

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ

МАТУСЕВИЧ Е.А., КОСИНЕЦ В.А.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Цель работы – изучить в динамике экспрессию MAC387 – маркера воспалительного ответа в печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните и возможности ее коррекции лекарственными средствами метаболического типа действия.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на 55 кроликах породы шиншилла. Распространенный гнойный перитонит моделировали путем введения в брюшную полость аэробно-анаэробной смеси *E.coli* и *B.fragilis*. Через 6 часов после заражения выполняли хирургическое лечение и в послеоперационном периоде в течение 5-и суток применяли препараты Цитофлавин или Неотон. Животных выводили из эксперимента и производили забор материала (участки печени) через 6 часов после инициации перитонита, а также на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции. После фиксации и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы. Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием антител к макрофагам Anti-Macrophage antibody MAC387(ab49408, «Abcam»). Для анализа изображений использовали компьютерную систему с цифровой камерой и лицензионным программным обеспечением, с помощью которого оценивали выраженность экспрессии иммуногистохимического маркера MAC387(ab49408).

Результаты. MAC387-позитивные макрофаги обнаруживаются в печени как в норме, так и при экспериментальном гнойном перитоните, причем при перитоните уровень экспрессии маркера внутрипеченочного воспаления MAC387 значительно возрастает. Данный механизм, возможно, является предиктором дальнейшего развития деструктивных процессов в печени с нарушением ее функции, а также системного воспаления и полиорганной недостаточности. Препарат, содержащий янтарную кислоту, Цитофлавин, по сравнению с препаратом креатинфосфата Неотон, более эффективно снижает уровень экспрессии MAC387⁺ клеток в печени.

Заключение. Применение Цитофлавина в послеоперационном периоде экспериментального распространенного гнойного перитонита позволяет корректировать интенсивность внутрипеченочного воспалительного клеточно-опосредованного ответа, способствует уменьшению степени альтерации ткани печени и оказывает цитопротекторный эффект.

Ключевые слова: экспериментальный распространенный гнойный перитонит, MAC387⁺ макрофаги, цитофлавин, неотон, коррекция, внутрипеченочный воспалительный ответ.

Abstract.

Objectives. To study the dynamics of expression of MAC387 - a marker of the inflammatory response in the liver in experimental generalized purulent peritonitis and the possibility of its correction with drugs of the metabolic type of action.

Material and methods. Experiment was conducted on 55 rabbits of the chinchilla breed. Generalized purulent peritonitis was modelled by the introduction into the abdominal cavity of the aerobic and anaerobic mixture of *E.coli* and *B.fragilis*. In 6 hours after the infection surgical treatment was carried out and in the postoperative period during 5 days the preparations Citoflavin or Neoton were used. The animals were taken from the experiment and the material (liver sections) was extracted in 6 hours after the initiation of peritonitis and also on the 1st, 3rd and 5th day after the surgery. After fixing and standard histological wiring serial sections were prepared. Immunohistochemical staining was performed using antibodies to macrophages Anti-Macrophage antibody MAC387 (ab49408, «Abcam»). Image analysis was made with the use of a computer system with a digital camera and licensed software

by means of which the level of expression of immunohistochemical marker MAC387 (ab49408) was evaluated.

Results. MAC387-positive macrophages are detected in the liver both in the norm and in experimental purulent peritonitis, in peritonitis the expression level of MAC387 marker of the intrahepatic inflammation increasing significantly. This mechanism may be a predictor of further development of destructive processes in the liver with the disturbance of its function, as well as systemic inflammation and multiple organ failure. The preparation containing succinic acid Citoflavin, in comparison with the creatine phosphate drug Neoton, more effectively reduces the level of expression of MAC387⁺ cells in the liver.

Conclusion. Citoflavin application in the postoperative period of experimental generalized purulent peritonitis enables the correction of the intensity of the intrahepatic inflammatory cell-mediated response, reduces the degree of the liver tissue alteration and exerts the cytoprotective effect.

