

УЛЬТРАСТРУКТУРА КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ОРГАНОВ НЕЙРОИММУНОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ У КРЫС И ЕЕ ЛЕЧЕНИИ КОМБИНИРОВАННЫМИ ГИПЕРОСМОЛЯРНЫМИ РАСТВОРАМИ

Черкасов Э.В., Ковальчук А.И., Дзевульская И.В.

Национальный медицинский университет имени О.О. Богомольца, Киев, Украина,

Подбор комбинированных гиперосмолярных растворов для инфузионной терапии ожоговой болезни продолжается оставаться одной из актуальных задач современной комбустиологии. В данной работе методом электронной микроскопии изучены структурные изменения кровеносных сосудов аденогипофиза, коркового вещества надпочечников и тимуса при экспериментальной ожоговой болезни у крыс и ее лечении комбинированными гиперосмолярными растворами. Установлено, что гиперосмолярные растворы при внутривенном введении действуют как протекторы сосудистой стенки, а лактопротеин-С оказывает мембранопластическое влияние на структуру органов.

Ключевые слова: ожоговая болезнь, аденогипофиз, корковое вещество надпочечников, тимус, кровеносные сосуды, электронная микроскопия.

Введение

Исследование патогенеза ожоговой болезни, вызванной ею полиорганной недостаточности [8, 9, 10] и их лечение [4, 6] продолжает оставаться актуальной задачей современной комбустиологии. Особо остро стоит вопрос о роли в этом процессе нейроиммуноэндокринной системы [1, 2, 5, 9], важнейшими составляющими которой являются надпочечники, аденогипофиз и тимус. Общеизвестно, что между этими органами наиболее ярко проявляются опосредованные через сосудистое русло тесные молекулярные и клеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия, которые играют ведущую роль в обеспечении локальных и общерегуляторных эффектов в норме и при патологии [1].

В настоящее время доказана [3, 6] клиническая целесообразность инфузионной терапии ожоговой болезни гиперосмолярными растворами дезинтоксикационного, реологического, энергетического и противовоспалительного действия. В то же время ультраструктура кровеносных сосудов аденогипофиза, коркового вещества надпочечников и тимуса при ожоговой болезни и ее лечении комбинированными гиперосмолярными растворами не была предметом специальных исследований.

Цель работы

Целью данного исследования стало изучение ультраструктуры кровеносных сосудов аденогипофиза, коркового вещества надпочечников и тимуса при экспериментальной ожоговой болезни у крыс и ее лечении комбинированными гиперосмолярными растворами (HAES-LX-5% и лактопротеином с сорбитолом).

Материалы и методы

Экспериментальное исследование морфологических изменений в аденогипофизе, коре надпочечников и тимусе при ожоговой болезни (через 1, 3, 7, 14, 21, 30 суток) и при условии действия инфузионных коллоидно-гиперосмолярных препаратов дезинтоксикационного, реологического, энергетического, противовоспалительного действия HAES-LX-5% и лактопротеина с сорбитолом (фирменное название препарата – «Лактопротеин-С») было выполнено на 90 крысах-самцах линии Вистар массой 155-160 граммов.

Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», принятыми

Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001), руководствовались также рекомендациями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985) и положениями «Правил к клинической оценке безопасности фармакологических средств (GLP)».

Животные были разделены на 7 групп: I – интактные животные; II, III, IV – крысы без термической травмы, которым проводилась отдельная инфузия 0,9% раствора NaCl, HAES - LX-5% и лактопротеина с сорбитолом, соответственно, в дозе 10 мл/кг; V, VI, VII – животные с ожогом, которым по аналогичной схеме и в таком же дозовом режиме проводили отдельное введение исследуемых веществ.

Ожог (после соответствующей премедикации) вызывали путем прикладывания к боковым поверхностям туловища животных четырех медных пластинок (по две пластинки с каждой стороны), которые предварительно держали в течение шести минут в воде с постоянной температурой 100°C. Общая площадь ожога у крыс отмеченной массы составляла 21-23% при экспозиции 10 сек., что являлось достаточным для формирования ожога II степени – дермального поверхностного ожога (бывшая III А степень) и развития шокового состояния средней степени тяжести.

