

УЛЬТРАСТРУКТУРА МЕЗЕНТЕРІАЛЬНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ТА СЕЛЕЗІНКИ У ЩУРІВ ПРИ ДОПЕЧІНКОВІЙ ФОРМІ ПОРТАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ

В роботі представлені результати електронномікроскопічного дослідження тканин селезінки і мезентеріальних лімфатичних вузлів у щурів через місяць після моделювання допечінкової форми портальної гіпертензії. Було встановлено розвиток дегенеративно-дистрофічних процесів у відповідь на інвазію кишкових бактерій з вогнищами периваскулярного запалення і разрастаннями колагену. Інтенсивно проходять процеси антигенної презентації дендритними клітинами з подальшою трансформацією В-лімфоцитів у плазматичні клітини. Відзначається накопичення великої кількості імунних комплексів в базальних мембранах судин гемомікроциркуляторного русла і в ендотеліоцитах, які беруть на себе функцію фагоцитозу у зв'язку з неповноцінністю інтердигітантних і берегових макрофагів. Таким чином,ДФПГ супроводжується значними морфологічними змінами в органах імунної системи у щурів, що вимагає подальшого вивчення в динаміці.

Ключові слова: селезінка, лімфатичні вузли, гіпертензія.

Синдром портальної гіпертензії – це група симптомів обумовлених підвищенням гідростатичного тиску у системі ворітної вени. У дітей частіше зустрічається допечінкова форма портальної гіпертензії (ДФПГ), як наслідок вад розвитку ворітної вени і її гілок, тромбозу ворітної вени, омфаліту, пупочного сепсису, катетеризації пупочної вени, ятрогенних інтраопераційних травм ворітної вени [1, 6, 7, 11]. Одним з ускладнень синдрому портальної гіпертензії є розвиток спленомегалії та гіперспленізму, з основним проявом – панцитопенією, та іншими імунологічними ускладненнями, що проявляються частими рецидивуючими вірусними та бактеріальними інфекціями у цієї групи пацієнтів [2, 3, 4, 8, 9].

Відсутність даних щодо морфо-функціональних змін в органах імунної системи, які залучені в патологічний процес при ДФПГ, зокрема мезентеріальних лімфатичних вузлах і селезінці та теоретичних основ попередження імунологічних ускладнень, що мають місце при ДФПГ, а також з метою визначення ключових ознак порушення компенсаторних та пристосувальних властивостей цих органів та з метою оптимізації шляхів їх відновлення нами було проведено експериментальне дослідження на лабораторних тваринах.

Метою роботи було дослідження ультраструктурних змін в мезентеріальних лімфатичних вузлах та селезінці при ДФПГ у щурів.

Матеріал та методи дослідження. Об'єктом дослідження стали селезінка та мезентеріальний лімфатичний вузол від 15 ювенільних білих щурів-самців, вагою 200-300 г, які були поділені на дві групи: 1 група (10 щурів) - тварини яким у віці 2 місяців хірургічно моделювали допечінкову форму портальної гіпертензії, за розробленою нами методикою (патент України на корисну модель № 69539 від 25.04.2012р.) [5], 2 група (5 щурів) – віварійний контроль. Фрагменти селезінки та лімфатичного вузла фіксували у 2,5% розчині глютарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією в 1% розчині чотирьох окису осмія за Міллонігом. Зневоднювали у спиртах 70%, 80%, 90%, 100% концентрації та ацетоні. Заливали в суміш епон – аралдит, згідно загальноприйнятій методиці. Напівтонкі та ультратонкі зрізи з отриманих блоків виготовляли на ультратомах LKB III (Швеція). Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім, толуїдиновим синім, основним фуксином за методом Науат. Ультратонкі зрізи контрастували 2% розчином ураніацетату та цитратом свинцю. Для електронномікроскопічного дослідження відбиралися ділянки білої пульпи селезінки та кіркової речовини мезентеріального лімфатичного вузла. Препарати досліджували під електронним мікроскопом ПЕМ –125К.

