

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОЛСТОЙ КИШКИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ Balb/c В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ СПЛЕНЭКТОМИИ

Нечай В.В., Хомякова Т.И., Макарова О.В.

Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ морфологии человека РАМН, Москва

Нечай Виктор Витальевич

109004, Москва, Пестовский пер., д. 6

E-mail: viktor.nechay@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Наиболее серьезным последствием спленэктомии является повышенная восприимчивость к бактериальным инфекциям, в том числе некоторым энтеробактериям.

Цель настоящей работы — дать характеристику морфофункциональных изменений толстой кишки и нарушений просветной микрофлоры в отдаленные сроки после спленэктомии.

Материалы и методы. Работа была выполнена на 40 мышах-самцах линии Balb/c массой тела 18–20 г. Мыши были случайным образом разделены на три группы: контрольную, которая состояла из интактных животных и включала 10 мышей, а также двух опытных по 15 мышей в каждой, подвергшихся операции спленэктомии. Животные содержались в стандартных условиях на одинаковой диете и выводились из эксперимента на 30-е (1-я экспериментальная группа) и 60-е (2-я экспериментальная группа) сутки после спленэктомии. Для гистологического исследования забирались кусочки ободочной кишки, кровь из полости сердца для определения уровня эндотоксина. Для оценки просветной микрофлоры отбирали фекалии из прямой кишки.

Результаты. На 30-е сутки после спленэктомии наблюдалась картина хронического катарального колита: очаговая дистрофия колоноцитов, уменьшение числа бокаловидных клеток, слабовыраженная очаговая инфильтрация стромы, представленная лимфоцитами и нейтрофилами. На 60-е сутки в ободочной кишке добавлялось увеличение митотической активности эпителиоцитов крипт, усиливалась воспалительная инфильтрация стромы. Также наблюдалось увеличение уровня эндотоксина в 1,5 раза на 30-е сутки и развитие дисбиоза I–II степени на 60-е сутки.

Заключение. Таким образом, в отдаленные сроки после спленэктомии у мышей Balb/c развивается хронический катаральный колит, сопровождающийся дисбиозом I–II степени и повышением уровня эндотоксина.

Ключевые слова: спленэктомия; колит; дисбиоз; эндотоксин.

SUMMARY

Background and aims. Hypersusceptibility to pathogens, including enterobacteria is the most serious late result of splenectomy. The aim of these studies was to give the morphofunctional characteristics of large bowel and to analyze luminal bacterial ecosystem disturbances as late results of splenectomy.

Methods. Forty male mice Balb/c with body mass 18–20 g were divided in random manner: control group consisted of ten intact mice, 15 mice in each of two experimental groups subjected to splenectomy. All animal were carried in standard housing conditions and feeding and were upset of the experiment on the 30th (experimental group I) and 60th (experimental group II) days after the splenectomy. For the histological investigation the pieces of colon were taken and processed in standard histological methods. The blood out of cardinal cavity was sampled for estimation of the endotoxin level; faeces for the analyzing of luminal bacterial ecosystem disturbances (dysbios) were taken out of the rectum.

Results. At the 30-th day after splenectomy the pattern of chronic catarrhal colitis was at the histological slides: focal dystrophy of colonocytes, reducing of the number of goblet cells, low-grade focal infiltration of

the stroma by lymphocytes and neutrophils. At the 60th day at the histological slides the increasing of mitotic activity of epithelial cells in crypts of the colon and activation of the inflammatory infiltration were observed. The endotoxin level half as large again in comparison with the control one at the 30th day. The I-II stages of dysbiotic disturbances were recognized by bacterial methods at the 30th day with the following development up the II stage at the 60th day.

Conclusions. The chronic catarrhal colitis with accompanying disturbance of luminal bacterial ecosystem (dysbiotic state of Stages I–II) and increasing of the endotoxin level in the blood are among other late results of splenectomy in mice Balb/c model

Keywords: splenectomy; colitis; dysbios and endotoxin.

