

Волков Д. В., Стадников А. А.,
Тарасенко В. С., Миненко К. С.

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ТОНКОЙ КИШКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (заведующий – проф. А. А. Стадников),
кафедра госпитальной хирургии, урологии (заведующий – проф. В. С. Тарасенко)
Оренбургского государственного медицинского университета, Оренбург,
e-mail: k_histology@orgma.ru, k_gspstry@orgma.ru

Несмотря на достижения современной медицины, лечение распространенных форм вторичного перитонита остается актуальной проблемой абдоминальной хирургии. Летальность при перитоните, по данным отечественных и зару-

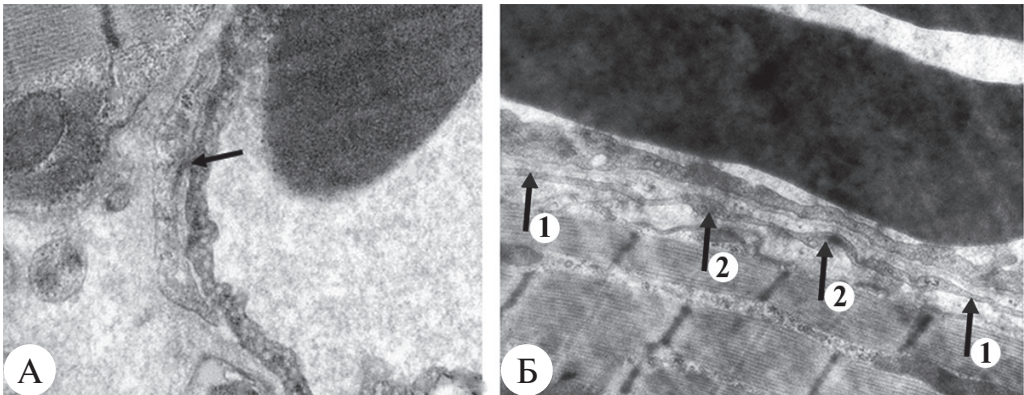


Рис. 1. Миокард правого предсердия крысы: А – интактный – щелевой контакт подома телочита и эндотелия капилляра (стрелка), ув. 40 000×; Б – через 5 минут постреперфузионного периода – подомеры (стрелка 1) и подомы (стрелка 2), ув. 25 000×

бежных авторов, составляет от 6 до 42 % [3, 9]. Прогрессирование перитонита сопровождается развитием синдрома энтеральной недостаточности, одной из причин которой является усиление свободно-радикальных процессов в условиях гипоксии тканей [2], что обуславливает необходимость применения в лечении данной патологии препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами [5].

Цель исследования – изучение влияния антиоксидантных препаратов при экспериментальном каловом перитоните на процессы регенерации тканей тонкой кишки.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены на 150 половозрелых морских свинок-самцах массой 550–700 г в 5 сериях опытов. Моделирование экспериментального калового перитонита осуществлялось по методике Т. С. Поповой [6].

Экспериментальные животные были разделены на пять групп по 30 особей. В первую группу вошли 30 морских свинок с экспериментальным каловым перитонитом без какого-либо лечения. Во вторую группу вошли 30 животных с экспериментальным каловым перитонитом, которым через два часа после завершения лапаротомии и далее ежедневно внутривенно вводили 0,9 %-ный раствор хлорида натрия в расчете 6 мл/кг. Третью группу составили 30 животных, которым внутривенно аналогичным способом вводили препарат Рексод[®], содержащий рекомбинантную супероксиддисмутазу (РСОД), через 2 часа от начала эксперимента и затем ежедневно в разовой дозе 0,2 мг/кг. Четвертую группу составили 30 животных, которым по указанной схеме вводили раствор аскорбиновой кислоты в дозе 300 мг/кг. Пятая группа включала 30 животных, которым вводили оба препарата: аскорбиновую кислоту и РСОД по аналогичной методике. Контрольную группу составили пять здоровых морских свинок, чьи морфометрические и морфологические показатели оценивали как нормальные.

Для количественной оценки клинического состояния животных в ходе эксперимента была использована шкала, основанная на методике оценки общего состояния лабораторных животных в условиях хирургического опыта [9], сущность которой заключается в выражении наблюдаемых критериев (двигательная активность, реакция на звуковой раздражитель, реакция на болевой раздражитель, пищевое поведение) в баллах. Животных выводили из опыта по 10 особей из каждой группы через 24, 48 и 72 часа от начала эксперимента под глубоким ингаляционным эфирным наркозом.