Результати дослідження та їх обговорення. Через місяць після моделювання ДФПГ макроскопічно відмічаються збільшені в розмірах мезентеріальні лімфатичні вузли, щільної консистенції, із збільшеною кількістю і розмірами лімфоїдних фолікулів кіркової речовини. При ультраструктурному дослідженні кіркової речовини в просвіті крайових синусів, куди впадають приносні лімфатичні судини виявляються бактерії із клітинною стінкою та без неї. В лімфоїдних фолікулах, що знаходяться в зоні крайових синусів розташовані збережені і зруйновані макрофаги, що містять бактерії на різних стадіях лізису, частина із них з множинними перфораціями клітинної стінки та цитоплазми, відмічаються також явища адгезії бактерій між собою. В зоні клітинного запалення лімфоїдного фолікулу внаслідок інвазії, відмічаються зруйновані клітини з розширенням перинуклеарного простору, випинанням оболонки ядра з гетерохроматином, розростання колагенових волокон (рис 1).

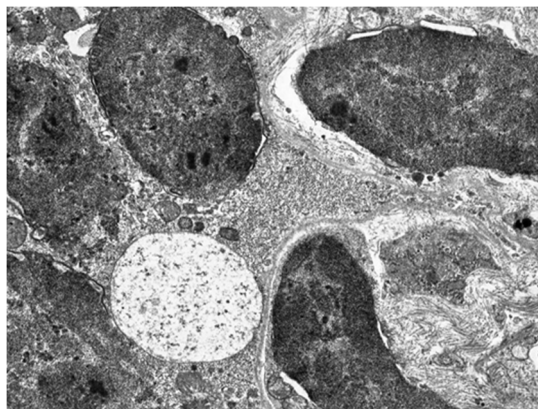


Рис.1. Зона клітинного запалення лімфоїдного фолікулу МЛВ щура через місяць після ДФПГ. Електроннограма. Збільшення x12000.

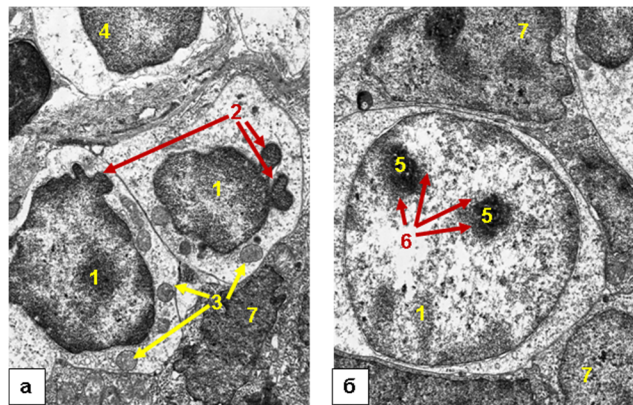


Рис.2 а,б Гермінативний центр лімфоїдного фолікулу МЛВ щура через місяць після ДФПГ. Електроннограма. Ядро бластної клітини (1). Випинання ядерної оболонки (2). Мітохондрії (3). Пошкоджена клітина в просвіті судини (4). Ядерця (5). Субодиноці рибосом (6). Ретикулоендотеліальна клітина (7) Збільшення x12000.

Всі ці зміни свідчать про наявність запального процесу викликаного кишковими бактеріями, які з найбільшою вірогідністю, потрапляють через змінену слизову оболонку кишківника в мезентеріальне лімфатичне русло. Гермінативний центр лімфоїдного фолікулу представлений бластними клітинами, в ядрах яких утворюються випинання ядерної оболонки, що містять гетерохроматин. Ці клітини знаходяться в оточенні ретикулоендотеліальних клітин. Звертає на себе увагу неповноцінність бластних клітин: просвітлення цитоплазми з поодинокими мітохондріями, розширення перинуклеарного простору, випинання хроматину, змінення ядер. У просвіті судини спостерігаються пошкодженні клітини (рис 2 а). Водночас є бластні клітини з ознаками інтенсивного білкового синтезу, активними ядерцями, синтезом субодиноць рибосом (рис 2 б). Активовані гермінативні центри є свідченням антигенної стимуляції імунокомпетентних клітин.