Спленэктомия — хирургическое удаление селезенки — проводится при травмах селезенки, цитопенических состояниях различной этиологии, синдроме гиперспленизма, ходжкинских лимфомах, лейкозах и др. [1; 5]. После спленэктомии развивается вторичное иммунодефицитное состояние, клинически проявляющееся повышением частоты инфекционных заболеваний, более тяжелым их течением и тенденцией к хронизации воспалительного процесса [1; 5; 11; 12]. При вторичных иммунодефицитных состояниях различной этиологии развиваются воспалительные процессы в барьерных органах, одним из которых является толстая кишка. При этом нарушается ее морфофункциональное состояние, нарушается состав микрофлоры и нередко развивается хронический колит [6–8; 10]. Одним из интегративных показателей функционального состояния толстой кишки является уровень эндотоксина в сыворотке крови [2].

На сегодняшний день как в отечественной, так и в зарубежной литературе нет работ, посвященных изменениям морфофункционального состояния толстой кишки в сочетании с оценкой изменения состояния просветной микрофлоры, возникающим после спленэктомии. Изучение динамики указанных изменений, возникающих в отдаленном периоде после спленэктомии, возможно только в условиях экспериментального исследования.

Цель работы — дать характеристику морфофункциональных изменений толстой кишки и нарушений просветной микрофлоры у мышей линии Balb/c в отдаленные сроки после спленэктомии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была выполнена на 40 мышах-самцах линии Balb/c массой тела 18–20 г. (питомник Столбовая). Содержание животных и выведение их из эксперимента проводилось в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. Мыши случайным образом были разделены на три группы: контрольную, которая состояла из интактных животных и включала 10 мышей, а также двух опытных по 15 мышей в каждой со сроками выведения из эксперимента на 30-е и 60-е сутки после спленэктомии. Животные содержались в стандартных условиях на одинаковой диете.

Мышам опытных групп проводили спленэктомию под эфирным наркозом. В левом подреберье параллельно реберной дуге выполнялся косой разрез протяженностью 0,3–0,5 см. Селезенка выводилась в рану, на ее ворота накладывалась кетгуттовая лигатура, после чего орган удалялся. Рана ушивалась послойно кетгуттом. Все манипуляции проводились с соблюдением асептики и антисептики. В послеоперационном периоде терапия антибиотиками не проводилась. В течение первых двух суток после операции двух опытных группах погибло 5 мышей.

Выведение мышей из эксперимента проводилось путем передозировки эфирного наркоза. Для гистологического исследования забирались кусочки ободочной кишки. Материал фиксировался в 10%-ном нейтральном формалине, подвергался обезвоживанию и заливке в парафин с последующим изготовлением срезов толщиной 5–7 мкм и окраской их гематоксилином и эозином, а также на нейтральные и кислые гликопротеины по Шиффу и альциановым синим. Проводили морфометрическое исследование структурных компонентов толстой кишки. Оценивались число крипт на 700 мкм длины кишки и средняя высота крипт в пяти полях зрения при увеличении 100 в каждом гистопреparate. При увеличении 1000 оценивали в процентах соотношение эпителия, бокаловидных клеток и клеток стромы на крипту, число митозов на крипту, а также процентное соотношение лимфоцитов, нейтрофилов и тканевых элементов в строме. Для оценки просветной микрофлоры толстой кишки (КОЕ/г) проводился посев фекалий из прямой кишки на селективные среды: бифидо-агар, лактобак-агар, энтерококк-агар и среду Эндо производства *HiMedia* (Индия). Для определения уровня эндотоксина в сыворотке крови (eU/ml) применялся метод иммуноферментного анализа (тест-система *LAL Chromogenic Endpoint assay Hycal[®] biotech*).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У мышей контрольной группы в ободочной кишке патологических изменений обнаружено не было: наблюдалась низкая митотическая активность



эпителиоцитов, низкая секреторная активность бокаловидных клеток, диффузная слабо выраженная инфильтрация стромы, представленная преимущественно лимфоцитами (рис. 1 см. на цветной вклейке).

На 30-е сутки после спленэктомии при морфологическом исследовании ободочной кишки наблюдалась картина хронического катарального колита: очаговая дистрофия колоноцитов, уменьшение числа бокаловидных клеток, слабо выраженная очаговая инфильтрация стромы, представленная лимфоцитами и нейтрофилами.