Исследуемые растворы вводили внутривенно в течение 5-6 мин. в дозе 10 мл/кг массы тела. Инфузию проводили в нижнюю полую вену, для чего выполняли ее катетеризацию в асептических условиях через бедренную вену. Катетер, установленный в бедренной вене, подшивали под кожу. Его просвет по всей длине заполняли титрованным раствором гепарина (0,1 мл гепарина на 10 мл 0,9% раствора NaCl) после каждого введения веществ. Первое введение растворов осуществляли через 1 час после моделирования патологического состояния, следующие инфузии выполняли ежедневно в целом на протяжении 7 суток.

Проведенные нами предварительные исследования показали, что крысы-самцы без какой-либо фармакокоррекции на фоне ожоговой травмы кожи погибали все на 9-е сутки эксперимента, а на 7-е сутки летальность составила 80%, в связи с чем (учитывая вопросы биоэтики), практически невозможно было набрать корректную (в количественном отношении), группу контроля с чистым ожогом кожи без лечения. Поэтому для контроля лечебного действия гиперосмолярных раство-

ров мы опирались на группу животных, которые на фоне ожога кожи получали 0,9% раствор NaCl.

В группе животных с ожоговой травмой кожи, которым вводили 0,9% раствор NaCl, выявлено прогрессирующее увеличение показателя летальности от 5% через 1-е сутки до 11% в промежутке от 4-х до 7-ми суток со следующим постепенным уменьшением величины данного показателя до 3% в промежутке от 22-х до 30-ти суток после ожога кожи. Общий показатель летальности в группе крыс-самцов, которым после ожога кожи вводили 0,9 % раствор NaCl, составил 43,5%. Отдельная лечебная курсовая терапия крыс с ожоговой травмой кожи раствором HAES-LX-5%, подобно таковой лактопротеином с сорбитолом, существенно препятствовала гибели животных на протяжении всего наблюдения.

Забор материала проводился под наркозом. У животных после декапитации производили вскрытие полости черепа, брюшной и грудной полостей и вырезали с помощью лезвия небольшие кусочки аденогипофиза, коры надпочечников и тимуса. Материал для морфологических исследований обрабатывали по общепринятой методике.

Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме «ЛКВ», изучали и фотографировали на электронном микроскопе ПЕМ-125К. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым и метиленовым синим, изучали и фотографировали с помощью светового микроскопа Olympus Vx15.

Результаты и обсуждение

Для аденогипофиза, коры надпочечников и тимуса крыс с ожоговой травмой кожи, которым вводили 0,9% раствор NaCl, через 1, 3, 7 и 14 суток эксперимента (сроки, когда зарегистрировано увеличение и стабилизация величины показателя летальности) наиболее характерным общим проявлением патоморфологических изменений была альтерация функционально разных клеток органа и стенок сосудов гемомикроциркуляторного русла на фоне выраженного межклеточного и паравазального отека.

Типичным для отмеченных животных было расширение просвета кровеносных капилляров и венул, стаз эритроцитов и образование их агрегатов по типу «монетных столбиков». В некоторых кровеносных капиллярах эндотелиальная выстилка исчезала практически полностью и сосудистая стенка была представлена только базальной мембраной или её фрагментами. Утрата целостности сосудистой стенки приводит к появлению паравазальных кровоизлияний, которые являются разнообразными по форме и величине, и определяются иногда вблизи сосудов с неповрежденной стенкой. В стенке некоторых кровеносных капилляров с сохраненной сосудистой стенкой эндотелиальное покрытие становится тонким, в участках (простых по форме и небольших по длине) межэндотелиальных контактов появляются расширенные межэндотелиальные щели или трансэндотелиальные каналы, которые в зонах соответствующих им локусов разрушения базальной мембраны имеют вид сквозных трансмуральных дефектов. Описанные трансмуральные дефекты вместе с прилегающими и расширенными (в результате развития отека) межклеточными пространствами являются местами протекания и внутриорганного проникновения плазмы и клеток крови, которые приводят к прогрессированию отека и кровоизлияний.

