

В.К. ГОСТИЩЕВ<sup>1</sup>, В.А. КОСИНЕЦ<sup>1</sup>, Е.А. МАТУСЕВИЧ<sup>2</sup>, Г.П. АДАМЕНКО<sup>2</sup>

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова»<sup>1</sup>,  
Российская Федерация,  
УО «Витебский государственный медицинский университет»<sup>2</sup>,  
Республика Беларусь

**Цель.** Провести анализ состояния иммунной системы на разных органных уровнях при экспериментальном распространенном гнойном перитоните.

**Материал и методы.** Исследование проведено на 25 кроликах-самцах породы шиншилла. Изучено влияние митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток на динамику индекса миграции нейтрофильных лейкоцитов крови, Пейеровых бляшек, селезенки и паховых лимфатических узлов при экспериментальном распространенном гнойном перитоните.

**Результаты.** Установлено, что для продукции факторов ингибирования миграции нейтрофильных лейкоцитов в ответ на ФГА необходимо взаимодействие нескольких популяций иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов и моноцитов).

**Заключение.** Стимуляция митоген-активированными иммунокомпетентными клетками миграции нейтрофильных лейкоцитов при экспериментальном распространенном гнойном перитоните является устойчивым и распространенным процессом, который наблюдается в течение 5-ти суток послеоперационного периода с вовлечением органов разных уровней иммунной системы.

*Ключевые слова:* распространенный гнойный перитонит, нейтрофилы, мононуклеары, моноциты, лимфоциты, ФГА, ЛПС

**Objectives.** To analyze the condition of the immune system at different organ levels at the experimental widespread purulent peritonitis.

**Methods.** The experiment has been carried out on 25 male rabbits of chinchilla breed. Influence of mitogen-induced immunocompetent cells on the dynamics of an index of neutrophil leukocytes migration of blood, Peyer's patches, spleen and inguinal lymph nodes is studied at the experimental widespread purulent peritonitis.

**Results.** It is established that for production of factors of neutrophil leukocytes migration's inhibition in reply to PHA, interaction of several populations of immunocompetent cells (lymphocytes and monocytes) is necessary.

**Conclusions.** Stimulation by mitogen-activated immunocompetent cells of neutrophil leukocytes migration at an experimental widespread purulent peritonitis is steady and widespread process which is observed within 5 days of the postoperative period with involving of organs of different levels of the immune system.

*Keywords:* widespread purulent peritonitis, neutrophils, mononuclear cells, monocytes, lymphocytes, PHA, LPS

### Введение

Одной из наиболее сложных проблем современной абдоминальной хирургии и частой причиной неблагоприятных исходов при острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости является распространенный гнойный перитонит. Основные трудности лечения данного заболевания связаны с его полиэтиологичностью и многофакторностью [1, 2, 3]. В условиях развития системной воспалительной реакции, а по сути, абдоминального сепсиса, адекватность

и полнота хирургического вмешательства, к сожалению, не всегда является залогом успеха при лечении перитонита. Во многом определяющая роль отводится состоянию иммунной системы организма [4, 5].

Развитие выраженной реакции в ответ на действие экзо- и эндотоксинов патогенной микрофлоры приводит к активации и устремлению иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления, который, фактически, представляет вся брюшная полость. Мощный антигенный фактор является причиной недифференцированной гиперре-

активности иммунной системой. В результате образования фагоцитами активных форм кислорода, свободных радикалов с формированием реакции «кислородного взрыва» происходит повреждение не только чужеродных агентов, но и собственных тканей [6, 7].

Пул нейтрофильных лейкоцитов является участником любого воспалительного процесса. Наличие большого числа нейтрофилов указывает на наличие выраженного воспаления, а оценка их функциональной активности может служить объективным критерием потенциала реактивности иммунной системы [8].

Изучение динамики состояния функциональной активности иммунокомпетентных клеток органов периферической иммунной системы при распространенном гнойном перитоните является важной задачей, направленной на получение новых данных о патологическом процессе и проведение обоснованной тактики иммунокорригирующей терапии. В клинической практике изучение иммунологических реакций в органах периферической иммунной системы сопряжено с рядом организационных и технических трудностей.