Key words: *experimental generalized purulent peritonitis, MAC387⁺ macrophages, citoflavin, neoton, correction, intrahepatic inflammatory response.*

Проблема лечения перитонита не утратила своей актуальности и по-прежнему является одним из важнейших направлений в современной абдоминальной хирургии. Высокий уровень летальности при данном заболевании обусловлен патологическими изменениями в организме и полиорганной недостаточностью [1, 2]. Ведущим патогенетическим звеном развития ПОН является системное воспаление, возникающее при срыве местных защитных механизмов и проникновении инфекционного агента в системный кровоток [3]. Первым органом, стоящим на пути гематогенного распространения инфекции из брюшной полости по портальной системе, выступает печень. Это важнейший барьерный и детоксикационный центр в организме, который препятствует росту эндогенной интоксикации, развитию системного воспаления и полиорганной дисфункции при распространенном гнойном перитоните [4].

Первой линией неспецифической защиты выступают клетки системы мононуклеарных фагоцитов (Купферовские резидуальные клетки печени и MAC387-позитивные моноциты-макрофаги) [4]. MAC387⁺ клетки – это активированные «проникающие» макрофаги, рекрутированные из моноцитов крови в печеночную ткань [4, 5]. MAC387-позитивные клетки являются маркером активности внутрипеченочного неспецифического воспалительного ответа и определяют его интенсивность [6]. При их гиперактивации наблюдается повреждение печеночной ткани вследствие секреции большого количества провоспалительных цитокинов, хемокинов, а также привлечения в зону воспаления цитотоксических лимфоцитов и естественных киллеров [5-8]. Деструктивные изменения гепатоцитов при-

водят к прогрессированию эндотоксикоза и усугублению полиорганной дисфункции [5, 9].

В этой связи является актуальным изучение экспрессии MAC387 в ткани печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните и возможности влияния на интенсивность внутрипеченочного воспаления лекарственными средствами метаболического типа действия.

Цель работы – изучить в динамике экспрессию MAC387 – маркера воспалительного ответа в печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните и возможности ее коррекции лекарственными средствами метаболического типа действия.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 55 кроликах породы шиншилла, которые были разделены на следующие группы: интактные (n=5); с распространенным гнойным перитонитом без хирургического лечения (n=5); контрольная группа – хирургическое лечение перитонита без применения в послеоперационном периоде лекарственных средств (n=15); основная группа, хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде в течение 5-и суток препаратов: «Цитофлавин» внутривенно из расчета 28,5 мг янтарной кислоты на 1 кг массы животного (n=15); «Неотон» внутривенно из расчета 0,05 г на 1 кг массы животного (n=15).

Животные содержались в виварии в одинаковых условиях, на стандартном пищевом рационе в соответствии с международными правилами GLP. Карантинный режим животных составлял не менее 14 дней. Все

манипуляции с животными проводились в соответствии с постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 131 от 13.10.2006 г. «Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях (принятой Советом Европы в 1986 г.) и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.86 по согласованию законов, правил и административных распоряжений стран - участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Для моделирования перитонита использовали микробную смесь, состоящую из равных количеств аэробов (*E.coli*, штамм 0111 K58 НИ С 130-53) и анаэробов (*B.Fragilis*, штамм 323). Микробную смесь вводили в брюшную полость животных стерильным шприцем из расчета 6 млрд. микробных тел на 1 кг массы кролика. Количество микробных тел рассчитывали по стандарту мутности McFarland.

Через 6 часов после введения микроорганизмов у всех животных развивались симптомы перитонита: вялость, заторможенность, отказ от пищи, учащенное дыхание, вздутие живота. В основной и контрольной группах животных через 6 часов после заражения под внутривенным нембуталовым наркозом (30 мг/кг) плюс местная анестезия 50 мл 0,25%-ого раствора новокаина выполняли оперативное вмешательство: срединная лапаротомия, удаление гнойно-геморрагического выпота, промывание брюшной полости 0,02%-ым раствором хлоргексидина биглюконата; интубация тонкой кишки перфорированной полихлорвиниловой трубкой; декомпрессия и промывание тонкой кишки физиологическим раствором до светлых вод; наложение подвешной цекстомы.

Непосредственно после операции и через каждые 8 часов в течение первых 2-3-х суток проводили промывание тонкой кишки физиологическим раствором в объеме 40-60 мл на одну процедуру. Дренажную трубку удаляли из просвета тонкой кишки на 3-и сутки после операции.