На 60-е сутки после спленэктомии в ободочной кишке наряду с изменениями, описанными на 30-е сутки, наблюдалось увеличение митотической активности эпителиоцитов крипт, усиливалась воспалительная инфильтрация стромы с преобладанием нейтрофилов (рис. 2 см. на цветной вклейке).

Как видно из табл. 1, по данным количественной оценки структурных компонентов ободочной

кишки мышей после спленэктомии по сравнению с контролем, статистически значимо изменяется только число митозов на крипту и количественное соотношение клеточных элементов, входящих в состав инфильтрата. Число митозов на крипту увеличивалось в 4 раза, а процент нейтрофилов, входящих в состав инфильтрата, увеличивается в 3 раза к 60-м суткам по сравнению с 30-ми сутками после спленэктомии и контролем. Процент бокаловидных клеток на крипту на 30-е и 60-е сутки по сравнению с контролем прогрессирующе снижался, также отмечалась тенденция к увеличению средней высоты крипт.

После спленэктомии нарушался состав просветной микрофлоры толстой кишки (табл. 2). Эти изменения достигали максимума к 60-м суткам. В составе микрофлоры уменьшалось число высеваемых на селективных средах лактозопозитивных энтеробактерий, *E. faecium*, лакто- и бифидобактерий, что

Таблица 1

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОЛСТОЙ КИШКИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ Balb/C В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ СПЛЕНЭКТОМИИ					
№	Показатели	Группы			Достоверность различий
		контрольная	спленэктомия		
			1	30-е сутки	
			2	3	
1	Число крипт на 700 мкм	12,2 ± 0,5	12,4 ± 1,6	13,7 ± 1,8	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) > 0,05$ $p(2-3) > 0,05$
2	Средняя высота крипт, мкм	144,0 ± 31,0	191,0 ± 46,0	210,0 ± 39,0	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) > 0,05$ $p(2-3) > 0,05$
3	Процент эпителия на крипту	38,0 ± 2,0	48,0 ± 6,3	52,0 ± 6,2	$p(1-2) < 0,01$ $p(1-3) < 0,05$ $p(2-3) > 0,05$
4	Процент бокаловидных клеток на крипту	34,0 ± 1,2	26,0 ± 6,5	14,0 ± 3,7	$p(1-2) < 0,01$ $p(1-3) < 0,05$ $p(2-3) < 0,01$
5	Процент инфильтрата на крипту	28,0 ± 1,2	26,0 ± 3,4	34,0 ± 2,4	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) < 0,01$ $p(2-3) < 0,01$
6	Число митозов на крипту	0,05 ± 0,09	0,47 ± 0,01	2,0 ± 0,35	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) < 0,05$ $p(2-3) < 0,05$
7	Процент лимфоцитов в инфильтрате	39,0 ± 3,3	42,0 ± 4,2	30,0 ± 4,1	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) > 0,05$ $p(2-3) < 0,05$
8	Процент нейтрофилов в инфильтрате	4,0 ± 0,9	5,5 ± 3,8	15,0 ± 1,9	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) < 0,05$ $p(2-3) < 0,05$

по В.М. Бондаренко, Н.М. Грачевой, Т.В. Мацулевич (2003) соответствует дисбиотическому состоянию I–II степени [3].

Концентрация эндотоксина в сыворотке крови у мышей после спленэктомии по сравнению с контролем увеличивалась в 1,5 раза к 30-м суткам и резко снижалась в 4,5 раза к 60-м суткам (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отдаленные сроки после спленэктомии в ободочной кишке у мышей линии Balb/c развивается диффузный воспалительный процесс, морфологическая картина которого соответствует хроническому катаральному колиту по А.М. Ногаллеру, К.Ю. Юлдашеву, А.Г. Малыгину (1989) [7]. Наибольшей степени выраженности патологический процесс достигает к 60-м суткам после операции, о чем свидетельствуют как данные морфометрического исследования, так и развитие стойкого дисбиотического состояния. Развитие колита в отдаленные сроки после спленэктомии, вероятнее всего, обусловлено сформировавшимся вторичным декомпенсированным иммунодефицитом, одним из проявлений которого, по нашим данным, являются хроническая интерстициальная пневмония и

