

ПЕЧЕНЬ И РЕГИОНАРНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Светлана Викторовна МИЧУРИНА¹, Светлана Викторовна КАРЕЛИНА²,
Ирина Юрьевна ИЩЕНКО¹, Геннадий Михайлович ВАКУЛИН²

¹НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

²ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Целью исследования явилось изучение микро- и ультраструктурных изменений в лимфатическом регионе печени крыс через 3, 7 и 14 суток после однократного воздействия высокой температуры. В печени на 3-и сутки после экспериментальной гипертермии (ЭГ) выявлены признаки нарушения крово- и лимфообращения, разрушения гематолимфатического барьера. Эти изменения приводили к возникновению тканевой гипоксии и, как следствие, к дистрофии гепатоцитов, нарушению их функциональной активности. Несмотря на развитие восстановительных процессов в исследуемом органе, значительные нарушения сохранялись вплоть до 14-х суток после воздействия высокой температуры. В лимфатических узлах печени на 7-е сутки после ЭГ обнаружено уменьшение объемной плотности паракортекса, что расценивается как подавление Т-зависимых иммунных реакций. Выявленные нами на 14-е сутки после ЭГ увеличение размеров паракортикальной зоны и герминативных центров в печеночных лимфоузлах и миграция лимфоидных элементов в паренхиму печени, по-видимому, свидетельствуют об усилении протективной функции всей лимфоидной системы на дестабилизирующее воздействие высокой температуры.

Ключевые слова: экспериментальная гипертермия, печень, регионарные лимфатические узлы.

Введение

Зависимость от температуры окружающей среды большинства процессов жизнедеятельности делает ее важнейшим экологическим фактором, приспособление к которому может иметь решающее значение для выживания организма. С действием высоких и сверхвысоких температур человеку часто приходится встречаться в силу особенностей некоторых климатических зон, а также при работе на различных производствах. Известно, что пребывание организма в условиях гипертермического воздействия может приводить к метаболическим и функциональным изменениям. В этих условиях важную роль в обеспечении гомеостаза организма играет основной орган детоксикации — печень [1–3] а также регионарные лимфатические узлы, осуществляющие ее лимфодетоксикацию [1, 2]. Известно, что в лимфатических узлах происходит не только биохимическая обработка приносимой лимфы, но и формирование иммунного ответа на поступающие антигены [4, 5]. Это и определило **цель** настоящей работы — изучение лимфатического региона печени крыс на 3-и, 7-е и 14-е сутки после однократного воздействия высокой температуры.

Материал и методы

Эксперимент проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГОУ ВПО

Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава, использовано 87 половозрелых крыс-самок Wistar массой 180–200 г. Животные подвергались однократному нагреванию в соответствии с методикой «Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» [6] до стадии теплового удара (ректальная температура 43,5 °С). Исследовали печень и регионарные лимфатические узлы у крыс на 3-и, 7-е и 14-е сутки после воздействия высокой температуры. Контролем служили интактные животные.

По истечении сроков эксперимента крыс забивали под эфирным наркозом методом декапитации. Для светооптического исследования гистологический материал (кусочки печени и печеночные лимфоузлы) фиксировали в растворе Телесницкого и проводили по общепринятой методике. Препараты окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Морфометрическое исследование печени проводили при увеличении в 900 раз на срезах толщиной 5 мкм. В ходе морфометрического исследования [7] определяли относительные площади сети синусоидов, ядер и цитоплазмы гепатоцитов, численные плотности синусоидных клеток, гепатоцитов и двоядерных паренхиматозных клеток; рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение, отношение численной плотности синусоидных клеток

Мичурина С.В. — д.м.н., проф., гл.н.с., e-mail: ad_belkin@mail.ru

Карелина С.В. — старший преподаватель кафедры мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф, e-mail: orvd_rf@ngs.ru