Изложенные нами выше особенности развития отека в изученных органах нейроиммуноэндокринной

системы при ожоговой болезни являются настолько неотъемлемой частью остальных последовательных изменений, что (для упрощения изложения и с целью избежания терминологических недоразумений) мы в дальнейшем будем называть вероятные (расширенные межэндотелиальные щели и трансэндотелиальные каналы) и сформированные трансмуральные дефекты термином «протекания», а потенциальные пути межклеточного внутриорганного распространения плазмы крови – термином «проникновения».

У крыс с ожоговой травмой, которым по схеме эксперимента были введены гиперосмолярные растворы (VI и VII группы животных), в аденогипофизе, корковом веществе надпочечников, тимусе не выявлены существенные повреждения стенки кровеносных сосудов и кровоизлияния, а также, соответственно, не зарегистрированы структурные признаки паравазального и межклеточного отека. Это свидетельствует об ангиопротекторных свойствах примененных комбинированных гиперосмолярных растворов, которые при условии применения лактопротеина с сорбитолом связаны с достаточно специфическим и до настоящего времени не описанным мембранопластичным действием этого препарата.

Уже через 3 суток в изученных органах животных с ожоговой травмой, которым был введен лактопротеин с сорбитолом (VII экспериментальная группа), в просвете некоторых кровеносных капилляров и венул выявлено аморфное электронноплотное содержимое, которое заполняет весь просвет сосуда и проникает за его пределы через «протекания» и «проникновения». Следует отметить, что общая электронная плотность этого внутрисосудистого содержимого обычно является существенно меньшей, чем плотность цитоплазматического матрикса эритроцитов в сосудистом просвете.

В зонах «проникновений» описанный электронноплотный материал может визуально быть гомогенным и аморфным или гетероморфным (состоять из неодинаково распределенных в аморфном матриксе мелких фибрилл и гранул). Вероятно, такие его структурные трансформации связаны с активностью паравазальных клеток (в случае с тимусом: с фагоцитарной активностью макрофагов и синтетической активностью эпителиоретикулоцитов). Результатом совместной деятельности эндотелиоцитов и паравазальных клеток органов является формирование специфических внутриорганых мембраноподобных структур у животных только и исключительно VII экспериментальной группы.

Паравазальный характер расположения отмеченного электронноплотного материала свидетельствует, что его появление связано со спецификой транспорта компонентов лактопротеина с сорбитолом после ожоговой травмы через «протекания» сосудистой стенки, которые они четко декорируют. За счет этого контуры межэндотелиальных щелей выглядят будто нарисованными черной краской. Можно было бы сказать, что в результате структурной реорганизации составляющих лактопротеина с сорбитолом стенка кровеносных капилляров и венул становится многослойной (несколько слоев вновь образованных мембран и кооперированных клеток) и многокомпонентной (отличающиеся по своей ультраструктуре мембраны и клетки).

Однако «протекания» являются разнообразными по форме, величине и степени распространения в паренхиме (рис.1). В связи с изложенным стоит говорить о формировании «специфического мембраноподобного

комплекса» с многообразными механическими и барьерными функциями, которые не только обеспечивают восстановление целостности (более того, укрепление) сосудистой стенки, но и существенно изменяют характер коммуникативных внутриорганных и межорганных клеточных и гуморальных взаимоотношений.

