

Є.Д. ХВОРОСТОВ, І.В. СОРОКІНА, Л.М. ДУШИК, В.П.МАЗНЯК

*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, медичний факультет, кафедра хірургічних хвороб, Харків; Харківський національний медичний університет, лікувальний факультет, кафедра патоморфології, Харків*

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ МІСЦЕВИХ ЗМІН ПРИ РІЗНИХ МЕТОДАХ РЕЗЕКЦІЇ СЕЛЕЗИНКИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

У клініці хірургічних хвороб Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна на базі хірургічного відділення Дорожньої клінічної лікарні станції Харків Південної залізниці були вивчені в експерименті можливості і особливості дії на тканині наступних установок: електрохірургічний апарат і ультразвукова хірургічна установка. Робота проведена на 168 тваринах – лабораторних статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-250. У гострих і хронічних дослідах, з метою всебічного вивчення процесів, що відбуваються в зоні дисекції досліджені про- і протизапальні інтерлейкіни. Активність імунних реакцій залежить від тяжкості пошкодження, виявлено, що ультразвуковий вплив є більш ощадним. При електродисекції є триваліше збереження серед клітин запального інфільтрату клітин-продуцентів прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ФНО) на тлі деякого гальмування продукції протизапального цитокіна (ІЛ-10). При ультразвуковій дисекції у міру розвитку регенераційного процесу посилюється активність протизапальної цитокінової системи (ІЛ-10) і пригнічується прозапальна цитокінова активність (ІЛ-1, ІЛ-6, ФНО).

**Ключові слова:** електродисекція, резекція селезінки, ультразвукова дисекція, цитокіни

**Вступ.** Багато уваги в літературі приділяється віддаленим імунологічним наслідкам спленектомії, виконаної з приводу гематологічних захворювань. Не дивлячись на високу ефективність спленектомії у пацієнтів із захворюваннями системи крові, не можна не враховувати незамінну роль селезінки в імунологічній реактивності. Лімфоїдна тканина селезінки поєднує в собі макрофагальні, тимусзалежні і тимуснезалежні елементи, беручи участь переважно в реакціях гуморального типу і забезпечуючи накопичення великої кількості плазматичних клітин, що синтезують антитіла. У селезінці синтезується біоактивний тетрапептид – тафтсин, стимулюючий природні кілери, фагоцитоз, бактерицидні і антипухлинні властивості макрофагів, тому після спленектомії розвивається набутий дефіцит тафтсина [1].

Видалення селезінки приводить до змін в імунній системі людини. У дорослих знижується фагоцитоз, зменшується число Т-лімфоцитів, декілька підвищується вміст в периферійній крові В-лімфоцитів. Змінюються показники імуноглобулінів сироватки крові: за даними одних авторів, ІgА, ІgG і ІgM підвищуються, за даними інших – ІgА і ІgG знижуються [2, 3].

У віддаленому періоді після спленектомії повної нормалізації, в основному не настає. Спостерігається дефіцит Т-лімфоцитів, знижується фагоцитоз, вміст ІgG і ІgM, змінюється число В-лімфоцитів, часто виявляється дефіцит макрофагів. Інші дослідники повідомляють про нормалізацію імунологічного статусу хворих у віддаленому періоді після спленектомії [4, 5].

Нами не знайдено робіт з імунологічного аналізу місцевих змін, зокрема, при різних методах резекції селезінки і спленектомії.

**Мета дослідження.** порівняльне експериментально- імуногістохімічне дослідження змін, що відбуваються в паренхімі селезінки на етапі її мобілізації після застосування електрокоагуляції і ультразвуку.

**Матеріали та методи.** У клініці хірургічних хвороб Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна на базі хірургічного відділення Дорожньої клінічної лікарні ст. Харків Південної залізниці вивчені в експерименті можливості і особливості дії на біологічній тканині наступних установок: електрохірургічний апарат ЕХВА-350М/120Б "Надія-2", Україна; ультразвукова хірургічна установка "Harmonic scalpel Ultracision", Ethicon Endo Surgery, США.

