

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ, МАКРОФАГИ И ЭОЗИНОФИЛЫ БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ПЕРИТОНИТА ЛИМФОТРОПНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ЦЕФЕПИМА

Юкина Г.Ю.¹, Крыжановская Е.А.¹, Авраменко Е.А.¹, Томсон В.В.¹, Чеминава Р.В.¹

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: pipson@inbox.ru

С целью изучения реакции тучных клеток, макрофагов и эозинофилов брыжеечных лимфатических узлов на лимфотропное введение цефепима при лечении перитонита у 40 беспородных белых крыс вызывали 24-часовой каловый перитонит. Для оценки отдаленных последствий лимфотропного введения антибиотика брыжеечные лимфатические узлы забирали через 1 и 2 месяца после 7-суточной антибиотикотерапии. Использовали методы световой микроскопии парафиновых срезов и гистоморфометрию срезов, окрашенных по методу Романовского – Гимза и толуидиновым синим для выявления тучных клеток. Результаты показали значимое изменение относительного объема, занимаемого тучными клетками в брыжеечных лимфатических узлах, как при экспериментально вызванном перитоните, так и через 7 суток лимфотропной антибиотикотерапии. Через 2 месяца после лечения не произошло восстановления популяции тучных клеток, макрофагов и эозинофилов в брыжеечных лимфатических узлах.

Ключевые слова: брыжеечные лимфатические узлы, тучные клетки, макрофаги, эозинофилы, перитонит, цефепим, лимфотропное введение антибиотиков.

MAST CELL, EOSINOPHILS AND MACROPHAGES OF THE MESENTERIC LYMPH NODES AT PERITONITIS AND AFTER LYMPHOTROPIC THERAPY BY THE CEFEPIME

Yukina Y.G.¹, Krizhanovskaia E.A.¹, Avramenko E.A.¹, Thomson V.V.¹, Cheminava R.V.¹

Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, e-mail: pipson@inbox.ru

To study the reaction of mast cells, macrophages and eosinophils of the mesenteric lymph nodes on the lymphotropic injection of cefepime, we evoked 24 hour fecal peritonitis in the volume of 40 inbred rats. The treatment takes 7 days. For estimating a long-term effects of lymphotropic injection of antibiotic the mesenteric lymph nodes were taken after 1 and 2 months after 7 days of antibiotic therapy. The light microscopy, histomorphometry of paraffin slices, and by the method of Romanovsky-Giemsa and toluidine blue were used for revealing of mast cells. The results showed significant changes in relative volume occupied by mast cells in mesenteric lymph nodes both by experimentally induced peritonitis and in 7 days of lymphotropic antibiotic therapy with cefepime. After 2 months of treatment the population of mast cells in mesenteric lymph nodes didn't recover.

Keywords: mesenteric lymph nodes, mast cell, macrophages, eosinophils, peritonitis, cefepime, lymphotropic injection of the antibiotic.

Интерес к изучению лимфатических узлов не угасает, так как в клинической практике продолжается применение лимфотропных и эндолимфатических методик для лечения широкого круга патологий, наиболее значимыми из которых являются заболевания инфекционного генеза [3]. Поскольку лимфатический узел занимает одно из центральных мест при реализации организмом иммунного ответа и является эффекторным звеном иммунологических реакций, морфологическая оценка изменений, происходящих в этом органе, имеет огромное значение для трактовки иммунного статуса организма.

Анализ литературы показал, что в лимфатическом узле в основном рассматриваются пролиферация иммунокомпетентных клеток, антителообразование и обеспечение

рециркулирующего пула лимфоцитов при различных воздействиях на лимфатический узел [4]. Клеточным компонентам лимфатического узла, синтезирующим большое количество биологически активных веществ, таким как тучные клетки (ТК), эозинофилы и макрофаги, уделяется меньше внимания, и имеющиеся данные противоречивы [5]. В то время как ТК, макрофаги и эозинофилы, присутствующие в лимфоидной ткани, влияют на микроокружение, формирование иммунного ответа и поддержание иммунного гомеостаза.

Цель исследования: изучить популяцию ТК, макрофагов и эозинофилов брыжеечных лимфатических узлов (БЛУ) при экспериментальном перитоните и после лечения лимфотропным введением цефепима (Ц).