Дендритні клітин лімфоїдних вузликів містять велику кількість імуних депозитів, що мають вигляд електроннощільних відкладень на поверхні клітинних мембран та в цитоплазмі, водночас наявні дегранульовані і частково зруйновані дендритні клітини. Поряд із ними розташовуються В-лімфоцити, що перетворюються на плазматичні клітини, для яких характерний виражений розвиток гранулярного ендоплазматичного ретикулу, наявність ядер з кількома ядерцями. Спостерігаються залишкові тільця плазматичних клітин, які вже виділили імуноглобуліни, або переповнені ними так звані тільця Русселя. Така картина свідчить про збереження антигенпрезентуючої функції макрофагів лімфоїдних фолікулів - під час контакту з дендритними клітинами, стимулюється перетворення в-лімфоцитів на плазматичні клітини, які синтезують антитіла, останні в подальшому з'єднуються з антигенами і утворюють циркулюючі імунні комплекси, які поглинаються макрофагами і осідають на їх клітинних мембранах та базальних мембранах судин. Така ультраструктурна картина є підтвердженням наших результатів серологічного дослідження, які показали підвищення кількості циркулюючих імуних комплексів у крові щурів через місяць після моделювання ДФПГ.

В паракортикальній Т-залежній зоні містяться скупчення Т-лімфоцитів і поодинокі В-лімфоцитів, з електроннощільною цитоплазмою, пікнотичними та фрагментованими ядрами, що є ознаками їх загибелі шляхом апоптозу. Біля них периваскулярно розташовується клітинний детрит, що містить залишкові тільця макрофагів, які мають вигляд пухирів із набряковою рідиною, що свідчить про недостатність лізосомальних ферментів у цитоплазмі. Відсутні також відростки цитоплазми пальцеподібної форми, характерні для інтердигітантних клітин – макрофагів паракортикальної зони, якими вони контактують між собою. Зустрічаються тільця Русселя, що являють собою плазматичні клітини без ядер із набряклим зруйнованим ендоплазматичним ретикуломом, який, вочевидь, не виконує своєї функції синтезу імуноглобулінів. Присутні і пікнотичні ядра без цитоплазми, що вільно розташовуються серед клітинного детриту (рис 3).

Ці зміни є ознаками порушення процесів хоумінгу лімфоцитів, їх проліферації, дозрівання та перетворення на ефекторні клітини (Т-кілери), що в нормі відбуваються в паракортикальній зоні і індукуються біологічно активними речовинами, які синтезуються інтердигітантними клітинами. Натомість наявні ознаки загибелі Т і В-лімфоцитів. Ці данні корелюють із нашими

результатами серологічного дослідження наведеними нижче, які показують зниження кількості Т-клієрів у крові щурів через місяць після моделювання допечінкової форми портальної гіпертензії.

В підкапсульній зоні спостерігаються лімфоцити, бластні клітини та змінені макрофаги з ущільненими пікноморфними ядрами, гіперхромною цитоплазмою, які знаходяться в переапоптозному та в апоптозному стані.

Гемомікроциркуляторне русло лімфатичного вузла також зазнало патологічних змін за умовДФПГ. В капілярах спостерігаються ендотеліальні клітини, плазмолема яких має велику кількість мікрористів, що свідчать про виражені реактивні зміни та гіперхромні ядра витягнутої форми. Базальна мембрана капіляра частково зруйнована, а перикапілярно відмічається клітинний детрит та розростання колагенових волокон. Вказані вище зміни можуть бути ознаками вогнищового запалення.