Робота проведена на 168 тваринах – лабораторних статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-250. У «гострих» дослідах (проведений на 28 тваринах: біполярна електрокоагуляція селезінки (БЕС) – 14 і ультразвуковий скальпель (УЗС) – 14), а також у «хронічних» дослідах (70 тварин в кожній групі) вивчені особливості електрохірургічної і ультразвукової дії на паренхіму селезінки. Вивчення змін, що відбуваються в зоні дії різних фізичних способів дисекції і коагуляції, проводилося методом макроскопічної оцінки, морфологічним і імуногістохімічним дослідженням. Через 3, 7, 14, 21 і 28 діб тварини виводилися з експерименту. Частина селезінки, що залишилася, або її ніжка видалялися для вивчення імунологічних процесів в зоні операції. Всі маніпуляції на тваринах здійснювали відповідно до міжнародних вимог до проведення експериментів на тваринах, затверджених I Національним конгресом з біоетики (20.09.2004, Київ, Україна) та узгоджених з положеннями "Європейської конвенції по захисту хре-

бетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей” (Страсбург, 1985).

Тварини, яким виконувалася резекція селезінки (РС), розділені на дві групи. У І групу включені тварини, яким дія виконувалася БЕС, в ІІ групу – тварини, у яких виконувалася УЗС. Також тварини, яким виконувалася спленектомія (СЕ), були розділені на дві групи, за тим же принципом. У І групу включені тварини, яким спленектомія виконувалася монополярним електроскальпелем (МЕС), у ІІ групі тварин для спленектомії використовувався УЗС.

У гострих і хронічних дослідках, з метою всебічного вивчення процесів, що відбуваються в зоні дисекції, були досліджені про- і протизапальні інтерлейкіни. Таке комплексне вивчення даних показників з морфологічними змінами дозволяє вирішити поставлені завдання дослідження.

Імуногістохімічне дослідження проводили на парафінових зрізах, товщиною 5-6 мкм прямим методом Кунса за методикою Brosman (1979). Імунні клітини диференціювали за допомогою шурячих моноклональних антитіл (МКА) фірми Serotec. Використовували МКА до ІЛ-1 $\alpha$ , ФНО, ІЛ-6 і ІЛ-10. Препарати вивчали в люмінесцентному мікроскопі “Axioskop 40” і програмного забезпечення Biostat.exe. За допомогою окулярних сіток визначали кількість клітин-продуцентів інтерлейкінів у полі зору  $\times 400$ , потім підраховували відносну кількість цих клітин. Цифрові дані опрацьовані методами варіаційної статистики.

#### **Результати досліджень та їх обговорення.**

При мікроскопічному дослідженні тканини селезінки, узяті з її поверхні після електрохірургічного впливу в гострому періоді експерименту, виявлені пошкодження, які включали: зону опікового коагуляційного некрозу, прилеглу до неї зону деструктивних змін, які візуалізувалися як некротичні і некробіотичні, а також зону виражених гострих судинних порушень і реактивного запалення. Серед цих клітин виявлялися клітини-продуценти інтерлейкінів, відносна кількість цих клітин виявилася невеликою.

На 3 добу у складі запального інфільтрату переважали як живі, так і зруйновані нейтрофільні гранулоцити. Серед клітин запального інфільтрату виявляється збільшення популяції клітин-продуцентів як прозапальних, так і протизапальних інтерлейкінів, в порівнянні з гострим періодом.

На 7 добу в запальному інфільтраті визначали нейтрофільні гранулоцити, в невеликій кількості макрофаги, що беруть участь в резорбції некротичного детриту, а також лімфоцити. Серед нейтрофільних гранулоцитів траплялися нечисленні клітини, що «розпадаються». В порівнянні з попереднім терміном експерименту в цьому періоді спостерігається максимальна кількість клітин-

продуцентів прозапальних цитокінів, насамперед ІЛ-1, потім ІЛ-6 і ФНО. Також наростає кількість клітин-продуцентів протизапального ІЛ-10.

На 14 добу зона реактивного запалення зменшується в порівнянні з попереднім терміном, вона переривиста, характеризується скупченнями нейтрофільних гранулоцитів, макрофагів і лімфоцитів. На тлі звуження зони реактивного запалення відмічається зменшення популяції клітин-продуцентів прозапальних цитокінів і збільшення кількості клітин-продуцентів протизапального ІЛ-10, що продовжується. Звертає на себе увагу істотне зниження кількості клітин, що експресують рецептори до ІЛ-1 і ІЛ-6 і менш виражене стосовно клітин-продуцентів ФНО.