микроабсцессы в печени. Эти результаты исследования совпадают с результатами других авторов, согласно которым изменение иммунореактивности и вторичное иммунодефицитное состояние являются фоном для развития хронического колита [6–9]. В нашем исследовании хронический колит сопровождался типичным дисбиотическим сдвигом, что согласуется с данными Н.А. Орловой [8] о том, что дисбиоз всегда сопутствует разным формам воспалительных заболеваний кишечника. Увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови на 30-е сутки отражает нарушение барьерной функции толстой кишки. Уменьшение же уровня эндотоксина к 60-м суткам после спленэктомии может быть обусловлено компенсаторно-приспособительными реакциями со стороны печени, благодаря чему ее детоксицирующая функция усиливается в ответ на длительное повышение уровня эндотоксина в крови. Таким образом, полученные в работе результаты согласуются с данными других исследований, согласно которым вторичное иммунодефицитное состояние может приводить к развитию хронического катарального колита с типичной картиной дисбиоза.

Таблица 2

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОСВЕТНОЙ МИКРОФЛОРЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ МЫШЕЙ ЛИНИИ Balb/C В КОНТРОЛЕ И ПОСЛЕ СПЛЕНЭКТОМИИ (КОЕ/Г, В ДЕСЯТИЧНЫХ ЛОГАРИФМАХ)							
Группа наблюдений		Энтеробактерии		Энтерококки		Лакто-бактерии	LA-агар
		<i>Lac</i> ⁺	<i>Lac</i> ⁻	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>		
Контроль	1	5,9 ± 0,4	4,7 ± 0,7	5,0 ± 0,0	8,5 ± 0,4	7,8 ± 0,7	8,8 ± 0,4
30-е сутки после спленэктомии	2	5,1 ± 0,9	5,2 ± 0,7	5,3 ± 0,6	7,0 ± 0,5	7,2 ± 0,8	7,7 ± 0,6
60-е сутки после спленэктомии	3	4,0 ± 0,0	5,1 ± 1,0	5,1 ± 1,0	7,2 ± 0,4	6,6 ± 1,5	7,8 ± 0,8
Достоверность различий		$p(1-2) < 0,001$ $p(1-3) < 0,01$ $p(2-3) < 0,001$	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) > 0,05$ $p(2-3) > 0,05$	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) > 0,05$ $p(2-3) > 0,05$	$p(1-2) < 0,001$ $p(1-3) < 0,001$ $p(2-3) > 0,05$	$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) < 0,05$ $p(2-3) > 0,05$	$p(1-2) < 0,001$ $p(1-3) < 0,001$ $p(2-3) > 0,05$

Таблица 3

УРОВЕНЬ ЭНДОТОКСИНА (EU/ML) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У МЫШЕЙ Balb/C В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ СПЛЕНЭКТОМИИ		
Группа	№	Уровень эндотоксина
Контрольная	1	14,2 ± 5,5
Опытные, суток после спленэктомии	30-е сутки после спленэктомии	22,6 ± 1,9
	60-е сутки после спленэктомии	3,0 ± 0,014
Достоверность различия		$p(1-2) > 0,05$ $p(1-3) < 0,01$ $p(2-3) < 0,01$

ВЫВОДЫ

1. В отдаленные сроки после спленэктомии у мышей Balb/c, по данным морфологического исследования, развивается хронический катаральный колит, характеризующийся очаговой дистрофией колоноцитов, уменьшением числа и объемной доли

бокаловидных клеток, очаговой воспалительной инфильтрацией стромы, представленной лимфоцитами и нейтрофилами.