В ендотеліоцитах прекапілярної вени відмічається накопичення великої кількості електронощільних депозитів, що являють собою імунні комплекси, особливо в області міжклітинних контактів та базальної мембрани. В цитоплазмі розташовуються збільшені у кількості та розмірах лізосоми, натомість інші органели містяться у зменшеній кількості, зокрема мітохондрії. Все це є свідченням того, що ендотелій судин бере на себе функцію елімінації циркулюючих імунних комплексів, джерелом яких є антигени бактерій та чужорідних білків з кишківника. Периваскулярно спостерігаються макрофаги на різних стадіях накопичення та руйнування (рис 4). З найбільшою вірогідністю ці клітини є береговими макрофагами, що першими фагоцитують сторонні частинки, при цьому за участі лізосомних ферментів здійснюють перетворення антигенів фагоцитованих частинок з корпускулярні форми в молекулярну, здатну викликати імунну відповідь – проліферацію лімфоцитів, перетворення В-лімфоцитів в плазматичні клітини, Т-лімфоцитів в ефектори та клітини пам'яті. В подальшому ці молекулярні антигени зв'язуються із синтезованими антитілами і утворюють імунні комплекси, які ми спостерігаємо у великій кількості в гемомікроциркуляторному руслі.

В ендотеліоцитах посткапілярної вени звертає на себе увагу підвищена кількість лізосом, навколо судини спостерігаються скупчення колагенових волокон та плазматичних клітин, макрофагів. Окремі ендотеліальні клітини зруйновані. Такі зміни говорять про реакцію судин на інвазію та активну участь ендотеліальних клітин у фагоцитозі, про що зазначалось вище.

Аналогічні зміни ми спостерігаємо і в білій пульпі селезінки. Зокрема, периваскулярно відмічаються вогнища запалення з ретикулоендотеліальними клітинами, які беруть на себе функцію фагоцитозу, про це свідчить велика кількість гранул в їх цитоплазмі з імунологічно активними речовинами, такими як цитокіни. Поряд з якими розташовуються еозинофіли, що є ознакою бактерійної інвазії, наявні і активні нейтрофіли (рис 5 а,б,в,г). Крім того, в периваскулярній зоні спостерігаються макрофаги на різних стадіях активації.



Рис.3 Клітинний детрит пара кортикальної зони МЛВ щура через місяць післяДФПГ. Електронограма. Залишкове тільце макрофага у вигляді міхура (1) Тільце Русселя (2). Фрагментований макрофаг (3). Збільшення x12000.

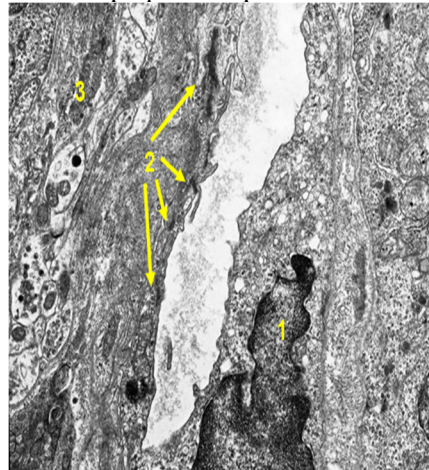


Рис.4 Прекапілярна вена МЛВ щура через місяць післяДФПГ. Електронограма. Ендотеліоцит (1). Імунні депозити (2). Дегранульований макрофаг (3). Збільшення x12000.

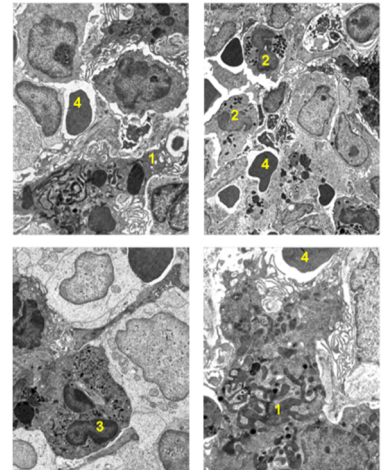


Рис.5 а,б, в, г. Біла пульпа селезінки щура через місяць післяДФПГ. електронограма. ретикулоендотеліальні клітини (1). еозинофіли (2). нейтрофіли (3). судини (4). збільшення x6000.