В связи с этим нами была поставлена **цель:** провести анализ состояния иммунной системы на разных органных уровнях при экспериментальном распространенном гнойном перитоните.

### Материал и методы

Эксперимент выполнен на 25 кроликах-самцах породы шиншилла, массой 2600-3000 г. Животные были разделены на следующие группы: I – норма (n=5); II – 6-ти часовой распространенный гнойный перитонит (n=5); III – хирургическое лечение перитонита (n=15).

Животные содержались в виварии в соответствии с международными правилами GLP. Для моделирования перитонита использовали микробную взвесь, состоящую из равных количеств аэробов (*E.coli*, штамм 0111 K58 НИ С 130-53) и анаэробов (*B.Fragilis*, штамм 323). Микробную взвесь вводили в брюшную полость животных стерильным шприцем из расчета 6 млрд. микробных тел на 1 кг массы кролика. Через 6 часов после введения микроорганизмов в III-ей группе животных с целью лечения перитонита и устранения энтеральной недостаточности выполняли лапаротомию, санацию брюшной полости, декомпрессию тонкой кишки. Жи-

вотных с распространенным гнойным перитонитом выводили из эксперимента (летальная доза нембутала) через 6 часов после заражения и на 1-е, 3-и и 5-е сутки послеоперационного периода.

Для иммунологического исследования выполнялся забор венозной крови, селезенки, Пейеровых бляшек и подкожных лимфатических узлов.

Из данных органов готовились клеточные суспензии ( $10^7$ /мл) с использованием культуральной среды (КС), состоящей из среды RPMI-1640 (Sigma, США), 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамина и 100 мкг/мл гентамицина. Полученные клеточные суспензии (5 мл) наслаивались в центрифужной пробирке на 1 мл раствора фиккола-верографина с плотностью 1077 г/мл и центрифугировались при 400g в течение 25 минут [9]. Затем мононуклеарные лейкоциты, находящиеся в интерфазном кольце, собирали и дважды отмывали в изотоническом фосфатном буфере с доведением до концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл КС.

В части исследований мононуклеарные лейкоциты разделяли на лимфоциты и моноциты по способности последних адгезироваться на пластиковой поверхности чашек Петри. Из полученных лимфоцитов и моноцитов готовили клеточные суспензии в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл культуральной среды. Морфологическая чистота полученных иммунокомпетентных клеток (мононуклеарных лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов) оценивалась окраской гематоксилин-эозином, реакцией на неспецифическую эстеразу и была в пределах 95-97%.

Митогениндуцированная цитокинпродуцирующая активность иммунокомпетентных клеток изучалась в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) в прямом капиллярном тесте [10]. Для этого в три ячейки круглодонного планшета для иммунологических исследований вносились по 0,2 мл суспензии соответствующих иммунокомпетентных клеток. В первую ячейку добавляли 10 мкл фитогемагглютинина (ФГА) (40 мкг/мл), во вторую – 10 мкл липополисахарида (ЛПС) *E. Coli* (10 мкг/мл), в третью – 10 мкл среды RPMJ-1640. Планшет инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1,5 часов с последующей элиминацией митогенов путем 2-х кратного центрифугирования при 1000 об/мин в течение 3 минут. К осадку добавляли 0,1 мл ( $10^7$ /мл) суспензии нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), приготовленных на культуральной среде. НЛ

получали из селезенки кроликов путем центрифугирования в двойном градиенте плотности фиккола-верографина. Затем клетки ресуспендировались и выполнялось РТМЛ в прямом капиллярном тесте.

Результаты РТМЛ выражались в индексе миграции (ИМ), который определяли по формуле:

$$\text{ИМ} = \frac{\text{количество НЛ, мигрировавших из капилляров с митоген-индуцированными клетками}}{\text{количество НЛ, мигрировавших из капилляров с интактными клетками}}$$

Статистическую обработку данных проводили с использованием электронных пакетов анализа «STATISTICA 6.0» и «Excel». Поскольку распределение признаков носило правильный характер, а дисперсии в сравниваемых группах не отличались, были использованы методы описательной статистики, t-критерий Стьюдента (уровень достоверности отличий средних значений  $p < 0,05$ ).

