groups. The subpopulation structure of lymphocytes was assessed by direct immunofluorescence staining. Morphological material was stained with hematoxylin-eosin. Results. The complete occlusion of the cranial mesenteric artery was revealed to be accompanied by a decrease in the lymphocytes level, an increase in CD4/CD8 ratio. Conclusion. The data obtained were to develop a diagnostic method for acute mesenteric ischemia (Patent N 2552338, Russian Federation).

Key words: mesenteric ischemia, cellular immunity, diagnostics, experiment

ОБОСНОВАНИЕ

Острая мезентериальная ишемия занимает одно из лидирующих мест по показателю летальности среди острых хирургических заболеваний [3, 5]. Данной теме посвящено большое количество работ, однако в диагностике заболевания до сих пор остаются пробелы [4, 5]. Неудовлетворительные результаты диагностики данной патологии объясняются в основном отсутствием типичной клинической картины, невысокой чувствительностью ультразвукового и

лапароскопического видов исследований, малоодступностью точных методов диагностики, отсутствием специфических лабораторных маркеров течения заболевания и развития некроза кишки. В связи с этим представляет интерес поиск неинвазивного доступного критерия, который бы с большей вероятностью отражал динамику данного патологического состояния. Вместе с тем лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой кишечника, формируется за счёт CD3- и В-лимфоцитов, NK-клеток,

тучных клеток и эозинофилов. Межэпителиальные лимфоциты на 98 % представлены Т-клетками, из которых 75 % составляют CD3-лимфоциты (на CD8-лимфоциты приходится 85–90 %, на CD4-лимфоциты – 5–15 %). Также следует отметить, что лимфоидная ткань ЖКТ является составляющей единой лимфоидной системы, ассоциированной со слизистыми оболочками [2]. Логично предположить, что окклюзия мезентериального русла, равно как и его реперфузия, приведёт к изменениям в иммунном статусе, что отразится на субпопуляции лимфоцитов крови. Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования стало изучение некоторых показателей субпопуляционной структуры лимфоцитов на различных стадиях острой мезентериальной ишемии в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Содержание животных и постановка экспериментов проводилась в соответствии с требованиями Приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 г. и № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., а также в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» [1]. Нами был проведён эксперимент на 32 взрослых крысах-самцах средней массой 200 г. Животные были разделены на четыре равные группы. У животных первой (контрольной) группы производился забор венозной крови, в которой изучались исходные показатели субпопуляционной структуры лимфоцитов: абсолютное и относительное число лимфоцитов, CD4-, CD8-клеток и соотношение CD4/CD8. Всем остальным животным под общим обезболиванием выполнялись лапаротомия, забор крови из задней полой вены, перевязка брыжеечной артерии в основании корня брыжейки и ушивание раны. Через 3, 6 и 8 часов во второй, третьей и четвёртой группах соответственно выполнялись релапаротомия, забор крови, биопсия тонкой кишки и вывод животного из эксперимента. Забор крови осуществляли в пробирку BD Vacutainer с гепарином лития. Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли методом прямого иммунофлуоресцентного 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). Цитофлуориметрию осуществляли на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC-500» (Beckman Coulter, USA), регистрировали суммарно не менее 10 000 событий. Данные анализировали с помощью программы CXP Cytometer (Beckman Coulter). Морфологический материал окрашивали гематоксилин-эозином. Гистологический анализ микропрепаратов кишечника и морфометрические измерения проводили на MT4000 Series Biological Microscope не менее чем в десяти полях зрения при увеличении $\times 200$. Полученные данные обработаны с использованием непараметрических методов статистики. Для показателей определялись медиана (*Me*), 75-й и 25-й

перцентили (75-й; 25-й). Сравнение медиан выборок осуществляли по критерию Уилкоксона. Различия величин считали статистически значимыми при критическом уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчёт изучаемых показателей с проведением одновременного морфологического исследования стенки тонкой кишки показал следующее: к третьему часу ишемии отмечается снижение общего числа лимфоцитов, при этом относительное их число уменьшается на 27,9 % от исходной величины, тогда как абсолютное – на 40,7 % (табл. 1). При этом наблюдается относительный рост числа CD4-клеток на 23,1 % и увеличение их абсолютного числа на 51 %. Одновременно с увеличением числа CD4-клеток зафиксировано снижение относительного числа CD8-клеток на 27,8 % от исходного уровня, что привело к увеличению соотношения CD4/CD8 на 71,4 % относительно исходных показателей (табл. 1). Гистологически в эти сроки отмечается сохранение рельефа слизистой оболочки тонкого кишечника, отёк собственной пластинки, неравномерное кровенаполнение сосудов. При этом определяется хорошо выраженная щётчатая каёмка, гликокаликс сохранен, что свидетельствует об ишемической стадии заболевания.