На відміну від лімфатичного вузла в білій пульпі спостерігаються більш активні білоксинтетичні процеси в плазматичних клітинах, які характеризуються добре розвиненим канальцями ендоплазматичної сітки, що є свідченням більш високого синтезу імуноглобулінів.

Характерною особливістю білої пульпи є наявність гемосидерину в просвіті судин, в цитоплазмі макрофагів та периваскулярно. Так просвіт прекапілярів обтурований гранулами гемосидерину із пошкоджених зруйнованих еритроцитів, та форменними елементами крові, такі самі гранули розташовуються периваскулярно. В ендотелії судин міститься велика кількість лізосом. Периваскулярно звертає на себе увагу залишки клітинного детриту.

В капілярах і посткапілярних венулах розташовуються скупчення еритроцитів, деформовані тромбоцити в оточенні плазматичних клітин з активними клітинними центрами, що також свідчить про високий рівень синтетичних процесів.

Висновки

1. Через місяць після моделювання допечінкової форми портальної гіпертензії в мезентеріальному лімфатичному вузлі та селезінці розвиваються дегенеративно-дистрофічні процеси, а саме загибель лімфоцитів, макрофагів та ретикулоендотеліальних клітин шляхом апоптозу, а інколи некрозу, у відповідь на інвазію кишкових бактерій, з вогнищами периваскулярного запалення та розростанням колагену.
2. Спостерігається проліферативні процеси в лімфоїдних фолікулах селезінки та мезентеріальних лімфатичних вузлах як реакція на антигенну стимуляцію.
3. Інтенсивно проходять процеси антигенної презентації дендритними клітинами з трансформацією В- лімфоцитів у плазматичні клітини, які синтезують антитіла, однак в подальшому більшість з них також зазнають дегенеративних змін.
4. Відмічається відкладання великої кількості імунних комплексів як в базальних мембранах судин гомікроциркуляторного русла, так і в ендотеліоцитах, що беруть на себе функцію фагоцитозу, у зв'язку з неповноцінністю інтердигітантних та берегових макрофагів.
- 5.ДФПГ супроводжується значними морфологічними змінами в органах імунної системи у щурів, які потребують подальшого вивчення в динаміці.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи виразність перебігу імунопатологічних процесів в тканинах селезінки та мезентеріальних лімфатичних вузлах через місяць після моделювання допечінкової форми портальної гіпертензії з метою їх більш глибокого вивчення планується вивчення ультраструктури органів імунної системи в динаміці через 3 місяці, а також після застосування імунокорегуючої терапії.