Ищенко И.Ю. — к.б.н., ст.н.с., e-mail: irenisch@mail.ru

Вакулин Г.М. — к.м.н., ст.н.с. ЦНИЛ

к численной плотности всех гепатоцитов, вычисляли долю диплокариоцитов среди всех гепатоцитов, рассчитывали коэффициент Визотто — отношение площади сети синусоидов к площади паренхимы всех гепатоцитов. Стереометрический анализ лимфатических узлов выполняли при увеличении в 32 раза на срезах толщиной 7 мкм. Определяли объемные плотности коры и мозгового вещества, рассчитывали корково-мозговой индекс. В лимфоузлах вычисляли объемные плотности мозговых тяжей, мозговых синусов, краевого синуса, паракортекса, межузелковой зоны, всех лимфоидных узелков, всех герминативных центров и долю герминативных центров в лимфоидных узелках.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки печени размером менее 1 мм³ фиксировали методом двойной фиксации (4%-ный параформальдегидный изотонический 0,1М фиксатор; осмиевый фиксатор). После дегидратации образцов в серии спиртов возрастающей концентрации их заключали в эпон-812. Ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца, а затем изучали в электронном микроскопе JEM-7A (Япония).

Все экспериментальные работы были проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ($\bar{M}$), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $\bar{M} \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В печени животных на 3-и сутки после воздействия высокой температуры в области триад на-

блюдается расширение вен, желчных протоков, стаз крови в междольковых артериях, дилатация лимфатических пространств Малла и миграция в них клеток лимфоидного ряда (рис. 1). Внутри печеночных долек отмечается чередование участков расширенных кровеносных синусоидных капилляров с участками их спазмирования. Вышеописанные наблюдения свидетельствуют о значительных нарушениях крово- и лимфообращения. Отмечены участки дистрофии гепатоцитов.

Морфометрически в печени выявлено увеличение относительной площади сети синусоидных капилляров на фоне уменьшения относительной площади паренхимы, возрастание коэффициента Визотто, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения при уменьшении относительной площади цитоплазмы гепатоцитов (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о снижении функциональной активности клеток паренхимы. Возрастание численной плотности двуядерных гепатоцитов и увеличение доли диплокариоцитов среди всех гепатоцитов рассматриваются нами как компенсаторный ответ на дестабилизирующее воздействие высокой температуры.

На электронно-микроскопическом уровне в синусоидах печени обнаружены картины стаза крови сладжированными эритроцитами, агрегация тромбоцитов и образование микротромбов; выявлены участки разрушения выстилки кровеносных синусоидных капилляров, что свидетельствует о нарушении гематолимфатического барьера. Расширение пространств Диссе, скопление в них фибрилл коллагена подтверждает факт ухудшения дренирования этих прелимфатических пространств. В пространствах Диссе обнаружены лимфоциты и плазматические клетки, что свидетельствует о наличии антигенной стимуляции печени. Кроме того, в стенках синусоидных капилляров отмечено появление округленных эндотелиоцитов, в которых усилива-

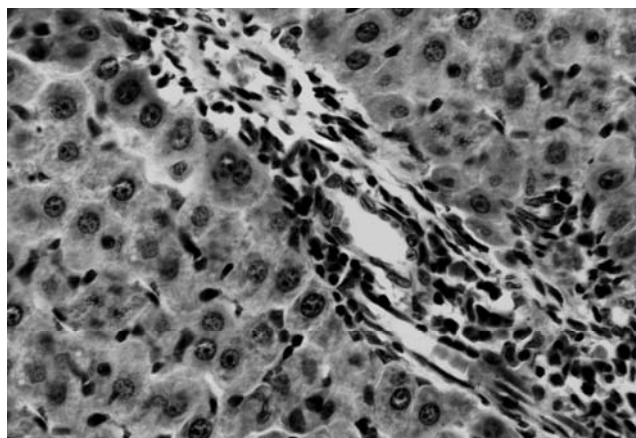


Рис. 1. Печень крыс на 3 сутки после ЭГ: сладжирование эритроцитов в сосудах триад, дилатация лимфатических пространств Малла и инфильтрация их лимфоидными элементами. Об. 40, ок. 10