Материалы и методы исследования

Проведено морфологическое изучение БЛУ и морфометрическое исследование популяции ТК, макрофагов и эозинофилов при лечении экспериментального перитонита лимфотропным введением Ц в течение 7 суток в дозе 80 мг/кг. Для оценки отдаленных последствий лимфотропного введения антибиотика БЛУ забирали через 1 и 2 месяца после лечения Ц. В качестве отрицательного и положительного контроля использовали БЛУ интактных крыс и крыс после суточного перитонита.

Исследование проведено на 40 беспородных белых крысах-самцах массой 250-320 г, по 5 животных на каждую точку. Экспериментальный 24-часовой перитонит моделировали при помощи инъекции 20%-ной каловой взвеси внутрибрюшинно. Через сутки у животных под наркозом выполняли лапаротомию, ревизию и санацию брюшной полости раствором хлоргексидина. Для наркоза использовали препарат «Золетил 100» в дозировке 0,1-0,2 мг/кг, вводимый внутрибрюшинно. После завершения оперативного вмешательства животным лимфотропно в область тыла стопы задней конечности вводили Ц один раз в сутки [1]. Выбор Ц в качестве тестируемого препарата был сделан на основании рекомендаций РАСХИ по лечению перитонита [1; 7].

Эвтаназию всех крыс проводили путем ингаляции 100%-ного углекислого газа. При выполнении экспериментальных исследований руководствовались требованиями Приказа № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996) и в соответствии с рекомендациями Этического комитета ГБОУ ВПО «СПбГМУ им. И.П. Павлова». Все БЛУ фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7.4) в течение суток. По стандартной гистологической методике получали парафиновые блоки, срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Bio-Optica, Италия) и по методу Романовского – Гимза («ЭргоПродакшн», Россия). Для визуализации ТК применяли толуидиновый синий (Bio-Optica, Италия). Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica

DM750 (Германия) при увеличении в 100 и 400 раз. Оценку относительного объёма, занимаемого в лимфатических узлах ТК, макрофагами и эозинофильными лейкоцитами, проводили стереологическим методом точечного счёта, используя тест-сетку окулярного микрометра с 25 точками при увеличении x280 [6]. Данные получали при регистрации 1000 точек.

Статистическая значимость различий измеряемых параметров между группами рассчитывалась методом Вальда-Вольфовица. Значение P менее 0,05 рассматривали в качестве значимого.

Результаты исследования и их обсуждение

Строение БЛУ у интактных животных соответствует классическому гистологическому описанию. Кортикальное вещество представлено лимфоидными фолликулами со светлыми герминативными центрами. Мозговые синусы широкие, содержат небольшое количество свободных макрофагов и лимфоцитов. В лимфатических узлах отмечается умеренное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла. ТК располагаются в основном субкапсулярно, а также в мозговых тяжах. Визуализировали активные макрофаги с выраженной, неправильной формы, вакуолизированной цитоплазмой, имеющие округлое или бобовидное ядро с нежно-дисперсным хроматином. Макрофаги встречаются в фолликулах, в просвете синусов и в мозговых тяжах. Эозинофилы находятся преимущественно в мозговых тяжах и субкапсулярно. Морфометрический анализ БЛУ интактных животных показал, что относительный объём, занимаемый макрофагами, составляет 7,58%, относительный объём, занимаемый ТК, так же как и относительный объём, занимаемый эозинофилами, составляет 1,22% (таблица).

Относительный объём, занимаемый в брыжеечных лимфатических узлах тучными клетками, макрофагами и эозинофильными лейкоцитами (%)

	Интактные животные (отрицательный контроль)	24-часовой перитонит (положительный контроль)	7 сут. введения цефепима	1 месяц после окончания лечения цефепимом	2 месяца после окончания лечения цефепимом
Макрофаги	7,58	12,44 p =0,17	10,68 p =0,50	5,18 p =0,50	5,82* p =0,04
Тучные клетки	1,22	0,06* p =0,007	0,00* p =0,007	0,46* p =0,007	0,3* p =0,007
Эозинофилы	1,22	1,28* p =0,044	0,64 p =0,50	0,34 p =0,17	0,62 p =0,50

* - различия статистически значимы (p<0,05) по сравнению с уровнем показателей в группе отрицательного контроля.

