

DOI: 10.29296/25877305-2018-05-19

РЕАКТИВНОСТЬ МАКРОФАГАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ СПАЙКООБРАЗОВАНИИ

С. Скальский, кандидат медицинских наук,
Т. Соколова, доктор медицинских наук
Омский государственный медицинский университет
Минздрава России
E-mail: sergscalskiy@mail.ru

Представлены сведения о гиперреактивности макрофагальной системы при спайкообразовании, в значительной мере определяющей уровень поствоспалительного фиброгенного ответа.

Ключевые слова: хирургия, спайкообразование, макрофаги, цитокины, фибробласты.

Для цитирования: Скальский С., Соколова Т. Реактивность макрофагальной системы при спайкообразовании // Врач. – 2018; 29 (5): 81–83. DOI: 10.29296/25877305-2018-05-19

Вопросы патогенеза и лечения спаечной болезни весьма актуальны. Острота проблемы обусловлена широчайшей распространенностью этих состояний, их тяжелым прогрессивным течением, неэффективностью существующих средств терапии [1]. Спайкообразование – самое частое осложнение хирургического вмешательства на органах брюшной полости: спайки образуются у 50–100% больных после общехирургических абдоминальных операций и у 70–97% пациенток после гинекологических оперативных вмешательств [2]. Одним из звеньев спайкообразования является цитодинамическое расстройство макрофагальной реакции организма в сочетании с нарушением синтеза коллагена фибробластами.

Механизм макрофагально-фибробластического взаимодействия заключается в том, что продукты распада коллагена и клеток (при повреждении, воспалении) активируют фагоцитирующие их макрофаги, которые продуцируют факторы роста фибробластов, усиливая их пролиферацию и синтез коллагена [3–5]. В перитонеальной жидкости содержится большое количество макрофагов, которые в состоянии активации секретируют большой спектр цитокинов и факторов роста [6]. Острая воспалительная реакция инициируется вследствие активации ключевых провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли- α (ФНО α) и интерлейкина (ИЛ)-1 (ИЛ1), обладающих широким спектром биологических свойств и вызывающих цепь клеточных взаимодействий, приводящих к формированию воспалительного клеточного инфильтрата [4, 7].

Изменение функциональной активности макрофагов при патологической регенерации может явиться важным фактором, приводящим к избыточному росту соединительной ткани при спайкообразовании. Оно позволяет не только прогнозировать наличие и развитие спаечного процесса после хирургических вмешательств, но и является базовым для разработки патогенетически обоснованной профилактики и терапии.

Изучены функциональная активность и реактивные свойства макрофагальной системы при перитонеальном спайкообразовании и ее роль в формировании фиброза.

Исследования выполнены на 52 беспородных белых крысах с массой тела 210–230 г и в первичной культуре перитонеальных макрофагов и фибробластов крыс. Эксперименты проводили с соблюдением принципов, изложенных в Европейской конвенции по защите прав позвоночных животных (Страсбург, 1986), согласно Приказу Минздрава СССР от 12.08.77 №775 и Федеральному закону РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.99. В качестве экспериментальной модели спаечного процесса было выбрано введение в брюшную полость аутокрови из расчета 1% массы тела (патент РФ №2260854). Крысы с гемоперитонеумом составили основную группу (n=40). В группу сравнения вошли 12 крыс, которым аналогичным способом вводили 0,9% раствор NaCl. На 10-е сутки после моделирования гемоперитонеума или введения 0,9% раствора NaCl проводили эвтаназию под диэтиловым эфиром (ОАО «Медхимпром») путем декапитации с последующим немедленным забором материала для культуральных исследований. Для этого брюшную полость через прокол в каудальной трети белой линии живота промывали 10 мл среды RPMI-1640 с 10% раствором гепарина и антибиотиками. Затем проводили ревизию брюшной полости с оценкой спаечного процесса и его распространенности, локализации спаек, их формы. Для выполнения культуральных исследований образцы перитонеальных смывов центрифугировали при 800–1000 об/мин 10 мин, клетки трижды отмывали и культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина. Суспензию перитонеальных клеток помещали в чашки Петри диаметром 40 мм с покровными стеклами, обработанными поли-D-лизинном.