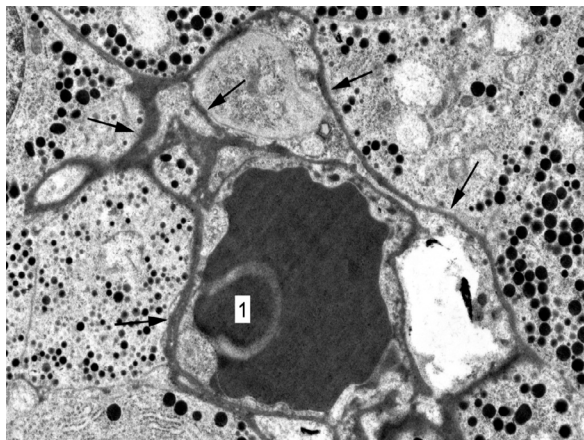


Рисунок 1. – «Специфический внутриорганный мембраноподобный комплекс» (отмечен стрелочками) в аденогипофизе крысы через 7 суток развития ожоговой болезни при условии введения лактопротеина с сорбитолом. 1 – эритроцит в просвете кровеносного капилляра. Ув. 10000

Специфические мембраноподобные структуры в аденогипофизе, корковом веществе надпочечников, тимусе не являются временными реактивными образованиями, которые исчезают через некоторое время после инфузии лактопротеина с сорбитолом (последняя осуществляется лишь на протяжении 7 суток). Отдельные описанные специфические мембраноподобные структуры объединяются и отделяют группы (кластеры) клеток, способствуют их изоляции от остальных клеток изученных органов и, возможно, либо обеспечивают их защиту от вредных влияний цитотоксических факторов, либо отделяют клетки с необратимыми повреждениями (своеобразная секвестрация). Клетки, которые объединены в кластеры (по 3-12 клеток), характеризуются сохранностью структур цитоплазмы и ядра (рис. 2) или подвержены апоптозным и некротическим изменениям (рис. 3).

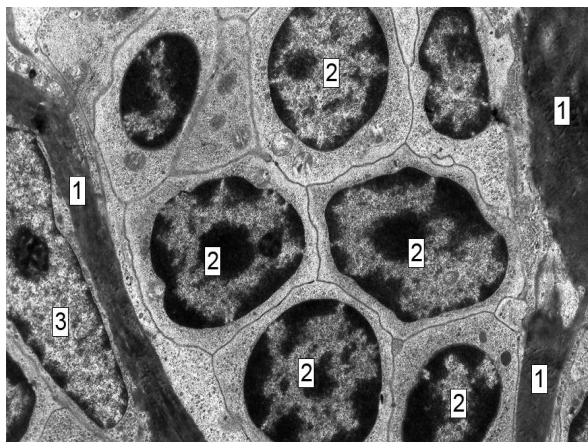


Рисунок 2. – Кластер тимоцитов, окруженный мембраноподобной структурой, в тимусе крысы через 14 суток развития ожоговой болезни при условии введения лактопротеина с сорбитолом. 1 – специфическая мембраноподобная структура; 2 – ядро тимоцита; 3 – ядро эпителиоретикулоцита. Ув. 14000

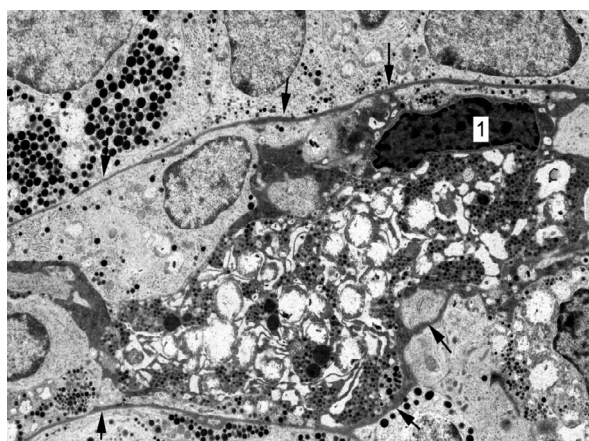


Рисунок 3. – Кластер эндокриноцитов, окруженный мембраноподобной структурой (отмечена стрелочками) в аденогипофизе крысы через 14 суток развития ожоговой болезни при введении лактопротеина с сорбитолом. 1 – ядро апоптозного эндокриноцита. Ув. 7000