Животных с распространенным гнойным перитонитом выводили из эксперимента (летальная доза нембутала) и производили забор материала через 6 часов после заражения

(10 животных), основной и контрольной групп – на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции (по 5 животных в исследуемые сроки). За норму были приняты результаты исследований, проведенных у 5 интактных (здоровых) кроликов.

Материалом для иммуногистохимического исследования служили участки печени кроликов с распространенным экспериментальным гнойным перитонитом. Всего было отобрано 55 образцов печени.

После фиксации в 10%-ом растворе нейтрального забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы. Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием антител к макрофагам Anti-Macrophage antibody [MAC387]-ab49408 («Abcam», Великобритания) с разведением 1:100.

В качестве визуализирующей системы использовали Bond Polymer Refine Detection (Leica, Великобритания), включающую комплекс вторичных антител, диаминобензин (ДАБ) в качестве хромогена и гематоксилин для докрасивания препаратов. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов проводили с использованием роботизированной станции по иммуногистохимическому окрашиванию препаратов Bond™ – MAX ProcessingModule (производства BiosystemsMelbournePtyLtd, Австралия) с использованием протоколов окрашивания и рекомендаций Leica. После автоматизированного окрашивания препараты промывали под проточной водой, проводили обезвоживание в спирте и просветление препаратов в карбол-ксилоле и ксилоле. Затем срезы заключали в среду «Biomount» и накрывали покровным стеклом. Иммуногистохимическое окрашивание оценивали по характеру экспрессии ИГХ маркера MAC387 (ab49408) (табл. 1).

Для анализа изображений использовали компьютерную систему (микроскоп Leica DM 2000 с цифровой камерой и лицензионной программой Leica Application Suite, version 3.6.0).

При исследовании срезов печени, окрашенных антителами к MAC387-позитивным макрофагам, при увеличении микроскопа x100 определяли места с наиболее выраженной экспрессией маркера. Затем, используя генератор случайных чисел, производили выборку 10 полей зрения, которые в дальнейшем подлежали количественной оценке. При увеличении x400

Таблица 1 – Характер экспрессии MAC387 в печени

ИГХ маркер (клон)	Характер экспрессии
MAC387 (ab49408) (MRP-14)	Мелкогранулярное или гомогенное цитоплазматическое и мембранное окрашивание MAC387 ⁺ -макрофагов в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого)

производили цифровые фотографии в 10 полях зрения. Фотографирование гистопрепаратов проводили в одинаковых условиях. Дальнейшую обработку цифровых изображений проводили с использованием лицензионной программы WCIF ImageJ 1.45s. С помощью данного программного обеспечения количественно оценивали интенсивность иммуногистохимического окрашивания препаратов. Для этого выраженность экспрессии маркеров рассчитывали по формуле:

$$\text{ИЭ} = \frac{\text{кол-во позитивных клеток}}{\text{общая площадь}} \times \frac{\text{площадь позитивных клеток}}{\text{общая площадь}} \times 100\%$$

где ИЭ – интенсивность экспрессии маркера MAC387 в ткани печени.

Визуальная оценка выраженности экспрессии проводилась на мониторе LG FLATRON 22EN33S-BA в условиях одинаковых настроек параметров и разрешения экрана.

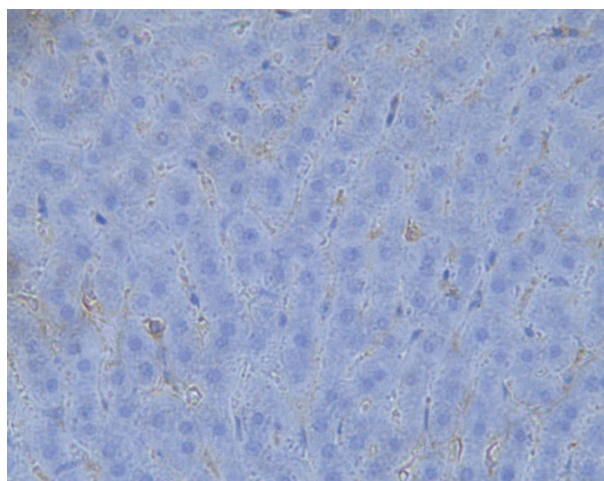
Статистическая обработка данных проведена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к исследованиям в области

медицины с использованием электронных пакетов анализа «STATISTICA 6.0», «MedCalc 10.2.0.0» и «MS Excel». Для оценки данных применены методы непараметрической (расчет медианы (Me), доверительного интервала для медианы с вероятностью 95%, размаха минимальных и максимальных значений (размах min-max), межквартильного интервала (25-75 процентиля), критериев Wilcoxon, Mann-Whitney (уровень достоверности $p < 0,05$)) статистики.