Концентрация посадки клеток в культурах составляла $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл взвеси, количество живых клеток – 89–95%. Клетки инкубировали 24 ч при 37°C и в атмосфере 5% CO₂. В перитонеальной жидкости крыс и супернатантах клеточных культур определяли содержание ФНО α , ИЛ β (ИЛ1) и оксипролина. Содержание цитокинов ФНО α , ИЛ β оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы «Иммунотех» (Франция) на планшетном фотометре Multiscan (Финляндия), содержание оксипролина – по методике [8], степень стимуляции

коллагеногенеза – по количеству белковосвязанного оксипролина, определяемого по разности содержания свободного и суммарного оксипролина. Покровные стекла окрашивали по Романовскому–Гимзе, подвергали цитологическому анализу с оценкой пролиферативной активности моноцитов и макрофагов. Микроскопию препаратов производили с помощью светового микроскопа Carl Zeiss (Германия) при иммерсионном увеличении $\times 1000$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 100$). Для статистической обработки результатов пользовались пакетом Statistica 6.0 for Windows, биостатистика (StatSoft, Inc., США) и MS Excel в среде Windows XP. Характер распределения полученных данных анализировали построением гистограмм с последующей проверкой на нормальность по критерию Шапиро–Уилка. Значения количественных признаков приведены в тексте в виде $M \pm m$, где M – среднее выборочное, m – стандартная ошибка среднего. Для сравнения данных 2 групп использовали t -тест (Стьюдента). Корреляционный анализ проводили по Спирмену. Критический уровень значимости при проверке нулевых гипотез был принят на уровне $p < 0,05$.

Как показали исследования, активированные перитонеальные моноциты, полученные из перитонеальной жидкости крыс на 10-е сутки гемоперитонеума, демонстрировали высокую способность к трансформации в макрофаги (см. таблицу). Показатели макрофагальной трансформации моноцитов в группе сравнения в 2,5 раза превышали аналогичные в контроле. Повышение пролиферативного ответа в системе мононуклеарных фагоцитов при гемоперитонеуме сочеталось с образованием в брюшной полости экспериментальных животных соединительнотканых спаек (см. таблицу). Выявлено наличие прямой корреляционной связи ($r=0,8$; $p < 0,01$) между показателем макрофагальной трансформации моноцитов и числом образовавшихся спаек.

Сравнительный анализ содержания цитокинов в перитонеальном экссудате на 10-е сутки после моделирования гемоперитонеума и у контрольных животных

выявил статистически значимое увеличение содержания ФНО α и ИЛ1 у крыс основной группы. Наиболее выраженные отклонения от нормы регистрировались при определении уровня ФНО α . У крыс, перенесших гемоперитонеум, количество ФНО α превышало контрольные значения в 25 раз. Синтез ИЛ1 достигал 3-кратного увеличения. Связь изменения содержания цитокинов с выраженностью спайкообразования у животных основной группы подтверждена результатами корреляционного анализа. Прямая зависимость обнаружена между содержанием ФНО α и числом спаек, ИЛ1 и числом спаек с коэффициентами корреляции соответственно 0,55 ($p < 0,05$) и 0,87 ($p < 0,01$). Исследование свидетельствует о чрезмерной продукции перитонеальными мононуклеарами провоспалительных цитокинов на этапах пролиферации и завершения воспалительного процесса в брюшной полости крыс и участии данных патофизиологических механизмов в избыточном спайкообразовании.

Исследования с использованием культур клеток показали, что через 24 ч экспозиции перитонеальных макрофагов и фибробластов в питательной среде монослой клеток был целостным и равномерным. Макрофаги выглядели как распластанные удлинённые клетки с большим количеством отростков, моноциты сохраняли обычную форму и размеры. Фибробласты в культуре образовали систему из параллельно расположенных клеток веретенообразной формы. Преобладали активированные фибробласты, имеющие большую величину и отростки; неактивные фибробласты меньших размеров встречались реже.

Сравнительный анализ уровней провоспалительных цитокинов в культуральной жидкости активированных (основная группа) и неактивированных (группа контроля) макрофагов выявил увеличение содержания цитокинов в культурах активированных клеток. Наиболее выраженные отклонения регистрировались при определении уровня ФНО α , который превышал контрольные значения в 19 раз (см. таблицу). Это согласуется с имеющимися представлениями о биологическом действии данного цитокина [4, 7]. Известно, что ФНО α участвует не только в защитных реакциях, но и в процессах деструкции и репарации, сопутствующих воспалению. Активация фиброгенеза, выраженная на этапах завершения воспаления в стадии пролиферации и репарации, также связана со способностью ФНО α индуцировать пролиферацию фибробластов и депозицию коллагена и является ключевым фактором в развитии спайчной болезни [5].

Наряду с резким усилением выработки ФНО α у крыс основной группы наблюдалось изменение уровня

Характеристики спайкообразования, перитонеальных макрофагов и фибробластов крыс с гемоперитонеумом ($M \pm m$)			
Материал	Показатель	Число спаек	
		основная группа	контроль
Брюшная полость (перитонеальная жидкость)	Макрофагальная трансформация моноцитов	8,2 \pm 1,8*	0
		60,5 \pm 3,1*	24,1 \pm 5,2
	ФНО α , пг/мл	251,1 \pm 7,3*	10,3 \pm 0,4
	ИЛ1, пг/мл	12,7 \pm 0,8*	3,7 \pm 0,3
Культура клеток	ФНО α , пг/мл	321,3 \pm 21,1*	17,1 \pm 1,8
	ИЛ1, пг/мл	54,4 \pm 4,2*	14,9 \pm 2,1
	Оксипролин, мкмоль/л	26,7 \pm 1,7*	6,5 \pm 0,4

Примечание. * – достоверность различий между группами при $p < 0,05$.