На 21 і 28 добу зона реактивного запалення характеризувалася осередковими дрібними скупченнями макрофагів, лімфоцитів і нечисленних нейтрофільних гранулоцитів. При цьому серед клітин запального інфільтрату продовжує знижуватися кількість клітин-продуцентів прозапальних цитокінів і наростає кількість клітин-продуцентів протизапального цитокіна – ІЛ-10. Проте відносна кількість клітин-продуцентів прозапальних цитокінів залишається високою. Дані представлені в таблиці 1.

При використанні УЗС у гострому періоді на відміну від попередньої групи ні в одному із спостережень ми не виявили запальні зміни у відповідь на пошкодження. Однак в прилеглій до зони розтину тканині селезінки імуногістохімічним методом виявлялися клітини-продуценти цитокінів, як прозапальних, так і протизапальних. При цьому кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 і ІЛ-6 відповідає показникам попередньої групи. Тоді як вірогідно зменшена кількість клітин-продуцентів ФНО і дещо понижена кількість клітин-продуцентів ІЛ-10.

Мабуть це клітини крові, що поступили в зону пошкодження. Відомо, що активність імунних реакцій залежить від тяжкості пошкодження. Вже на етапі гострого періоду в цій групі є ознаки менш вираженої імунної реакції.

На 3 добу серед клітин запального інфільтрату збільшується кількість клітин-продуцентів як прозапальних, так і протизапального цитокіна. В порівнянні з подібною добою попередньої групи кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 і ІЛ-6 вірогідно нижча, кількість клітин-продуцентів ФНО практично подібний до такого показника в попередньої групи, а кількість клітин-продуцентів ІЛ-10 достовірно збільшена. Таким чином вже з 3 доби спостерігається як розвиток запальної реакції, так і початок становлення репаративного процесу.

На 7 добу експерименту в запальному інфільтраті у великій кількості виявлялися функціонально активні макрофаги, що резорбують некротичний детрит. Серед клітин запального інфільтрату продовжує наростати кількість клітин-продуцентів прозапальних цитокінів і протизапального цитокі-

на. В порівнянні з попередньою групою кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 вірогідно понижена, ІЛ-6 має тенденцію до зниження, а ФНО – відповідає показнику попередньої групи. Кількість клітин-продуцентів ІЛ-10 достовірно збільшено.

На 14 добу серед клітин запальної інфільтрації знижується в порівнянні з 7-ою добою кількість клітин-продуцентів прозапальних цитокинів і продовжує наростати кількість клітин-продуцентів ІЛ-10. В порівнянні з 14 добою попередньої групи

інтенсивність прозапальної цитокинової реакції знижена, а протизапальною підвищена.

Як на 21 добу, так і на 28 добу кількість клітин-продуцентів прозапальних цитокинів продовжувала знижуватися, а протизапальних наростати, що свідчить про активацію репаративних процесів.

Показник кількості клітин-продуцентів ІЛ-10 на 28 добу, в порівнянні з попередньою групою є підвищеним, що указує на більш виражену інтенсивність репаративних процесів.

Таблиця 1

Відносна кількість основних клонів імунних клітин в запальному інфільтраті зони регенерації селезінки при електро- і ультразвуковій дисекції x 400 (у перерахунку на 100 клітин).

Групи спостереження	Доба	Цитокини			
		ІЛ-1	ІЛ-6	ФНО	ІЛ-10
електро дисекція	гострий період	15,9±0,69	13.7 ±0.6333	17.1 ±1.059	8.8 ±0.4163
	3	28.5 ±0.7782	26.2 ±0.611	27.3 ±1.542	13.2 ±0.8
	7	39.1 ±0.9598	37.9 ±0.8876	35.2 ±1.272	15.8 ±0.8
	14	36.8±1.272	31.6 ±1.137	34.7 ±1.342	19.6 ±1.746
	21	31.5±1.455	29.8 ±1.459	32±1.382	23±1
	28	27.9±1.735	28.6 ±2.012	25.4 ±1.24	21 ±1.106
ультразвукова дисекція	гострий період	15.4 ±0.9452	14.6 ±0.7333	14.5 ±0.8466	7.8 ±0.5333
	3	26.6 ±1.024	21.3 ±0.8951	27.8 ±0.9866	16.3 ±0.7608
	7	36.4 ±1.343	36.8 ±1.093	35.1 ±1.12	21.9 ±0.9826
	14	30.7±1.116	27.9 ±1.269	30.3 ±0.8439	24.4 ±0.718
	21	27.7±1.383	25.2±0.8	26.1 ±0.809	26.9 ±0.6741
	28	25 ±0.9661	22.8 ±0.9638	23.9 ±0.8492	30.8 ±1.181