После 24-часового перитонита в БЛУ отмечается фолликулярная гиперплазия, нарушение микроциркуляции, межклеточный отек, расширение мозговых и корковых синусов с появлением в них лимфоцитов, макрофагов и единичных плазматических клеток. Мозговые тяжи обильно инфильтрированы макрофагами и эозинофилами, в то время как ТК единичны. Морфометрический анализ показал достоверное изменение относительного объема клеток по сравнению с группой интактных животных: увеличение относительного объема эозинофилов до 1,28%, уменьшение относительного объема ТК в 20 раз до 0,06%, относительный объём макрофагов увеличивается до 12,44% (таблица).

После лечения перитонита лимфотропным введением Ц в течение 7 суток в БЛУ сохраняются проявления нарушения микроциркуляции, но отмечается уменьшение межклеточного отека. В просвете синусов видны единичные лимфоциты и макрофаги. Макрофаги и эозинофилы располагаются в мозговых тяжах. Эозинофилы выявляются субкапсулярно. После лечения Ц относительный объём макрофагов незначительно понизился по сравнению с данными в группе после 24-часового перитонита и составил 10,68%, что соответствует 141% от значений в группе интактных животных. ТК в лимфатическом узле после лечения Ц не выявлялись. Относительный объём эозинофилов продолжал снижаться до 0,64%, что соответствует 52% от значений в группе интактных животных (таблица).

Через месяц после лечения препаратом в БЛУ отмечается умеренное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, мозговые синусы находятся в спавшемся состоянии. Расположение макрофагов и эозинофилов соответствует таковому в группе интактных животных, однако количество этих клеток резко снижается по сравнению с количеством клеток в БЛУ при перитоните и после лечения и не достигает контрольных значений. Относительный объём, занимаемый макрофагами и эозинофилами в БЛУ, снизился до 5,18% и 0,34% соответственно, что составляет 68% и 28% от значений в группе интактных животных. ТК встречаются в мозговых тяжах и субкапсулярно. Их относительный объём возрастает по сравнению с данными после 24-часового перитонита и после лечения Ц, составляет 0,46%, что соответствует всего 38% от значений в группе интактных животных (таблица).

Через 2 месяца после лечения перитонита лимфотропным введением Ц структура БЛУ соответствует строению органа в группе интактных животных. Макрофаги встречаются в мозговых тяжах, в просвете синусов и в фолликулах. Относительный объём, занимаемый ими, равен 5,82%, что соответствует 77% от значений в группе интактных животных, и достоверно отличаются от них. Эозинофилы находятся субкапсулярно и в мозговых тяжах. Относительный объём, занимаемый эозинофилами, возрастает до 0,62%, что соответствует

51% от значений в группе интактных животных. ТК определяются в мозговых тяжах и субкапсулярно. Их относительный объём снижается до 0,3%, что достоверно отличается от значений в группе интактных животных и составляет 25% контрольных значений (таблица).

В нашем исследовании интраабдоминальная инфекция приводит к резкому нарушению численности популяций ТК, макрофагов и эозинофилов, которые синтезируют биологически активные вещества, участвующие в поддержании гомеостаза и в выработке адаптационных механизмов органа [9].

Под влиянием эндотоксинов бактерий при перитоните при активации фосфолипазы А2 усиливается дегрануляция ТК [8]. В нашей работе при экспериментальном перитоните в БЛУ выявлялись лишь единичные ТК, относительный объём, занимаемый этими клетками, составил всего 4,9% от значений в группе интактных животных. Отметим, что макрофаги, количество которых резко возросло при перитоните, также оказывают влияние на ТК. Под действием ИЛ-1, секретируемого макрофагами, осуществляется выброс содержимого везикул ТК. Мобилизации эозинофилов в БЛУ при перитоните способствует воспалительный процесс, вызванный микроорганизмами, хемотаксический фактор иммиграции эозинофилов, секретируемый ТК, а также макрофаги, участвующие в развитии эозинофильной реакции.

После 7-дневного курса лечения перитонита лимфотропным введением Ц количество макрофагов уменьшилось по сравнению с данными в группе животных с экспериментальным перитонитом, но в целом оставалось на высоком уровне, что, вероятно, продолжало оказывать влияние на популяцию ТК. В процессе лечения произошла полная дегрануляция гранул ТК, поэтому ТК не выявляются и относительный объём, занимаемый ими в БЛУ после применения Ц, равняется нулю. Количество эозинофилов после лечения также резко упало и составило 52% от значений в группе интактных животных.