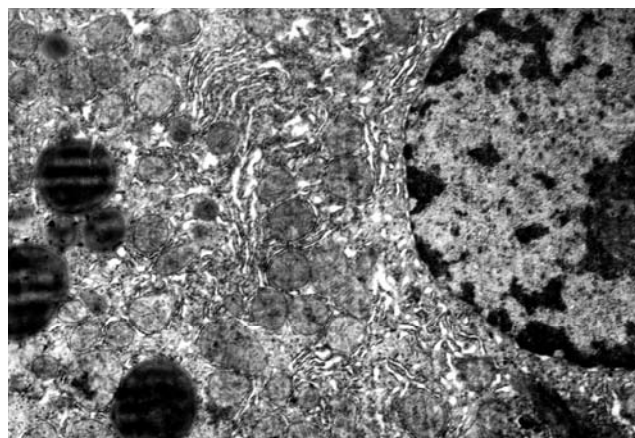


Рис. 2. Печень крыс на 3 сутки после ЭГ: дезинтегративное изменение ядрышка, баллонообразное расширение каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), осыпание рибосом с мембран ретикулума (а). Ув. 16 000

Таблица 1

Результаты морфометрии срезов печени крыс
после воздействия экспериментальной гипертермии ($M \pm t$)

Параметры	Контроль	3 суток после ЭГ	7 суток после ЭГ	14 суток после ЭГ
Относительная площадь цитоплазмы гепатоцитов, $S_{цг}$	50,58 $\pm$ 2,09	32,44 $\pm$ 2,74*	24,64 $\pm$ 2,54*	22,2 $\pm$ 3,12*
Относительная площадь ядер гепатоцитов, $S_{яг}$	17,98 $\pm$ 0,85	18,92 $\pm$ 1,27	22,64 $\pm$ 1,96	20,56 $\pm$ 1,57*
Относительная площадь сети синусоидов, $S_{син}$	20,75 $\pm$ 0,73	35,00 $\pm$ 0,65*	37,00 $\pm$ 1,35*	43,20 $\pm$ 1,42*
Численная плотность гепатоцитов, $N_{геп}$	630,75 $\pm$ 20,59	594,20 $\pm$ 7,49	696,80 $\pm$ 22,08	588,40 $\pm$ 12,77
Численная плотность диплокариоцитов, $N_{дк}$	47,00 $\pm$ 6,83	43,80 $\pm$ 2,43	74,00 $\pm$ 17,85	52,60 $\pm$ 5,53
Численная плотность синусоидных клеток, $N_{с.кл.}$	318,50 $\pm$ 41,23	369,80 $\pm$ 31,14	378,00 $\pm$ 40,01	347,80 $\pm$ 21,53
Ядерно-цитоплазматическое отношение, $S_{яг}/S_{цг}$	0,36 $\pm$ 0,03	0,61 $\pm$ 0,10*	0,97 $\pm$ 0,16*	1,02 $\pm$ 0,24*
Отношение численной плотности синусоидных клеток к численной плотности всех гепатоцитов, $N_{с.кл.}/N_{геп}$	0,08 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01*	0,12 $\pm$ 0,01*
Отношение численной плотности двуядерных гепатоцитов к численной плотности всех гепатоцитов, $N_{дв.геп.}/N_{геп}$	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
Коэффициент Визотто (отношение относительной площади сети синусоидов к относительной площади паренхимы всех гепатоцитов), $S_{син}/S_{пар}$	0,31 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,02*	0,78 $\pm$ 0,06*	1,03 $\pm$ 0,08*

Примечание: * — отличие от величины соответствующего показателя в контроле достоверно при $p < 0,05$; относительная площадь — S (%), численная плотность — N (%).