При макроскопическом исследовании кишечника производили подсчет количества структурных дефектов слизистой оболочки на протяжении 5 см от илеоцекального перехода с последующим расчетом индекса Паулса [1, 4, 8]. Материал от экспериментальных животных (дистальный участок подвздошной кишки) подвергали однотипной гистологической обработке. Для светооптических и иммуноцитохимических исследований материал фиксировали в 10 %-ном водном растворе нейтрального формалина, спирт-формоле или жидкости Буэна. Обезвоживание и уплотнение материала производили в этаноле возрастающей крепости и заливали в смесь парафина с воском (1:1). Гистосрезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином.

Для идентификации клеток с признаками апоптоза применяли следующие иммуноцитохимические реакции: на определение экспрессии проапоптотического белка p53 и на выявление интернуклеосомальной фрагментации ДНК. Материал фиксировали, обезвоживали и заливали в парафин. Исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5–6 мкм. Срезы инкубировали с моноклональными антителами к p53 (Daco, Дания) в рабочем разведении 1:50.

С целью определения экспрессии протеина Ki-67 использовали набор иммуноцитохимических реактивов (Intergen, Канада), докрасивание ядер производили 0,5 %-ным раствором метиленового зеленого на 0,1M ацетатном буфере. Подсчитывали процент окрашенных клеток на 1000 клеток в случайно выбранных полях зрения. Для оценки пролиферативной активности тканей изучали показатели митотической активности: производили подсчет клеток, находящихся на разных стадиях фаз митоза в нескольких полях зрения, с последующим расчетом доли клеток, претерпевающих митоз.

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего значения исследуемых величин (М), средней ошибки (m) для каждого показателя. Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента. Для множественных сравнений с учетом поправки Бонферрони использовался критерий вероятности $p \leq 0,01$.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведенного исследования было установлено, что через 24 часа эксперимента тяжесть состояния экспериментальных животных по группам практически не различалась. Начиная со вторых суток наблюдения ухудшение состояния животных, получавших РСОД, аскорбиновую кислоту, происходило в значительно меньшей степени, чем в I и II группах (табл. 1).

Таблица 1

**ДИНАМИКА ТЯЖЕСТИ КЛИНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, М ± М, БАЛЛЫ**

	1-е сутки	2-е сутки	3-е сутки
I группа	2,55 ± 0,15	1,13 ± 0,13	0,63 ± 0,12
II группа	2,63 ± 0,06	1,44 ± 0,06	0,75 ± 0,25
III группа	2,69 ± 0,06	2,29 ± 0,09 ^{1,2}	2,00 ± 0,14 ^{1,2}
IV группа	2,66 ± 0,08	2,29 ± 0,08 ^{1,2}	1,95 ± 0,17 ^{1,2}
V группа	2,61 ± 0,08	2,22 ± 0,07 ^{1,2}	2,06 ± 0,21 ^{1,2}

¹ $p < 0,01$ при сравнении с показателями I группы;

² $p < 0,01$ при сравнении с показателями II группы.

Выявление патоморфологических элементов в тонкой кишке показало снижение структурных нарушений через 72 часа от начала эксперимента в группах III, IV и V по сравнению с контрольными группами ($p < 0,01$). Наряду с этим индекс Паулса уже с первых суток эксперимента свидетельствовал о снижении прогрессирования деструктивных процессов в тканевых структурах стенки тонкого отдела кишечника, выявляя тем самым энтеропротекторный эффект терапии, включающей РСОД и аскорбиновую кислоту (рис. 1). Эта разница становится более выраженной с увеличением сроков наблюдения, достигая максимума через 72 часа от начала эксперимента.