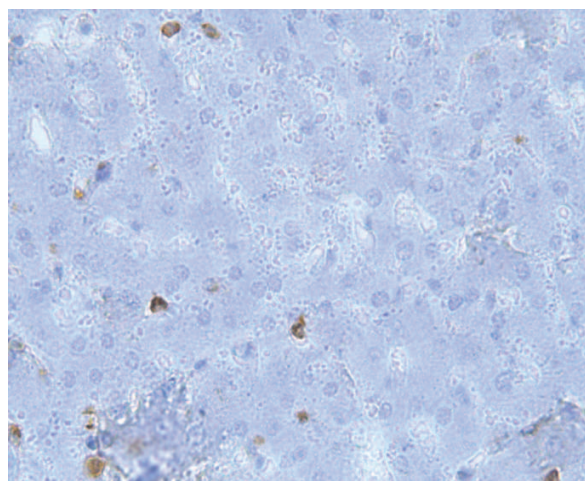
Результаты

Проведена морфометрическая оценка выраженности экспрессии маркера MAC387 в ткани печени. Распределение образцов по группам и выраженность экспрессии MAC387 в каждой из групп экспериментальных животных представлена в таблице 2.

Иммуногистохимическое исследование MAC387⁺ макрофагов показало их присутствие в печени как при экспериментальном перитоните, так и в образцах без патологии (рис. 1). Однако уже через 6 часов после моделирования перитонита происходило резкое увели-



А



Б

Рисунок 1 – Экспрессия MAC387 в паренхиме печени intactных животных (А), при 6-часовом экспериментальном распространенном гнойном перитоните (Б).
Окраска Anti-Macrophage antibody [MAC387]-ab49408. Увеличение $\times 400$.

Таблица 2 – Динамика экспрессии MAC387-позитивных макрофагов печени при экспериментальном гнойном перитоните и на фоне применения метаболической иммунокоррекции

Группа		MAC-387+ клетки, отн.ед.			
		Медиана, %	Размах (Min-Max), %	95%ДИ для медианы, %	25-75 процентиль, %
Норма (n=5)		0,043	0-0,154	0,024-0,054	0,027-0,052
6-часовой перитонит (n=5)		0,138 p1<0,0001	0,029-0,508	0,117- 0,235	0,116-0,241
Контрольная (n=15)	1-е сутки (n=5)	0,185 p1<0,0001	0,024-2,361	0,061-0,334	0,063-0,324
	3-и сутки (n=5)	0,357 p1<0,0001 p2=0,011	0,013-1,785	0,256-0,420	0,248-0,436
	5-е сутки (n=5)	0,298 p1<0,0001	0,076-1,154	0,1622-0,366	0,162-0,363
С применением препарата Неотон (n=15)	1-е сутки (n=5)	0,105 p1=0,015	0,035-0,594	0,052-0,290	0,056-0,258
	3-и сутки (n=5)	0,321 p1<0,0001 p2=0,013	0,049-1,560	0,215-0,484	0,259-0,498
	5-е сутки (n=5)	0,359 p1<0,0001 p2=0,027	0,102-0,968	0,195-0,450	0,195-0,453
С применением препарата Цитофлавин (n=15)	1-е сутки (n=5)	0,096 p1=0,0004	0,016-0,370	0,070-0,134	0,067-0,161
	3-и сутки (n=5)	0,084 p1=0,0136 p3<0,0001 p4=0,001	0,025-0,166	0,039-0,109	0,042-0,108
	5-е сутки (n=5)	0,068 p1=0,017 p3<0,0001 p4<0,0001	0,016-0,213	0,048-0,128	0,048-0,127

Примечание: p1-статистически значимо по сравнению с нормой; p2-статистически значимо по сравнению с предыдущими сутками данной группы; p3-статистически значимо по сравнению с аналогичными сутками контрольной группы; p4- статистически значимо по сравнению с аналогичными сутками группы с применением препарата Неотон.