лась конденсация гетерохроматина и обнаруживалось уплотнение основного вещества цитоплазмы клеток. Согласно данным литературы [8], такие изменения эндотелиальных клеток рассматриваются как апоптотические. Описанные выше результаты электронно-микроскопического исследования свидетельствуют о нарушении внутрисосудистого транспорта и напряженном состоянии микроциркуляции в органе. В паренхиматозных клетках печени крыс на 3-и сутки после воздействия высокой температуры отмечено баллонообразное расширение каналов гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР), осыпание рибосом с мембран ретикулума, что отражает снижение белоксинтезирующей функции паренхиматозных клеток (рис. 2). Обнаружено набухание матрикса и нарушение структуры крист митохондрий гепатоцитов, что свидетельствует о развитии гипоксии. Выявлено обеднение клеток паренхимы гликогеном. Отмечено накопление липидов в их цитоплазме, что является признаком нарушения выведения из клетки триглицеридов.

Микро- и ультраструктурные признаки затруднения внутрисосудистого транспорта в тканевом микрорайоне печени, признаки разрушения гематолимфатического барьера, нарушения крово- и лимфообращения сохраняются вплоть до 14-х суток восстановительного периода. Так, на 7-е и 14-е сутки после воздействия высокой температуры выяв-

лено умеренное расширение междольковых сосудов триад и желчных протоков, увеличение относительной площади сети синусоидных капилляров, стаз эритроцитов в венах и артериях портального тракта; инфильтрация перипортальных зон клетками лимфоидного ряда и миграция лимфоцитов в паренхиму и в периферические области; нарушение архитектоники центральных вен.

Морфометрически в печени на 7-е и 14-е сутки после экспериментальной гипертермии (ЭГ) обнаружено увеличение относительной площади ядер гепатоцитов и ядерно-цитоплазматического отношения в них, возрастание доли диплокариоцитов среди паренхиматозных клеток. Эти данные свидетельствуют об усилении функциональной активности и интенсивности восстановительных процессов в паренхиматозных клетках печени.

На электронно-микроскопическом уровне на 7-е сутки после воздействия высокой температуры наблюдается значительное расширение синусоидов и переполнение их клеточным детритом (рис. 3), что характерно для нарушения внутрисосудистого транспорта и напряженного состояния микроциркуляции. В пространствах Диссе и синусоидах определяется большое количество хлопьевидного материала. На 14-е сутки после ЭГ клеточный детрит в синусоидах встречается значительно реже. В синусоидных капиллярах выявляются клетки Купфера,

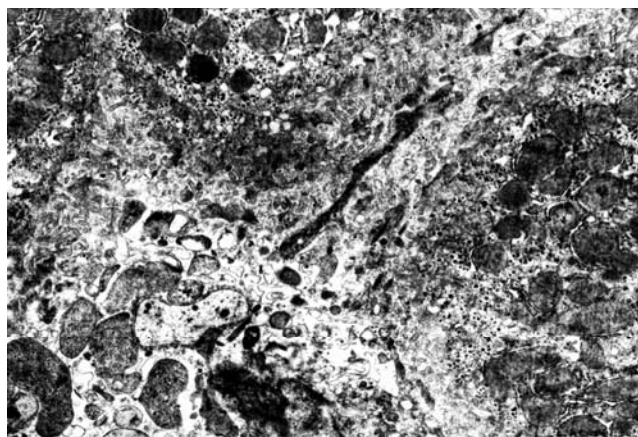


Рис. 3. Печень крыс на 7 сутки после ЭГ: фрагменты гепатоцитов с восстанавливающейся ультраструктурой в зоне расширенного синусоида, переполненного клеточным детритом. Ув. 12 000