Список літератури

1. Gafarov O. A. Immunnyy status detey s vnephechyonochnoy portalnoy gipertenziey posle splenektomii / O.A. Gafarov, A.F. Leontev, V. M. Senyakovich // Hirurgiya -2002. –No11-S. 68-72.
2. Drannik G.N. Klinicheskaya immunologiya i alergologiya / G.N. Drannik // - K.:000 «Poligraf plyus», - 2006 - 482 s.
3. Kalita N.Ya. Patogenez vtorichnogo gipersplenizma pri portalnoy gipertenzii / N.Ya. Kalita, K.I. Bulanov, O.G. Kotenko // Vrachebnoe delo.- 1990, No11.- S.60-63.
4. Pavlova I. E. Vliyaniye splenektomii na sostoyaniye immunnoy sistemy u bolnykh s sindromom portalnoy gipertenzii: ot dalennyye rezultaty / I.E. Pavlova // Hirurgiya.- 2008, No6.- S.136-141.
5. Pat. 69539 U, Ukrayina(UA), MPK A61V17/00. Sposib modelyuvannya dopechinkovoi formi portalnoy gipertenziyi u schuriv / Dubrovin O.G., Bik P.L., Dzhuma K.A., Dovgan R.S., Pritula V.P., Godik O.S., Lihodiyevskiy V.M., Chuhray S.M.; zayavnik i vlasnik patentu Natsionalniy medychniy universitet imeni O.O. Bogomoltsya. – No u201115638; zayavl. 30.12.2011 ; opubl. 25.04.2012, Byul.No8, 2012r.
6. Eibl M. Immunological consequences of splenectomy / M. Eibl // Prog Pediatr Surg. - 2000; Vol. 4 №18. P.139-145.
7. Holschneider A. M. Complications of splenectomy in childhood [Text] / A. M. Holschneider, H. Kricz-Klimeck, B. Strasser [et. al.] // Z Kinderchir. - 2004 Apr, Vol.35, №4 P.130-139.
8. Harmanci O. Clinical characteristics of idiopathic portal hypertension / O. Harmanci, Y. Bayraktar // World J. Gastroenterol. - 2007. – Vol. 13, №13 - P. 1906-1911.
9. Koval'chuk L. V. Participation of spleen cells in regulating the production of macrophage migration inhibitory factor in mice / L.V. Koval'chuk, N.U. Sotnikova // Biull Eksp Biol Med. - 1999 Mar; Vol.91, №3, P. 336-338.
10. Robak T. Role of the spleen in immunological processes / T. Robak, A. Płuzañska // Postepy Hig Med Dosw. - 2000 Nov-Dec; Vol. 33, №6, P. 625-640.
11. Sanyal A.J. Portal Hypertension / A. J. Sanyal, V. H. Shah – New Jersey // - Humana Press, - 2005. –515 p.

Реферати

**УЛЬТРАСТРУКТУРА МЕЗЕНТЕРИАЛЬНЫХ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ И СЕЛЕЗЕНКИ У КРЫС
ПРИ ДОПЕЧЕНОЧНОЙ ФОРМЕ ПОРТАЛЬНОЙ
ГИПЕРТЕНЗИИ**

Джума К.А., Стеченко Л.А., Пritула В.П., Чухрай С.Н.,
Трофимова И.Н.

В работе представлены результаты электрономикроско-

**ULTRASTRUCTURE OF MESENTERIAL
LYMPHATIC NODES AND SPLEEN IN RATS
WITH EXTRAHEPATIC PORTAL
HYPERTENSION**

Dzhuma K., Stechenko L., Pritula V., Chuhra S.,
Trofimova I.

The paper presents the results of electron

пического исследования тканей селезенки и мезентериальных лимфатических узлов у крыс через месяц после моделирования допеченочной формы портальной гипертензии. Было восстановлено развитие дегенеративно-дистрофических процессов в ответ на инвазию кишечных бактерий с очагами периваскулярного воспаления и разрастаниями коллагена. Интенсивно проходят процессы антигенной презентации дендритными клетками с последующей трансформацией В-лимфоцитов в плазматические клетки. Отмечается накопление большого количества иммунных комплексов в базальных мембранах сосудов гемомикроциркуляторного русла и в эндотелиоцитах, которые берут на себя функцию фагоцитоза в связи с неполноценностью интердигитантных и береговых макрофагов. Таким образом,ДФПГ сопровождается значительными морфологическими изменениями в органах иммунной системы у крыс, что требует дальнейшего изучения в динамике.

Ключевые слова: селезенка, лимфатические узлы, гипертензия.