ИЛ1, который достигал 3,6-кратного увеличения по сравнению с таковым в контроле (см. таблицу). Известно, что на этапе завершения процесса воспаления выработка ИЛ1 макрофагами угнетается, однако при избыточном образовании рубцовой ткани она продолжается. ИЛ1 индуцирует пролиферацию фибробластов и такие изменения их функционирования, которые способствуют развитию фиброза [7]. Формирование рубцов, связанное с повышенным образованием грануляционной ткани, под влиянием ИЛ1 усиливается [9]. В нашем исследовании связь изменений содержания цитокинов с выраженностью спайкообразования у экспериментальных животных подтверждена результатами корреляционного анализа.

Активированные макрофаги в процессе кооперативных клеточных взаимодействий через систему цитокинов оказывают значимое для течения и исхода продуктивного воспаления влияние на коллагенсинтетическую функцию фибробластов. Установлено повышение уровня синтеза оксипролина активированными фибробластами основной группы в 4,2 раза по отношению к группе сравнения (см. таблицу). Отмечена прямая корреляционная связь между количеством белковосвязанного оксипролина и числом спаек в брюшной полости крыс с гемоперитонеумом ($r=0,78$; $p<0,05$).

Таким образом, в процессе развития индуцированного воспалением спайкообразования происходит закономерная перестройка системы мононуклеарных фагоцитов с формированием чрезмерной функциональной активности перитонеальных макрофагов: усилением их трансформации из моноцитов и синтеза провоспалительных цитокинов как в перитонеальной полости животных, так и в первичной культуре клеток, что сопровождается активацией фибробластов и повышением их коллагенсинтетической функции.

Активация макрофагов реализуется 2,5-кратным увеличением макрофагальной трансформации моноцитов и синтезом ими провоспалительных цитокинов: повышением уровня ФНО α — 25-кратным в перитонеальной жидкости, 19-кратным — в культуре клеток и

3,0—3,6-кратным увеличением количества ИЛ1. Усиление функциональной активности фибробластов проявляется 4,2-кратным ростом коллагенсинтетической функции, приводящей к избыточному росту соединительной ткани и спайкообразованию.

* * *

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Randall D., Fenner, J., Gillott, R. et al. Novel Diagnostic Aid for Detection of Intra-Abdominal Adhesions to the Anterior Abdominal Wall Using Dynamic Magnetic Resonance Imaging // *Gastroenterol. Res. Pract.* — 2016; 2016: 2523768.
2. Дронов А.И., Задорожная К.О., Дронова В.Л. и др. Патогенез, осложнения и контроль перитонеального спаечного процесса в гинекологии и хирургии // *Хирургия. Восточная Европа.* — 2015; 2 (14): 124–9.
3. Брюхин Г.В., Зубарев И.В. Влияние супрэнатанта фибробластов потомства самок крыс с хроническим поражением печени различного генеза на морфофункциональное состояние перитонеальных макрофагов в условиях культивирования // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 2012; 154 (10): 511–3.
4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины / СПб: Фолиант, 2008; 549 с.
5. Филенко Б.П., Земляной В.П., Борсак И.И. и др. Спаечная болезнь: профилактика и лечение / СПб, 2013; 171 с.
6. Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А. и др. Варианты развития острого системного воспаления // *Цитокины и воспаление.* — 2008; 7 (2): 9–17.
7. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника / СПб, Фолиант, 2011; 480 с.
8. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови // *Лабораторное дело.* — 1990; 5: 283–5.
9. Пигарева Н.В. Королькова Т.Н., Симбирцев А.С. и др. Уровень цитокинов у пациентов с рубцами после акне // *Эксперим. и клин. дерматокосметология.* — 2011; 3: 3–6.

REACTIVITY OF THE MACROPHAGE SYSTEM IN ADHESION FORMATION

S. Skalsky, Candidate of Medical Sciences; **T. Sokolova**, MD

Omsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk

The paper gives information on the macrophage system hyperreactivity in adhesion formation, which largely determines the level of a post-inflammatory fibrogenic response.

Key words: surgery, adhesion formation, macrophages, cytokines, fibroblasts.

For citation: Skalsky S., Sokolova T. Reactivity of the macrophage system in adhesion formation // *Vrach.* — 2018; 29 (5): 81–83. DOI: 10.29296/25877305-2018-05-19