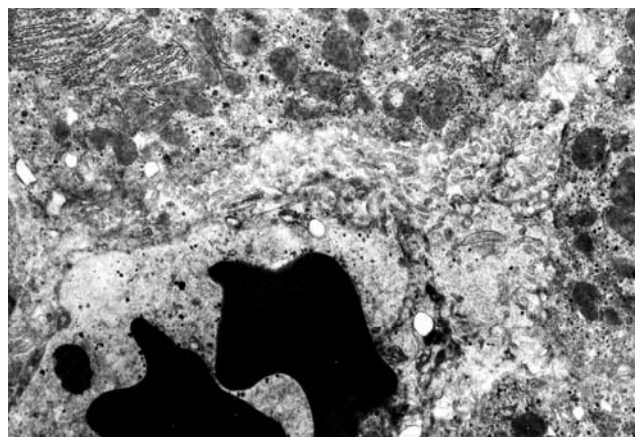


Рис. 4. Печень крыс на 14 сутки после ЭГ: синусоид, содержащий хлопьевидный материал (а) и фрагмент увеличенной активированной клетки Купфера (б) с крупными гетерофагосомами, в которых заключен клеточный детрит. Ув. 14 000

содержащие большое количество гетерофагосом с клеточным детритом (рис. 4). Ультраструктурно обнаружено, что кроме поврежденных гепатоцитов встречаются паренхиматозные клетки с признаками восстановления. Они характеризуются наличием ядрышек с развитым гранулярным компонентом, большим количеством электронно-плотных митохондрий и гликогена, отсутствием баллонообразных расширений каналов ГЭР, образованием «мито-ГЭР-комплексов» [2].

Стереометрическое исследование регионарных лимфатических узлов печени крыс на 3-и сутки после воздействия высокой температуры не выявило достоверных изменений в долевом соотношении их структурно-функциональных зон (табл. 2). Однако

во время забора материала у экспериментальных животных по сравнению с группой интактных крыс визуально отмечено увеличение размеров печеночных лимфоузлов. Эти результаты свидетельствуют о сопоставленном увеличении Т- и В-зависимых зон в регионарных лимфатических узлах печени. На 7-е сутки после ЭГ обнаружено достоверное уменьшение объемной плотности паракортекса, что свидетельствует о подавлении Т-зависимых иммунных реакций (табл. 2). Отмечена выраженная тенденция к увеличению объемной плотности мозгового вещества, в частности, объемной плотности мозговых тяжей, что расценивается как признак усиления антигенной нагрузки на организм и повышения интенсивности В-зависимых им-

Таблица 2

Результаты стереометрического исследования структурно-функциональных зон печеночных лимфоузлов после экспериментальной гипертермии

Параметр	Контроль	3 суток после ЭГ	7 суток после ЭГ	14 суток после ЭГ
Корково-мозговой индекс	2,79 ± 0,67	2,53 ± 0,57	1,5 ± 0,36	2,23 ± 0,16
Объемная плотность (V) коры	72,42 ± 5,25	70,73 ± 4,52	57,8 ± 6,82	68,99 ± 1,53
V паракортекса	56,44 ± 4,27	51,3 ± 3,12	41,25 ± 5,45	52,79 ± 5,12
V краевого синуса	3,03 ± 0,43	3,66 ± 0,2	2,78 ± 0,3	1,65 ± 0,61
V межузелковой зоны	1,1 ± 0,68	1,4 ± 0,66	1,41 ± 0,41	1,13 ± 0,46
V всех лимфоидных узелков	11,85 ± 2,1	14,37 ± 2,01	12,39 ± 2,27	13,41 ± 3,27
V герминативных центров в лимфатическом узле	1,22 ± 0,23	1,79 ± 0,17	1,2 ± 0,18	2,24 ± 0,93
V герминативных центров в лимфоидных узелках	10,34 ± 0,72	12,72 ± 1,91	10,78 ± 3,13	15,53 ± 3,75
V мозгового вещества	27,58 ± 5,25	29,27 ± 4,52	42,17 ± 6,82	31,01 ± 1,53
V мозговых тяжей	16,54 ± 3,34	17,61 ± 2,63	26,33 ± 4,3	19,1 ± 1,95
V мозговых синусов	11,03 ± 1,98	11,66 ± 2,62	15,84 ± 3,51	11,91 ± 0,74