Летальность среди животных была: в I группе через 1 сутки – 50 %, через 2 суток – 80 %, через 3 суток – 80 %. В группе II соответственно срокам наблюдения погибли от 40 до 80 % животных. В III, IV и V группах летальность составила от 10–20 % (1-е сутки) до 40–60 % (2–3-и сутки). Таким образом, летальность животных в эксперименте постепенно нарастала с увеличением сроков наблюде-

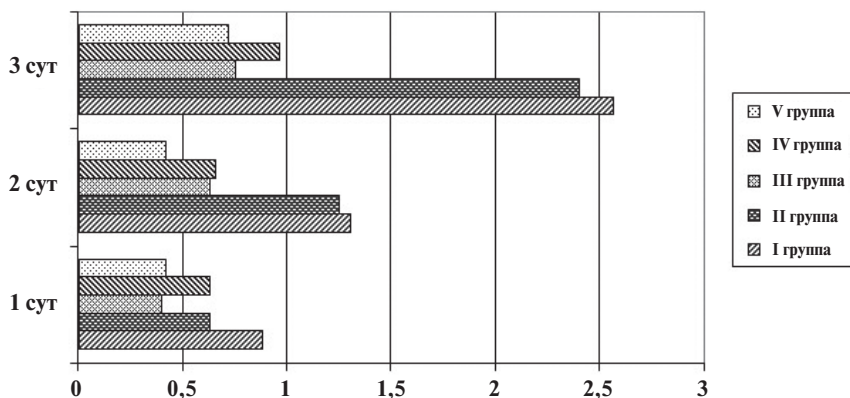


Рис. 1. Динамика количества структурных дефектов слизистой оболочки тонкой кишки экспериментальных животных (индекс Паулса, ед.)

ния во всех сериях, но общая смертность за весь эксперимент в группах животных, получавших антиоксидантную терапию, была в два раза ниже аналогичных показателей групп сравнения.

При анализе гистологических препаратов у животных I и II групп через 48 и 72 часа отмечали выраженную гетероморфность структуры ворсинок тонкой кишки. Местами ворсинки были деформированы. Эпителий, покрывающий ворсинки, был уплотнен, значительно инфильтрирован лимфоцитами, имел базофильную цитоплазму и высокое содержание рибонуклеопротеидов. Большинство эпителиальных клеток имело признаки дистрофических изменений (кариопикноз, кариолизис, везикуляция цитоплазмы). Отек тканей сопровождался локальным слущиванием эпителиоцитов.

Собственная пластинка слизистой оболочки была резко отечна и также обильно инфильтрирована лимфоцитами и плазматическими клетками. Среди лимфоцитов встречались клетки с признаками бластной трансформации. Данные клетки давали позитивную реакцию с иммуноцитохимическим маркером Ki-67, что свидетельствовало об активации гена пролиферации.

В серозной оболочке тонкой кишки отмечалась гиперемия, набухание и отек мезотелия, частичная его десквамация, мелкие кровоизлияния в стромальных компонентах. В кровеносных сосудах микроциркуляции нарастали дистрофические и деструктивные изменения эндотелия, субэндотелиально наблюдалось скопление фибрина.

Полученные данные свидетельствовали о раннем нарушении микроциркуляции на фоне интенсификации воспаления в стенке тонкого отдела кишечника экспериментальных животных в моделируемых условиях при перитоните, что приводило к усугублению дистрофических и некробиотических поражений эпителиоцитов.

В результате исследования фрагментов тонкой кишки экспериментальных животных, у которых с целью лечебной коррекции применяли РСОД и высокие дозы аскорбиновой кислоты, отмечены существенные морфологические отличия в развитии репаративных гистогенезов по сравнению с контрольными сериями, они были наиболее выражены в V группе.

Было установлено, что введение экспериментальным животным РСОД или аскорбиновой кислоты существенно компенсировало нарушенный клеточный и тка-

невой гомеостаз тонкого отдела кишечника. Так, несмотря на сохраняющийся мозаичный характер деструктивных изменений энтероцитов и собственной пластинки слизистой оболочки, отмечалось уменьшение их выраженности (особенно через 72 часа от начала эксперимента). Уменьшалось образование и размеры субэпителиальных пространств Грюнхагена, которые формировались вследствие отслойки эпителиального пласта от базальной мембраны. Снижалось число ворсин с признаками десквамации энтероцитов. В соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы уменьшалась степень дезинтегративных процессов (кровоизлияния, эрозии).

В криптах появлялись митотически делящиеся клетки, которые перемещались по направлению к вершине ворсинок, заменяя десквамированные участки эпителия. Здесь же регистрировались эпителиоциты и соединительнотканые клетки, экспрессирующие синтез протеина Ki-67.