Стаття надійшла 3.10.2014 р.

microscopic research of tissues of spleen and mesenteric lymphatic nodes of rats in one month after the modeling of the extrahepatic portal hypertension. It was determined the development of degenerative and dystrophic processes in response to the invasion of intestinal bacteria with areas of perivascular inflammation and collagen growth. The process of intensive antigen presentation by dendritic cells with further transformation of B lymphocytes into plasma cells take place. It is noted the adhesion of a large number of immune complexes in basement membrane of blood vessels of microcirculatory chain and endothelial cells, which play the role of phagocytosis, due to deficiency of interdigitant and coastal macrophages. Thus, extrahepatic portal hypertension is accompanied by significant morphological changes in the organs of the immune system in rats that need further study in dynamics.

Key words: spleen, lymph nodes, hypertension.

Рецензент Єрошенко Г.А.

УДК 615.214:612.7-092.9:616.379-008-64-092.4

С. М. Дронов, В. І. Жилінок

ІЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпропетровськ

ОЦІНКА ВПЛИВУ ЗАСОБІВ З НООТРОПНОЇ АКТИВНІСТЮ НА ОРІЄНТОВНО-ДОСЛІДНИЦЬКУ АКТИВНІСТЬ У ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ГІПЕРГЛІКЕМІЄЮ

Метою даної роботи було проведення аналізу впливу низки ноотропних засобів на показники безумовно-рефлекторної активності тварин за умов хронічної гіперглікемії в тесті «відкрите поле». Встановлено, що курсове введення N-фенілацетил-L-пролін гліцину (ноопепту), прамірацетаму, фенілпірацетаму (ентропу), цитиколіну та цереброкуруну, але не пірацетаму та екстракту гінкго білоба спроможне посилювати локомоторну та дослідницьку активність у тварин з тривалою алоксан-індукованою гіперглікемією. Здатність нормалізувати рухову активність тварин за умов хронічної гіперглікемії зменшується в ряду ентроп > прамірацетам > цитиколін > ноопепт ≈ цереброкурин >> пірацетам ≈ екстракт гінкго білоба.

Ключові слова: алоксан-індукована гіперглікемія, ноотропні засоби, тест «відкрите поле».

Робота є фрагментом НДР «Експериментально-теоретичне обґрунтування особливостей знеболюючої та нейропротективної медикаментозної терапії за умов модельованої патології» (номер державної реєстрації 0104U006269).

Цукровий діабет (ЦД) залишається серйозною медико-соціальною проблемою, яка носить характер глобальної епідемії неінфекційної етіології [8]. Важливим патогенетичним фактором у розвитку ускладнень ЦД і, зокрема, ангіопатій визнається окислювальний стрес [1], а основним індуктором процесів вільнорадикального окислення – стан хронічної гіперглікемії [4]. Гіперпродукція активних форм кисню та азоту, що виникає внаслідок цього, сприяє окисній модифікації ліпідів і білків, а також активації прозапальних молекул, що насамкінець призводить до ушкодження ДНК та апоптозу ендотеліальних клітин [14].

Першою мішенню, яка зазнає впливу гіперглікемії, є ендотелій судин. Оскільки судинна капілярна сітка досить розвинена в мієлінових оболонках периферичних нервів, в сірій та білій речовині головного мозку, то метаболічні та судинні розлади при ЦД швидко приводять до розладів нейронального та ендоневрального кровотоку, тим самим провокуючи порушення функціональної активності, а також структурно-морфологічної цілісності центральної і периферичної нервової системи, в основі якої лежать мітохондріальна дисфункція, енергетичний дефіцит та апоптоз нейронів [8, 11].

Експериментально та клінічно встановлено, що адекватний контроль рівня глюкози не попереджує розвитку асоційованих з ЦД порушень пізнавальних функцій [16]. Враховуючи зазначене, актуальним є пошук нових стратегій в діагностиці, терапії та профілактиці неврологічних ускладнень ЦД [17]. Відповідно, оптимізація специфічної фармакотерапії з метою попередження порушень когнітивної сфери може бути досягнута шляхом включення у лікування ЦД ноотропних та нейропротекторних засобів [7]. Однак натепер відсутні чіткі рекомендації та обґрунтування щодо призначення цієї групи препаратів у хворих на ЦД.