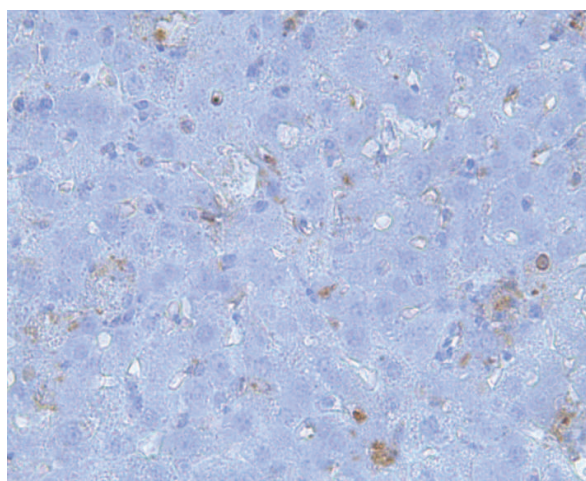
чение количества реактивных макрофагов с 0,043 (Ме) до 0,138 (Ме, p1<0,0001), причем на 1-е сутки после операции данный показатель достигал 0,185 (Ме, p1<0,0001), достоверно отличаясь от нормальных значений.

В контрольной группе на 3-и сутки послеоперационного периода активность внутрипеченочного воспаления продолжала нарастать, что проявлялось повышением экспрессии реактивных макрофагов до 0,357 (Ме, p1<0,0001) (рис. 2).

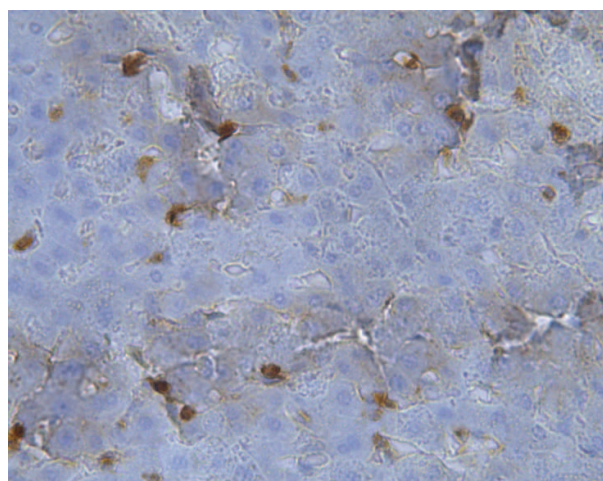
На 5-е сутки после операции экспрессия MAC387+ макрофагов составила 0,298 (Ме, p1<0,0001), статистически значимо от-

личаясь от нормальных значений в 6,93 раза (рис. 3).

В группе животных, получавших Неотон, наблюдались аналогичные изменения экспрессии маркера внутрипеченочного воспаления MAC387. На 1-е сутки после операции данный показатель составил 0,105 (Ме, p1=0,015) и не отличался от группы контроля. В дальнейшем наблюдалось увеличение экспрессии MAC387-позитивных макрофагов от 0,321 (Ме, p1<0,0001) на 3-и сутки послеоперационного периода до 0,359 (Ме, p1<0,0001) на 5-е сутки, при этом статистически значимых отличий по сравнению с группой контроля не отмечалось (рис. 4).



А



Б

Рисунок 2 – Экспрессия MAC387 в паренхиме печени на 1-е сутки (А) и 3-и сутки (Б) послеоперационного периода при экспериментальном распространенном гнойном перитоните, контрольная группа. Окраска Anti-Macrophage antibody [MAC387]-ab49408. Увеличение $\times 400$.