### Результаты исследования

Иммунокомпетентные клетки в норме в

ответ на активацию митогенами вырабатывают ряд факторов, регулирующих миграционные свойства нейтрофильных лейкоцитов. Данное действие характерно для клеток различных органов периферической иммунной системы.

Активация мононуклеарных лейкоцитов ФГА, в отличие от ЛПС *E.coli*, вызывала ингибирование миграции нейтрофильных лейкоцитов, которое было одинаково выражено для иммунокомпетентных клеток всех исследуемых органов интактных животных. При разделении мононуклеарных лейкоцитов на лимфоциты и моноциты было установлено, что моноциты после стимуляции ЛПС *E.coli*, в отличие от ФГА, обеспечивали стимуляцию миграции нейтрофильных лейкоцитов. В то же время лимфоциты, стимулированные как ФГА, так и ЛПС *E.coli*, не оказывали существенного влияния на миграционную активность тест-клеток.

Результаты исследования состояния митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток органов периферической иммунной системы при экспериментальном распространенном гнойном перитоните представлены в таблицах 1, 2, 3, 4.

Уже через 6 часов после инициации перитонита мононуклеарные лейкоциты в крови, Пейе-

Таблица 1

### Влияние митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток на динамику индекса миграции нейтрофильных лейкоцитов крови в послеоперационном периоде при экспериментальном распространенном гнойном перитоните

Клетки	Митоген	Норма (n=5)	Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов (M±m)			
			6-ти часовой перитонит (n=5)	Хирургическое лечение (послеоперационный период)		
				1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)
Мононуклеары	ФГА	0,73±0,04	0,86±0,06 p1=0,006	1,01±0,05 p1<0,0001 p2=0,002	1,01±0,02 p1<0,0001	0,95±0,06 p1=0,0002
	ЛПС	0,96±0,03	1,00±0,04 p1=0,048	1,03±0,03 p1=0,005	1,02±0,03 p1=0,01	1,02±0,03 p1=0,02
Моноциты	ФГА	0,96±0,03	1,02±0,02 p1=0,005	1,03±0,03 p1=0,001	1,01±0,01 p1=0,004	1,03±0,02 p1=0,009
	ЛПС	1,30±0,04	1,42±0,06 p1=0,005	1,53±0,12 p1=0,005	1,50±0,08 p1=0,001	1,53±0,10 p1=0,002
Лимфоциты	ФГА	0,93±0,02	0,99±0,04 p1=0,026	1,00±0,02 p1=0,0008	1,03±0,02 p1=0,0001	1,01±0,01 p1=0,0002
	ЛПС	0,98±0,03	0,99±0,03	1,03±0,01 p1=0,008 p2=0,049	1,02±0,01 p1=0,02	1,01±0,02

Примечание: p1 – достоверно по сравнению с нормой; p2 – достоверно по сравнению с группой 6-ти часового распространенного гнойного перитонита

Таблица 2

**Влияние митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток на динамику индекса миграции нейтрофильных лейкоцитов Пейеровых бляшек в послеоперационном периоде при экспериментальном распространенном гнойном перитоните**

Клетки	Митоген	Норма (n=5)	Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов (M±m)			
			6-ти часовой перитонит (n=5)	Хирургическое лечение (послеоперационный период)		
				1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)
Мононуклеары	ФГА	0,74±0,02	0,85±0,05 p1=0,002	1,03±0,02 p1<0,0001 p2<0,0001	0,98±0,04 p1<0,0001	0,95±0,03 p1<0,0001
	ЛПС	0,96±0,03	1,00±0,03 p1=0,004	1,03±0,02 p1=0,0003	1,03±0,04 p1=0,01	1,01±0,02 p1=0,001
Моноциты	ФГА	1,02±0,04	1,04±0,03	1,03±0,04	1,02±0,06 p1=0,004	1,02±0,01
	ЛПС	1,33±0,08	1,54±0,11 p1=0,007	1,63±0,14 p1=0,003	1,56±0,06 p1=0,0006	1,53±0,09 p1=0,005
Лимфоциты	ФГА	0,91±0,05	1,00±0,07 p1=0,04	1,00±0,02 p1=0,007	1,02±0,01 p1=0,0001	1,00±0,01 p1=0,007
	ЛПС	0,96±0,01	0,99±0,05	0,98±0,03	1,04±0,04 p1=0,024	1,02±0,01 p1<0,0001