мунных реакций. При исследовании печеночных лимфоузлов на 14-е сутки после ЭГ обнаружено восстановление объемной плотности Т-зависимой паракортикальной зоны до контрольного уровня (стимуляция развития Т-зависимых иммунных реакций). Выявленная тенденция к увеличению объемной плотности герминативных центров во всем лимфатическом узле свидетельствует о стимуляции развития В-зависимых иммунных реакций.

Однократное воздействие высокой температуры на организм животных приводит к целому комплексу микро- и ультраструктурных изменений в печени. На 3-и сутки после экспериментальной гипертермии выявляются признаки нарушения крово- и лимфообращения (увеличение относительной площади сети синусоидных капилляров, расширение лимфатических пространств Малла, стаз эритроцитов и образование микротромбов в сосудах, заполнение синусоидов клеточным детритом), разрушения гемато-лимфатического барьера (гибель части эндотелиоцитов, разрушение стенки синусоидов, дилатация и заполнение прелимфатических пространств Диссе коллагеном, тонкофибриллярным материалом, лимфоцитами и плазматическими клетками), дистрофии гепатоцитов.

Согласно концепции Бородин Ю.И. [9], лимфатический дренаж в анатомическом регионе является трехуровневым: 1) пути несосудистого массопереноса в интерстиции (прелимфатика), 2) лимфатические капилляры и сосуды, 3) регионарные лимфоузлы. Под воздействием высокой температуры в лимфатическом регионе печени нарушается лимфатический дренаж во всех его звеньях. Разбалансировка корней лимфатической системы в свою очередь усиливает сдвиг гематолимфатического равновесия в печени, что приводит к расширению сети синусоидов, разрушению гематолимфатического барьера, возникновению тканевой гипоксии, дистрофии паренхиматозных клеток и нарушению их функциональной активности. Несмотря на развитие восстановительных процессов в тканевом микрорайоне печени, напряженное состояние микроциркуляции в органе и структурные изменения в гепатоцитах остаются выраженными еще к 14-м суткам после дестабилизирующего воздействия высокой температуры. Наличие признаков нарушения крово- и лимфообращения в тканевом микрорайоне печени (расширение междольковых сосудов триад и желчных протоков, дилатация лимфатических пространств Малла, увеличение относительной площади сети синусоидов, нарушение архитектоники центральных вен, расширение поддольковых вен) при отсутствии изменений со стороны синусной системы регионарных лимфатических узлов к последнему сроку исследования, по-видимому, свидетельствует о недостаточности дренажной функции последних. Выявленные нами на 14-е сутки после ЭГ увеличение размеров паракортикальной зоны и герминативных центров в печеночных лимфоузлах

и миграция лимфоидных элементов в паренхиму печени можно расценить как усиление протективной функции лимфоидной системы печени в ответ на дестабилизирующее воздействие высокой температуры.