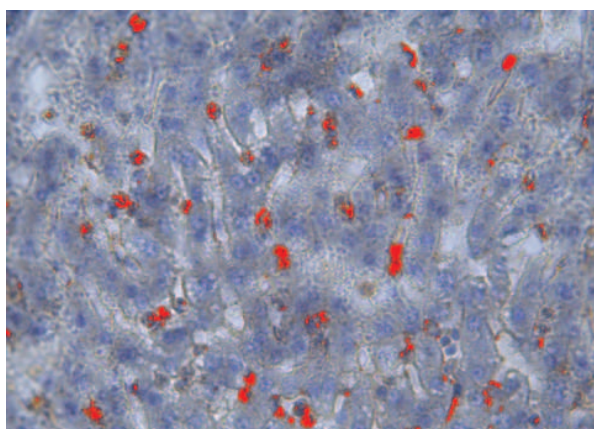


Рисунок 3 – Экспрессия MAC387 в паренхиме печени на 5-е сутки послеоперационного периода при экспериментальном распространенном гнойном перитоните, контрольная группа. Окраска Anti-Macrophage antibody [MAC387]-ab49408 (обработка в программе ImageJ 1.45s). Увеличение $\times 400$.

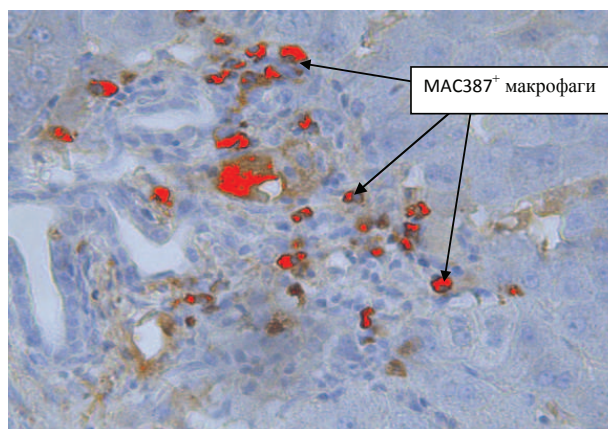


Рисунок 4 – Экспрессия MAC387 в паренхиме печени на 5-е сутки послеоперационного периода при экспериментальном распространенном гнойном перитоните, применение препарата Неотон. Окраска Anti-Macrophage antibody [MAC387]-ab49408 (обработка в программе ImageJ 1.45s). Увеличение $\times 400$.

В группе животных, получавших Цитофлавин, уже с 3-х суток послеоперационного периода отмечался иммунопротекторный эффект, что выражалось в снижении интенсивности внутрипеченочного воспалительного ответа по сравнению с группой контроля. Так, экспрессия MAC387⁺ макрофагов на 1-е сутки в данной группе статистически значимо не отличалась от группы контроля и животных, получавших Неотон, составляя 0,096 (Me, $p1=0,0004$). Однако на

3-и сутки данный показатель составил 0,084 (Me, $p1=0,0136$, $p3<0,0001$, $p4=0,001$), что было в 4,25 раза меньше, чем в группе контроля, а на 5-е сутки показатель экспрессии MAC387⁺ приблизился к нормальным значениям и составил 0,068 (Me, $p1=0,017$, $p3<0,0001$, $p4<0,0001$), что было в 4,38 раза ниже по сравнению с аналогичным сроком в контрольной группе и в 5,28 раза ниже, чем в группе животных, получавших Неотон (рис. 5).

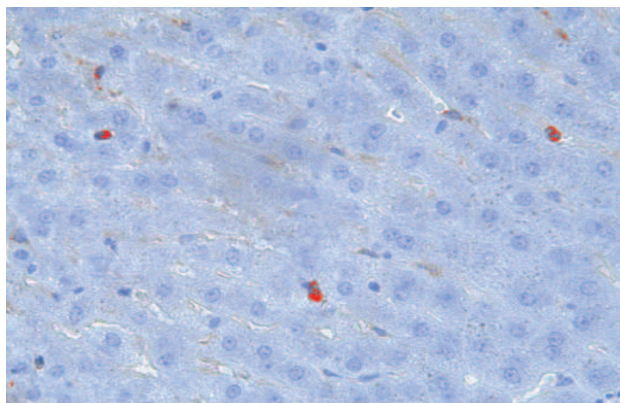


Рисунок 5 – Экспрессия MAC387 в паренхиме печени на 5-е сутки послеоперационного периода при экспериментальном распространенном гнойном перитоните, применение препарата Цитофлавин. Окраска Anti-Macrophage antibody [MAC387]-ab49408 (обработка в программе ImageJ 1.45s). Увеличение $\times 400$.