Примечание: p1 – достоверно по сравнению с нормой; p2 – достоверно по сравнению с группой 6-ти часового распространенного гнойного перитонита

Таблица 3

**Влияние митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток на динамику индекса миграции нейтрофильных лейкоцитов селезенки в послеоперационном периоде при экспериментальном распространенном гнойном перитоните**

Клетки	Митоген	Норма (n=5)	Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов (M±m)			
			6-ти часовой перитонит (n=5)	Хирургическое лечение (послеоперационный период)		
				1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е Сутки (n=5)
Мононуклеары	ФГА	0,73±0,04	0,87±0,03 p1=0,0002	1,03±0,02 p1<0,0001 p2<0,0001	1,01±0,05 p1<0,0001	1,01±0,03 p1<0,0001
	ЛПС	0,98±0,02	1,01±0,01 p1=0,006	1,04±0,01 p1<0,0001 p2=0,0005	1,03±0,05 p1=0,035	1,01±0,02 p1=0,034
Моноциты	ФГА	0,98±0,04	0,99±0,02	1,04±0,03 p1=0,026 p2=0,027	1,00±0,04	1,03±0,02 p1=0,03
	ЛПС	1,34±0,03	1,40±0,02 p1=0,014	1,56±0,03 p1<0,0001 p2<0,0001	1,50±0,03 p1<0,0001	1,43±0,04 p1=0,01
Лимфоциты	ФГА	0,95±0,02	1,01±0,03 p1=0,005	1,00±0,03 p1=0,022	1,02±0,03 p1=0,004	1,04±0,04 p1=0,002
	ЛПС	0,99±0,06	1,01±0,04	1,03±0,03	0,99±0,01	1,02±0,05

Примечание: p1 – достоверно по сравнению с нормой; p2 – достоверно по сравнению с группой 6-ти часового распространенного гнойного перитонита

**Влияние митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток на динамику индекса миграции нейтрофильных лейкоцитов паховых лимфатических узлов в послеоперационном периоде при экспериментальном распространенном гнойном перитоните**

Клетки	Митоген	Норма (n=5)	Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов (M±m)			
			6-ти часовой перитонит (n=5)	Хирургическое лечение (послеоперационный период)		
				1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)
Мононуклеары	ФГА	0,79±0,06	0,89±0,05 p1=0,023	0,99±0,02 p1<0,0001 p2=0,002	0,97±0,07 p1=0,002	0,95±0,02 p1=0,0003
	ЛПС	0,97±0,03	1,01±0,02 p1=0,01	1,03±0,03 p1=0,009	1,03±0,05 p1=0,03	1,02±0,02 p1=0,006
Моноциты	ФГА	1,00±0,02	1,01±0,02	1,01±0,06	1,00±0,03	1,01±0,01
	ЛПС	1,30±0,06	1,40±0,04 p1=0,016	1,60±0,06 p1<0,0001 p2=0,0003	1,57±0,15 p1=0,007	1,45±0,06 p1=0,004
Лимфоциты	ФГА	0,98±0,03	1,00±0,03	0,99±0,05	1,01±0,01	1,01±0,03
	ЛПС	0,99±0,05	0,99±0,05	1,03±0,03	1,02±0,06	1,01±0,04

Примечание: p1 – достоверно по сравнению с нормой; p2 – достоверно по сравнению с группой 6-ти часового распространенного гнойного перитонита

ровых бляшках, селезенке и периферических лимфатических узлах, активированные как ФГА, так и ЛПС *E.coli*, не подавляли миграцию нейтрофильных лейкоцитов, по сравнению с нормой. Это свойство мононуклеарных лейкоцитов сохранялось в течение 5-ти суток послеоперационного периода.

Стимуляция моноцитов ЛПС *E.coli*, в отличие от ФГА, вызвала существенную, статистически значимую ( $p<0,05$ ) стимуляцию миграции нейтрофильных лейкоцитов во все сроки наблюдения.