Через 72 часа эксперимента морфометрические показатели (субэпителиальные пространства на верхушках ворсин, десквамация эпителия, эрозии ворсин) состояния кишечной стенки свидетельствовали о постепенном возвращении к норме (табл. 2). Отмечалось уменьшение отека в мышечной оболочке и снижение явлений деструкции гладких мышечных клеток. Сосуды веноулярного звена не имели признаков агрегации эритроцитов. Их размеры составляли соответственно $32,3 \pm 1,1$, $32,8 \pm 0,9$ и $31,2 \pm 1,4$ мкм для III, IV и V групп. Следует заметить, что данные сосуды у экспериментальных животных, не получавших лечения, имели размеры $34,8 \pm 2,1$ мкм, а у получавших физиологический раствор хлорида натрия – $33,1 \pm 1,9$ мкм. Также на восстановление проницаемости микроциркуляторного русла указывало значительное уменьшение межлужочного отека и периваскулярной клеточной инфильтрации. При этом эпителиальный покров ворсинок был непрерывным.

Таблица 2

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СТРУКТУР
ТОНКОЙ КИШКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
СЕТКА Г. Г. АВАНТАДИЛОВА, МИКРОСКОП МБИ-15, ОБ. 20, ОК. 10, М ± М**

Морфометрический показатель, %	Группа экспериментальных животных									
	1-е сутки					3-е сутки				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Субэпителиальные пространства на верхушке ворсин	6,5 ± 1,3	6,1 ± 1,6	5,2 ± 1,3	5,7 ± 1,1	4,9 ± 2,1	9,7 ± 1,5	9,9 ± 1,4	5,3 ± 1,6	5,0 ± 1,1	4,3 ± 0,9 ^{1,2}
Десквамация эпителия	20,9 ± 3,6	21,6 ± 4,1	20,9 ± 3,3	20,4 ± 2,2	19,3 ± 2,5	33,2 ± 2,6	29,6 ± 3,2	16,7 ± 2,6 ^{1,2}	17,6 ± 2,1 ^{1,2}	15,6 ± 3,1 ^{1,2}
Эрозии ворсин	32,1 ± 2,4	30,7 ± 3,6	28,1 ± 4,1	29,2 ± 3,1	28,7 ± 1,9	41,7 ± 3,4	39,9 ± 3,3	27,6 ± 2,3 ^{1,2}	26,1 ± 2,7 ^{1,2}	22,7 ± 3,7 ^{1,2}

¹ p < 0,01 при сравнении с показателями I группы;

² p < 0,01 при сравнении с показателями II группы.

Таким образом, применение рекомбинантной супероксиддисмутазы, аскорбиновой кислоты и особенно их сочетания уменьшает глубокие нарушения микроциркуляции и дистрофически-дегенеративные изменения в стенках сосудов, что сопровождается уменьшением зон повреждения эпителия ворсинок и крипт на фоне восстановительных регенераторных процессов. Это приводит к снижению уровня летальности животных при экспериментальном каловом перитоните и открывает перспективу для дальнейших клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аберясов Н. В.* Экспериментально-клиническое обоснование энтеропротекторной терапии при различных формах острого панкреатита: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2007.
2. *Козлов В. К.* Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. СПб.: Диалект, 2006.
3. *Кригер А. Г., Шуркалин Б. К., Горский В. А. и др.* Результаты и перспективы лечения распространенных форм перитонита // Хирургия. 2001. № 8. С. 8–12.
4. *Махакова Г. Ч., Орлов В. А., Николаев С. М.* Фармакологическая регуляция свободнорадикальных процессов при язвенной болезни. Улан-Удэ: Издательство БНЦ СО РАН, 2001.
5. *Пасечник И. Н., Скобелев Е. И., Крылов В. В. и др.* Абдоминальный сепсис и окислительный стресс // Хирургия. 2015. № 12. С. 18–23.
6. *Попова Т. С., Тамазашвили Т. Ш., Шестопалов А. Е.* Синдром кишечной недостаточности в хирургии. М.: Медицина, 1991.
7. *Фадеев С. Б., Волков Д. В.* Интегральная количественная оценка общего состояния животных в экспериментальной хирургии // Вестник Оренбургского государственного университета. 2013. № 1 (150). С. 147–150.
8. *Pauls F., Wick A. M., Mac. Key E. M. et al.* An assau method for anti ulcer substances // Gastroenterology. 1947. № 8. P. 774–782.
9. *Stănescu D, Mihalache D., Irimescu O. et al.* Treatment of acute peritonitis. Results in County Hospital Suceava with 317 cases // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. 2010. Vol. 114. P. 372–375.