На 6-й час ишемии прогрессирует снижение как относительного, так и абсолютного числа лимфоцитов. Относительное число лимфоцитов снижается на 42,7 %, абсолютное – на 49,5 % относительно исходных данных (табл. 1). В этот временной промежуток наблюдается стабилизация показателей CD4-клеток относительно подгруппы трёхчасовой ишемии и прогрессирование снижения числа CD8-клеток. Абсолютное число CD8-клеток уменьшается на 25,8 % относительно исходных показателей, соотношение CD4/CD8 при этом возрастает на 88,1 % относительно исходных показателей (табл. 1).

На микропрепаратах обращает на себя внимание резкое расстройство кровообращения в виде отёка, венозного полнокровия, распространённых диапедезных кровоизлияний, стазов и тромбов в венах. Особенно отёк и полнокровие выражены в подслизистой оболочке и в собственной пластинке слизистой оболочки. Наблюдается укорочение кишечных ворсин. В эпителии, выстилающей ворсинки, встречаются единичные дистрофически изменённые клетки, имеющие вид крупных вакуолей. Контуров ядер в таких клетках не определяют. Щётчатая каёмка на апикальной поверхности энтероцитов частично сохранена, в большей части энтероцитов не определяется. В единичных полях зрения на верхушке ворсинок отмечается слущивание энтероцитов в просвет кишки с обнажением соединительнотканной основы ворсинок, что также свидетельствует о течении ишемической стадии заболевания.

Восьмой час ишемии характеризуется снижением абсолютного числа всех изучаемых нами популяций иммунных клеток. Относительное число лимфоцитов снижается на 53,3 %, абсолютное число – на 65,4 % относительно исходных показателей. Относитель-

Таблица 1

Изменение основных популяций иммунных клеток в эксперименте, Ме (Q25; Q75)

Table 1

Change in main immune cell populations in experiment, Me (Q25; Q75)

Показатели	Группа № 1 (контрольная) n = 8	Группа № 2 (трехчасовая ишемия) n = 8	Группа № 3 (шестичасовая ишемия) n = 8	Группа № 4 (восьмичасовая ишемия) n = 8
Лимфоциты, %	63,95 (46,93; 65,41)	46,12 (36,52; 51,37) $p_1 \leq 0,032$	36,67 (27,64; 45) $p_2 \leq 0,046; p_4 \leq 0,032$	29,87 (25,57; 32,84) $p_3 \leq 0,046; p_5 \leq 0,020$
Лимфоциты, кл/мкл	8998 (6569; 11374)	5340 (4694; 8360) $p_1 \leq 0,046$	4542 (3790,30; 6718,50) $p_2 \leq 0,05; p_4 \leq 0,032$	3113,50 (2288,50; 4051,3) $p_3 \leq 0,046; p_5 \leq 0,020$
CD4-клетки, %	54,69 (53,82; 75,24)	67,33 (59,66; 70,83) $p_1 \leq 0,050$	69,15 (60,04; 80,65) $p_2 \leq 0,046; p_4 \leq 0,050$	78,75 (78,03; 79,48) $p_3 \leq 0,032; p_5 \leq 0,032$
CD4-клетки, кл/мкл	2594 (2068; 2748)	3916 (2493; 4992,5) $p_1 \leq 0,050$	4037 (1742,50; 6158,80) $p_2 \leq 0,05; p_4 \leq 0,046$	1598,50 (746,25; 2593) $p_3 \leq 0,046; p_5 \leq 0,032$
CD8-клетки, %	43,27 (23,45; 44,02)	31,25 (27,77; 38,77) $p_1 \leq 0,050$	29,31 (26,57; 31,75) $p_2 \leq 0,05; p_4 \leq 0,046$	20,02 (19,60; 20,34) $p_3 \leq 0,032; p_5 \leq 0,032$
CD8-клетки, кл/мкл	2122 (645; 2174)	2816 (1583; 3150,50) $p_1 \leq 0,050$	1565,50 (554,25; 2598,5) $p_2 \leq 0,046; p_4 \leq 0,050$	412,50 (180,50; 680,75) $p_3 \leq 0,020; p_5 \leq 0,020$
CD4/CD8	1,26 (1,22; 3,21)	2,16 (1,64; 2,61) $p_1 \leq 0,050$	2,37 (2,15; 2,87) $p_2 \leq 0,05; p_4 \leq 0,046$	3,94 (3,84; 4,06) $p_3 \leq 0,032; p_5 \leq 0,020$

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости между контрольными показателями и показателями группы трёхчасовой ишемии; p_2 – уровень статистической значимости между показателями групп трёхчасовой и шестичасовой ишемии; p_3 – уровень статистической значимости между показателями групп шестичасовой и восьмичасовой ишемии; p_4 – уровень статистической значимости между контрольными показателями и показателями группы шестичасовой ишемии; p_5 – уровень статистической значимости между контрольными показателями и показателями группы восьмичасовой ишемии.