**Висновки.** 1. Відомо, що активність імунних реакцій залежить від тяжкості пошкодження. Вже на етапі гострого періоду в групі ультразвукової дисекції є незначно виражені ознаки імунної реакції, у вигляді достовірного зменшується кількість клітин-продуцентів ФНО і тенденції до зниження ІЛ-10.

У подальшому процесі репарації особливістю місцевих імунних реакцій в зоні регенерації при електро дисекції є триваліше збереження серед клітин запального інфільтрату клітин-продуцентів прозапальних цитокинів (ІЛ-1, ІЛ-6, ФНО) на тлі деякого гальмування продукції протизапального цитокіна (ІЛ-10).

При ультразвуковій дисекції вже з 3-ої доби експерименту у складі запального інфільтрату наростає як прозапальна, так і протизапальна активність, а з 7 доби у міру розвитку регенераційного процесу посилюється активність протизапальної цитокинової системи (ІЛ-10) і пригнічується прозапальна цитокинова активність (ІЛ-1, ІЛ-6, ФНО).

Перспективи подальших досліджень: Зростання потреб в резекції селезінки і нездатність вирішення проблеми за допомогою відомих методів дає поштовх до пошуку нових способів її дисекції.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аксёнов И. В. Ультразвуковой скальпель в абдоминальной хирургии / Аксёнов И.В. // Хирургия. — 2007. — № 6. — С. 570—579.
2. Опыт применения УЗС в эндовидеохирургии / А. Е. Борисов, С. Е. Митин, М. В. Егоренков [и др.] // Эндоскопическая хирургия. — 2005. — № 1. — С. 22—23.
3. Сравнительная оценка местных гемостатических средств в гепатобилиарной хирургии / В. А. Горский, А. П. Фаллер, А. В. Воленко [и др.] // Хирургия Украины. — 2006. — №2. — С. 37—39.
4. Bandi G. Comparison of blade temperature dynamics after activation of Harmonic Ace scalpel and the Ultracision Harmonic Scalpel LCS-K5 / G. Bandi, C.C. Wen, E.A. Wilkinson // J. Endourol. — 2008. — Vol. 22, №. 2. — P. 333—336.
5. Comparison of safety and efficacy of ultrasonic and bipolar thermal energy: an experimental study / T. Diamantis, S. Gialikaris, M. Kontos [et al.] // Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech. — 2008. — Vol. 18, №. 4. — P. 384—390.

E.D. KHVOROSTOV, I.V. SOROKINA, L.N. DUSHÍK, V.P.MAZNYAK

*Kharkiv National University Named After V.N. Karazin, Kharkiv*

*Kharkiv National Medical University, Kharkiv*

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF LOCAL CHANGES WITH DIFFERENT METHODS OF RESECTION OF THE SPLEEN IN AN EXPERIMENT

In the clinic of surgical diseases of Kharkiv National University by V.N. Karazin based on surgical department Railway Clinical Hospital st. Kharkiv Southern Railway were studied in the experiment features and impact on the tissue following devices: electrosurgical apparatus and ultrasonic surgical setting. Work carried out on 168 animals – adult laboratory rats, the male line WISTER weighing 200-250 g. In acute and chronic experiments, in order to fully study the processes occurring in the area of dissection were studied pro- and anti-inflammatory interleukins. Thus, the activity of immune reactions depends on the severity of damage revealed that ultrasonic treatment has a more gentle effect. When electro dissection is more long-term preservation of cells among the inflammatory infiltrate cells producing pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF) on the background of some inhibition of production of anti-inflammatory cytokine (IL-10). When ultrasonic dissection with the development of the regeneration process increases the activity of anti-inflammatory cytokine system (interleukin-10) and inhibited proinflammatory cytokine activity (IL-1, IL-6, TNF).

**Key words:** electric dissection, spleen resection, ultrasound dissection, cytokines

**Стаття надійшла до редакції: 15.06.2011 р.**