Список литературы

1. Мичурина С.В. Печень и ее регионарные лимфатические узлы при воздействии 3,4-бензпиреном в онтогенезе: дис. ... докт. мед. наук. Новосибирск, 1995.
2. Мичурина С.В. Liver and its regional lymph nodes under the influence of 3,4-benzpyrene on ontogenesis: dis. ... doct. med. nauk. Novosibirsk, 1995.
3. Колесников С.И., Мичурина С.В., Семениук А.В., Вакулин Г.М. Печень и ее регионарные лимфатические узлы при воздействии 3,4-бензпиреном. Новосибирск, 1995. 218 с.
4. Колесников С.И., Мичурина С.В., Семениук А.В., Вакулин Г.М. The liver and its regional lymph nodes under the influence of 3,4-benzpyrene. Novosibirsk, 1995. 218 p.
5. Гичев Ю.П. Печень: адаптация, экология. Новосибирск, 1993. 152 с.
6. Гичев Ю.П. Liver: adaptation, ecology. Novosibirsk, 1993. 152 p.
7. Бородин Ю.И. Лимфология: некоторые теоретические и прикладные аспекты // Пробл. exper. клин. лимфологии. Новосибирск, 1994. 2. 15–17.
8. Borodin Yu.I. Lymphology: some theoretical and applied aspects // Problems of experimental and clinical lymphology. Novosibirsk, 1994. 2. 15–17.
9. Бородин Ю.И. 50 лет в лимфологии // Проблемы лимфологии и интерстициального массопереноса. Новосибирск, 2004. 10. (ч. 1). 25–28.
10. Borodin Yu.I. 50 years in lymphology // Problems of lymphology and interstitial mass carrying Novosibirsk, 2004. 10. (pt. 1). 25–28.
11. Пат. 99126978 РФ. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / Пахомова Ю.В., Ибрагимов Р.Ш., Ефремов А.В.; опубл. 22.12.99.
12. Patent 99126978 RF. A way of experimental modeling of the general hyperthermia at small laboratory animals / Pahomova Yu.V., Ibragimov R. Sh., Efremov A.V.; published 22.12.99.
13. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., 1990. 384 с.
14. Avtandilov G.G. Medical morphometry. M., 1990. 384 p.
15. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клеток (апоптоз). М., 2001. 192 с.
16. Lushnikov E.F., Abrosimov A.Yu. Cells death (apoptosis). M., 2001. 192 p.
17. Бородин Ю.И. Регионарный лимфатический дренаж и лимфодетоксикация // Морфология. 2005. (4). 25–28.
18. Borodin Yu.I. Regional lymphatic drainage and lymph detoxication // Morfologiya. 2005. (4). 25–28.

LIVER AND REGIONAL LYMPHATIC NODES OF RATS AFTER INFLUENCE OF HIGH TEMPERATURE

**Svetlana Viktorovna MICHURINA¹, Svetlana Viktorovna KARELINA²,
Irina Yur'evna ISHCENKO¹, Gennadii Mikhailovich VAKULIN²**

¹*Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

²*Novosibirsk State Medical University
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

The purpose of this research was to study micro- and ultrastructural changes in the liver lymphatic region of Wistar rats over 3, 7 and 14 days after a single exposure of high temperature. In the liver at 3-day after an experimental hyperthermia (EH) the evidence of blood and lymph circulation abnormality, signs of destruction of blood-lymph barrier were revealed. These changes have led to the development of tissue hypoxia and, consequently, to the degeneration of hepatocytes, disruption of their functional activity. Significant violations persisted until the 14th day after exposure of EH in despite of the development of regenerative processes in the liver. The decrease in paracortex volume density has been found in liver lymph nodes to 7th day after EH, this fact is considered as suppression of T-dependent immune reactions. The increase of sizes of paracortical zone and germinative centers in hepatic lymph nodes and migration of lymphoid elements in liver parenchyma on 14th day after EH has been revealed; apparently, that testifies to the strengthening of protective function of all lymphoid system in reply to destabilizing influence of high temperature.

Key words: experimental hyperthermia, liver, regional lymph nodes.

Michurina S.V. — doctor of medical sciences, professor, chief researcher, e-mail: ad_belkin@mail.ru

*Karelina S.V. — responsible for correspondence — senior teacher of chair of mobilization preparation
of public health services and emergency medicine, e-mail: orvd_rf@ngs.ru*

Ishchenko I.Yu. — candidate biological sciences, senior researcher, e-mail: irenisch@mail.ru

Vakulin G.M. — candidate of medical sciences, senior researcher