2. Хронический колит, развивающийся в отдаленные сроки после спленэктомии, сопровождается развитием дисбиоза I–II степени и повышением уровня эндотоксина в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барта И. Селезенка. — Будапешт: Изд-во Академии наук Венгрии, 1976. — 263 с.
2. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов // Журн. микробиол.— 2004.— № 3. — С. 98–105.
3. Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериозы кишечника у взрослых.— М.: КМК Scientific Press, 2003. — 224 с.
4. Комаров Ф.И., Осадчук А.М., Осадчук М.А., Кветной И.М. Неспецифический язвенный колит. — М.: Мед. информ. агентство, 2008. — 256 с.
5. Масляков В.В. Травма селезенки: особенности внутрисосудистого компонента микроциркуляции в зависимости от выполненной операции: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — М., 2007. — 43 с.
6. Михайлова Н.Р. Микробный биоценоз кишечника у больных ВИЧ-инфекцией и способ его коррекции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2009. — 22 с.
7. Ногаллер А.М., Юлдашев К.Ю., Малыгин А.Г. Хронические колиты и дискинезии толстой кишки. — Ташкент: Медицина, 1989. — 212 с.
8. Орлова Н.А. Дисбиоз кишечника и возможные пути его коррекции у больных воспалительными заболеваниями кишечника с сочетанной патологией и/или внекишечными проявлениями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2010. — 23 с.
9. Фарелл Р., Пенперкорн М. Язвенный колит // Межд. мед. журн. — 2003. — № 1. — С. 43–47.
10. Шапкин Ю.Г., Масляков В.В. Роль селезенки в иммунном статусе организма // Детская хирургия. — 2007. — № 5. — С. 40–42.
11. Coignard-Biehler H., Lanternier F., de Montalembert M. et al. Infections in splenectomized patient // Rev. Prat. — 2008. — Vol. 58, № 20. — P. 2209–2214.
12. Tominaga G.T., Simon F.J. Jr., Dandan I.S. et al. Immunologic function after splenic embolization, is there a difference? // J. Trauma. — 2009. — Vol. 67, № 2. — P. 289–295.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОЛСТОЙ КИШКИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ VALB/C В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ СПЛЕНЭКТОМИИ

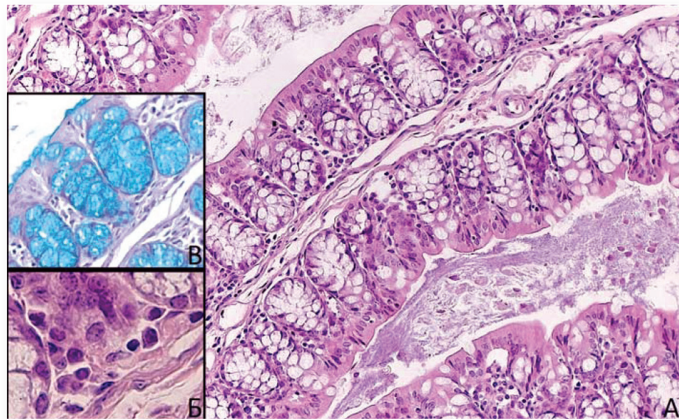


Рис. 1. Морфологическая картина ободочной кишки мыши Valb/c контрольной группы. Эпителиальный слой сохранен, в строме собственной пластинки слизистой оболочки — диффузно рассеянные лимфоциты и единичные нейтрофилы. А — окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$; Б — инфильтрат стромы, окраска гематоксилином-эозином, $\times 630$; В — окраска альциановым синим, $\times 200$

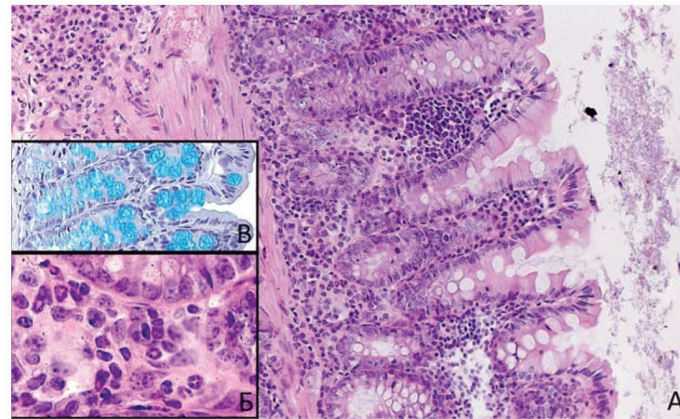


Рис. 2. Картина хронического катарального колита в ободочной кишке мыши Valb/c на 60-е сутки после спленэктомии. Слизистая оболочка утолщена, просветы крипт очагово расширены. Дистрофические изменения колоноцитов, умеренная диффузная инфильтрация стромы слизистой оболочки лимфоцитами и нейтрофилами. А — окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$; Б — инфильтрат стромы, окраска гематоксилином-эозином, $\times 630$; В — окраска альциановым синим, $\times 200$