ное число CD4-клеток увеличивается на 44 %, число CD8-клеток уменьшается на 53,7 % относительно исходных показателей (табл. 1). Следует отметить, что в этот временной промежуток соотношение CD4/CD8 увеличивается на 312,7 % относительно исходного уровня (табл. 1). На микропрепаратах обращают на себя внимание укорочение и утолщение кишечных ворсинок за счёт выраженного отёка, увеличение очагов кровоизлияний, распространение отёка на мышечную оболочку. Отмечено уменьшение толщины кишечной стенки. Встречаются очаговые кровоизлияния в брыжейку кишечника. Практически все энтероциты изменены по типу баллонной дистрофии. Наблюдается десквамация целых пластов эпителиальных клеток в области верхушек и на боковых поверхностях кишечных ворсин, что указывает на развитие некротической стадии заболевания. Полученные результаты можно объяснить изменениями в иммунном статусе, обусловленными массивной транслокацией кишечной микрофлоры через нарушенный кишечный барьер наряду с миграцией лимфоцитов в очаг поражения и их гибелью на фоне острой ишемии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях острой необратимой ишемии кишечника наблюдается прогрессивное снижение общего числа лимфоцитов венозной крови с развитием дисбаланса в их субпопуляции. По содержанию CD4- и CD8-клеток, соотношению CD4/CD8 можно судить о стадии острой мезентериальной ишемии. Снижение абсолютного числа лимфоцитов более чем на 65 %, абсолютного числа CD8-клеток на 80 % и более наряду с увеличением соотношения CD4/CD8 свидетельствует о некротической стадии заболевания. На основании полученных данных разработан способ диагностики острой мезентериальной ишемии, объективно отражающий функциональную активность иммунной системы в зависимости от интенсивности

деструктивных процессов в стенке кишечника (Патент № 2552338, Российская Федерация).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES**

1. Исламов Р.А. Методология эксперимента с использованием лабораторных животных // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2016. – № 1. – С. 489–492.
Islamov RA. (2016). Methodology of the laboratory animal experiment [Metodologiya ehksperimenta s ispol'zovaniem laboratornykh zhivotnykh]. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta*, (1), 489-492.
2. Хаитов Р.М. Новые данные о строении и функционировании иммунной системы желудочно-кишечного тракта (сообщение 1) // Анналы хирургической гепатологии. – 2002. – Т. 7, № 2. – С. 105–110.
Khaitov RM. (2002). New data on the structure and functioning of the digestive tract immune system [Novye dannye o stroenii i funktsionirovanii immunnoy sistemy zheludochno-kishechnogo trakta (soobshchenie 1)]. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*, 7 (2), 105-110.
3. Хрипун А.И., Шурьгин С.Н., Прямиков А.Д., Миронов А.Б., Алимов А.Н., Латонов В.В., Абашин М.В., Гусева Т.В. Современный подход к диагностике и лечению острого нарушения мезентериального кровообращения // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2014. – № 6. – С. 36–42.
Khripun AI, Shurygin SN, Pryamikov AD, Mironov AB, Alimov AN, Latonov VV, Abashin MV, Guseva TV. (2014). Modern approach to the diagnostics and treatment of acute mesenteric ischemia [Sovremennyy podkhod k diagnostike i lecheniyu ostrogo narusheniya mezenterial'nogo krovoobrashheniya]. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*, (6), 36-42.

4. Wyers MC. (2010). Acute mesenteric ischemia: diagnostic approach and surgical treatment. *Semin Vasc Surg*, 23, 9-20.

5. Zuccon W, Creperio G, Paternollo R. (2010). Early diagnosis in acute mesenteric ischemia. Case series and clinical review. *Ann Ital Chir*, (3), 83-192.

Сведения об авторах
Information about the authors

Артамонова Зоя Александровна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры общей и специализированной хирургии с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а; тел. (3022) 32-46-00, (3022) 22-47-81; e-mail: zoyaartamonova@mail.ru)

Artamonova Zoya Aleksandrovna – Candidate of Medical Sciences, Teaching Assistant at the Department of General and Special Surgery with the Course of Applied Anatomy and Operative Surgery, Chita State Medical Academy (672000, Chita, ul. Gorkogo, 39a; tel. (3022) 32-46-00, (3022) 22-47-81; e-mail: zoyaartamonova@mail.ru)

Намоконов Евгений Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и специализированной хирургии с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (e-mail: namokonovev@mail.ru)

Namokonov Evgeniy Vladimirovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of General and Special Surgery with the Course of Applied Anatomy and Operative Surgery, Chita State Medical Academy (e-mail: namokonovev@mail.ru)