Лимфоциты иммунных органов после активации митогенами по-разному изменяли миграционные свойства нейтрофильных лейкоцитов. В отличие от ФГА, их стимуляция ЛПС *E.coli* оказывала меньшее влияние на миграцию тест-клеток. Такое действие ФГА-стимулированных лимфоцитов на нейтрофильные лейкоциты было наиболее выражено для клеток венозной крови и Пейеровых бляшек, в то время как данный эффект был менее интенсивным в селезенке и подкожных лимфатических узлах.

Таким образом, проведенные исследования показали, что для продукции фактора ингибирования миграции нейтрофильных лейкоцитов в ответ на ФГА необходимо взаимодействие нескольких популяций иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов и моноцитов). Моноциты, ак-

тивированные ЛПС *E.coli*, способны продуцировать фактор стимуляции миграции нейтрофильных лейкоцитов самостоятельно, без присутствия лимфоцитов. Возможно, различные популяции иммунокомпетентных клеток периферических органов иммунной системы обладают дифференцированным потенциалом функциональной активности в ответ на действие митогенов, в частности, – способность продуцировать цитокины, регулирующие миграционные свойства нейтрофильных лейкоцитов.

При экспериментальном распространенном гнойном перитоните уже в ранние сроки (через 6 часов) наступают изменения цитокинпродуцирующей активности митоген-активированных иммунокомпетентных клеток различных иммунных органов. Эти изменения характеризуются снижением продукции фактора ингибирования миграции нейтрофильных лейкоцитов ФГА-активированными мононуклеарными лейкоцитами, ростом стимуляции миграции нейтрофильных лейкоцитов моноцитами, активированными ЛПС *E.coli*, а также лимфоцитами, активированными ФГА.

### Заключение

Результаты исследования указывают на наличие существенного потенциала иммунокомпетентных клеток исследованных органов, в

большей степени венозной крови и Пейеровых бляшек, к быстрому ответу на бактериальную инфекцию в брюшной полости. Модуляция продукции цитокинов митоген-активированными иммунокомпетентными клетками при экспериментальном распространенном гнойном перитоните является устойчивым и распространенным процессом, который наблюдается в течение 5-ти суток послеоперационного периода с вовлечением органов разных уровней иммунной системы. Возможно, выявленная стимуляция функциональной активности иммунокомпетентных клеток может способствовать формированию гиперэргической реакции в брюшной полости с участием нейтрофильных лейкоцитов.

**Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б011-022).**

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Гостищев, В. К. Перитонит / В. К. Гостищев, В. П. Сажин, А. Л. Авдовенко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. – 238 с.
2. Савельев, В. С. Перитонит: практ. рук. / под общ. ред. В. С. Савельева, Б. Р. Гельфанда, М. И. Филимонова. – М.: Литтерра, 2006. – 208 с.
3. Шуркалин, Б. К. Гнойный перитонит / Б. К. Шуркалин. – М.: Два Мира Принт, 2000. – 224 с.
4. Брискин, Б. С. Иммунные нарушения и иммунокоррекция при интраабдоминальной инфекции / Б. С. Брискин, Н. Н. Хачатрян, З. И. Савченко // Хирургия. – 2004. – № 2. – С. 24-27.
5. Иммунный статус при перитоните и пути его патогенетической коррекции: рук. для врачей / Ю. М. Гаин [и др.]. – Минск: ООО «Юнипресс», 2001. – 256 с.
6. Луговская, С. А. Структура и функции моноцитов и макрофагов (обзор литературы) / С. А. Луговская / Клин. лаб. диагностика. – 1997. – № 9. – С. 10-16.
7. Маянский, А. Н. Клинические аспекты фагоцитоза / А. Н. Маянский, О. И. Пикюза. – Казань, 1993. – 192 с.
8. Караулов, А. В. Клиническая иммунология / А. В. Караулов. – М.: Медицина, 2008. – 602 с.
9. Boyum, A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow / A. Boyum // Scand. J. clin. a Labor. Investig. – 1968. – Vol. 21. – Suppl. 97. – P. 109.
10. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. – М., 1987. – 417 с.

#### **Адрес для корреспонденции**

119991, Российская Федерация,  
г. Москва, ул. Яузская, д. 11,  
Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова,  
кафедра общей хирургии,  
e-mail: vkosinets@yandex.ru,  
Косинец В. А.

*Поступила 11.07.2011 г.*