Через месяц после лечения перитонита лимфотропным введением Ц в БЛУ появляется небольшое количество ТК, их относительный объём составляет 38% от значений в группе интактных животных. Количество макрофагов и эозинофилов снижено по сравнению с данными группы интактных животных и составляет 68% и 28% соответственно. Через два месяца не происходит восстановления популяций ТК, макрофагов и эозинофилов. Количество ТК остаётся минимальным, и относительный объём, занимаемый ими в БЛУ, составляет лишь 25% от значений в группе интактных животных. Относительный объём, занимаемый макрофагами, составляет 77%, эозинофилами – 51% от значений в группе интактных животных.

В нашей работе при экспериментальном перитоните и дальнейшем лечении лимфотропным введением Ц проявляются грубые количественные изменения в популяции

ТК, макрофагов и эозинофилов. Наиболее чувствительными к эндотоксинам и лимфотропному введению антибиотика являются ТК.

Уменьшение популяции ТК БЛУ может быть обусловлено как нарушением их миграции в лимфатический узел, так и нарушением и/или замедлением образования новых гранул. Об этом свидетельствует пониженное количество эозинофилов, реагирующих на хемотаксический фактор иммиграции, вырабатываемый ТК. Нарушение миграции ТК с уменьшением их числа в БЛУ, возможно, связано с недостатком хемоаттрактантов, выделяемых макрофагами, количество которых, в свою очередь, не восстанавливается до контрольных значений. Нарушение образования гранул ТК происходит, возможно, под действием Ц. При лимфотропном введении Ц нарушается моторика лимфангионов, что приводит к депонированию препарата в БЛУ и, как следствие, к более длительному воздействию антибиотика [1]. В настоящее время установлено, что антибиотики связываются, депонируются и сохраняют активность во внутриклеточном пространстве лимфоцитов и макрофагов. Лимфоциты и макрофаги, депонирующие антибиотик, при взаимодействии с микробами и их токсинами разрушаются и происходит дополнительный выход препарата [2].

Заключение. Таким образом, при лимфотропном введении Ц удаётся получить высокую концентрацию антибиотика и, вероятно, его более длительное воздействие. При этом популяции ТК, макрофагов и эозинофилов резко нарушаются и не восстанавливаются через 2 месяца после лечения. Изменения в популяции клеток, синтезирующих биологически активные вещества, могут вызывать нарушения в формировании реакций как неспецифического, так и специфического иммунитета, что необходимо учитывать при антибиотикотерапии.

Список литературы

1. Авраменко Е.А. Влияние цефепима на сократительную активность мезентериальных лимфатических сосудов и структуру лимфатических узлов в норме и при экспериментальном перитоните / Авраменко Е.А., Нечайкина О.В., Чеминава Р.В. [и соавт.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2013. – № 3. – С. 57-63.
2. Выренков Ю.Е., Харитонов В.В., Гаврилова А.В. Эндолимфатическая терапия в комплексном лечении гнойно-воспалительных и хронических заболеваний (лекция) // Вестник лимфологии. – 2013. – № 1. – С. 4-9.
3. Евдокимов В.В., Уртаев Б.М., Сипрятов В.И. Эндолимфатическая антибактериальная терапия в комплексном лечении распространённого перитонита // Сердечно-сосудистые

заболевания. – 2003. – Т. 4, № 5. – С. 49.

4. Кодина Т.В. Морфология лимфатических узлов брюшной полости в норме и при экспериментальном иммунодефиците : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ярославль, 2005. – 25 с.

5. Уртаев Б.М. Фармакокинетические показатели цефтриаксона в крови и перитонеальной жидкости при его внутривенном и эндолимфатическом введении у больных с асептическими формами панкреонекроза / Уртаев Б.М., Алиев Г.Н., Шишло В.К. [и соавт.] // Хирург. – 2013. – № 3. – С. 37-45.

6. Юкина Г.Ю. Морфофункциональные изменения щитовидной железы при иммунодепрессии : автореф. ... дис. канд. биол. наук. – СПб., 2004. – 19 с.

7. Яковлев С.В. Антимикробная терапия перитонита // Инфекции и антимикробная терапия. – 2007. – № 1. – С. 15-17.

8. Gerhard J. Molderings Mast cell function in physiology and pathophysiology // Biotrend Reviews – 2010. – Vol. 1, №.5. – P.1-12.

9. Xu X, Zhang D, Lyubynska N, Wolters PJ, Killeen NP, Baluk P, McDonald DM, Hawgood S, Caughey GH Mast cell protect mice from Mycoplasma pneumonia // Am J Respir Crit Care Med. – 2006. – Vol.173, № 2. – P. 219-225.