Обсуждение

Проведенное исследование показало наличие MAC387-позитивных макрофагов в печени как в норме, так и при экспериментальном гнойном перитоните, причем при перитоните уровень экспрессии маркера внутрипеченочного воспаления MAC387 значительно возрастает. Данный механизм, возможно, является предиктором дальнейшего развития деструктивных процессов в печени с нарушением ее функции, а также системного воспаления и полиорганной недостаточности. Препарат, содержащий янтарную кислоту, Цитофлавин, по сравнению с препаратом креатинфосфата Неотон, более эффективно снижает уровень экспрессии MAC387+ клеток в печени. На 5-е сутки послеоперационного периода у животных, получавших Цитофлавин, интенсивность внутрипеченочного воспаления была в 4,38 и 5,28 раза ниже, чем в группе контроля и группе животных, получавших Неотон соответственно.

Заключение

1. MAC387-позитивные макрофаги обнаруживаются в печени как в норме, так и при экспериментальном гнойном перитоните.

2. Для экспериментального распространенного гнойного перитонита характерно зна-

чительное увеличение уровня экспрессии маркера внутрипеченочного воспаления MAC387 в ткани печени.

3. Изменение экспрессии маркера внутрипеченочного воспалительного ответа при экспериментальном распространенном гнойном перитоните, возможно, является предиктором дальнейшего развития деструктивных процессов в печени с нарушением ее функции, а также системного воспаления и полиорганной недостаточности.

4. Препарат, содержащий янтарную кислоту, Цитофлавин, по сравнению с препаратом креатинфосфата Неотон, более эффективно снижает уровень экспрессии MAC387+ клеток в печени, корректирует интенсивность внутрипеченочного воспалительного клеточно-опосредованного ответа, что в результате способствует уменьшению степени альтерации ткани печени и оказывает цитопротекторный эффект.

Литература

1. Complicated intra-abdominal infections in a worldwide context: an observational prospective study (CIAOW Study) / M. Sartelli [et al.] // World J. Emergency Surgery. – 2013 Jan. – Vol. 8, N 1. – P. 1.
2. Basic principles of diagnosis and treatment of secondary peritonitis - recommendations of experts with the support of SIS / R. Gürlich [et al.] // Rozhl. Chir. – 2014 Jun. – Vol. 93, N 6. – P. 334–348, 359–352.
3. Ефименко, Н. А. Иммунопатогенез и концепция современной иммунотерапии перитонита у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой живота / Н. А. Ефименко, В. Е. Розанов, А. И. Болотников. – Москва : Автограф, 2008. – 302 с.
4. Activated liver macrophages in human liver diseases / K. Yamamoto [et al.] // J. Gastroenterol. Hepatol. – 1995. – Vol. 10, Sup. 1. – P. 72–76.
5. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver / M. Tomita [et al.] // Hepatology. – 1994 Aug. – Vol. 20, N 2. – P. 317–325.
6. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection / P. McGuinness [et al.] // Gut. – 2000 Feb. – Vol. 46, N 2. – P. 260–269.
7. Carotid artery brain aneurysm model: in vivo molecular enzyme-specific MR imaging of active inflammation in a pilot study / M. J. DeLeo [et

- al.] // Radiology. – 2009 Sep. – Vol. 252, N 3. – P. 696–703.
8. The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques / M. Gutierrez [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1999 Nov. – Vol. 71, N 3/4. – P. 321–334.
9. Technical advance: liposomal alendronate depletes monocytes and macrophages in the nonhuman primate model of human disease / B. J. Burwitz [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2014 Sep. – Vol. 96, N 3. – P. 491–501.

Поступила 30.03.2015 г.

Принята в печать 03.04.2015 г.

Сведения об авторах:

Матусевич Е.А. – соискатель кафедры госпитальной хирургии с курсами урологии и детской хирургии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», заместитель главного врача по медицинской части УЗ «Браславская ЦРБ»;

Косинец В.А. – д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии с курсами урологии и детской хирургии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 2211970, Витебская область, г. Браслав, ул. Советская, 138. Тел.моб.: +375 (29) 714-19-10, e-mail: burat@km.ru – Матусевич Евгений Анатольевич.