Через 21 и 30 суток эксперимента специфические мембраноподобные структуры в сосудистой стенке, а также в паренхиме изученных органов образуют разветвленные мембраноподобные комплексы, в ячейках которых локализованы типичные для каждого органа клетки, имеющие признаки морфологической нормы (рис. 4). Таким образом, ангиопротекторное и цитопротекторное влияние лактопротеина с сорбитолом на структуру аденогипофиза, коркового вещества надпочечников и тимуса при ожоговой травме является длительным, но парадоксальным. Парадокс действия лактопротеина с сорбитолом заключается в том, что большинство клеток паренхимы органов в ячейках мембраноподобного комплекса на протяжении всего срока после ожоговой травмы остаются структурно сохраненными, в то время когда цитоархитектоника каждого органа становится существенно другой.

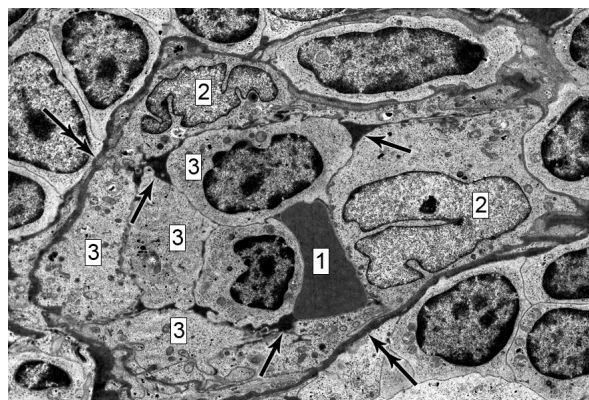


Рисунок 4. – Мембраноподобная структура в стенке вены тимуса крысы через 21 сутки развития ожоговой болезни при введении лактопротеина с сорбитолом. Стрелочками отмечена мембраноподобная структура между эндотелиоцитами. Двойными стрелочками отмечена мембраноподобная структура в зоне базальной мембраны вены. 1 – эритроцит в просвете вены; 2 – ядро эндотелиоцита; 3 – цитоплазма эндотелиоцита. Ув. 6000.

Выводы

1. Общим проявлением патоморфологических изменений в аденогипофизе, корковом веществе надпочечников и тимусе при ожоговой болезни является

альтерация функционально разных клеток органов и стенок сосудов гемомикроциркуляторного русла на фоне выраженного паравазального и межклеточного отека.

2. Существенным фактором развития отека и кровоизлияний в аденогипофизе, корковом веществе надпочечников и тимусе при ожоговой болезни является образование сквозных трансмуральных дефектов в стенке кровеносных сосудов («протеканий») и соответствующих внутриорганных межклеточных расширений («проникновений»), маркером которых является электронноплотный лактопротеин с сорбитолом.

3. Лактопротеин с сорбитолом и HAES-LX-5% при условии развития ожоговой болезни проявляют цито- и ангиопротекторные свойства, тормозят развитие отека, предупреждают появление кровоизлияний и альтерацию клеток, способствуют репарации органов.

4. Мембранопластический эффект лактопротеина при ожоговой болезни зарегистрирован у крыс.

5. Лактопротеин с сорбитолом при условиях развития ожоговой болезни проявляет мембранопластические свойства, которые заключаются в образовании в зонах «протеканий» и «проникновений» системы взаимосвязанных мембраноподобных структур. Эти структуры отличаются гетерогенностью и гетероморфностью.

6. Появление системы мембраноподобных структур в аденогипофизе, корковом веществе надпочечников и тимусе при ожоговой болезни при условии применения инфузии лактопротеина с сорбитолом приводит к конформативным изменениям стенки сосудов гемомикроциркуляторного русла, а также к отделению и изоляции кластеров клеток, а следовательно – к развитию «новой цитоархитектоники».

что неизбежно должно привести к существенной модификации деятельности нейроиммуноэндокринной системы.

Заключение

Обобщая, можно сказать, что терапевтическое действие примененных гиперосмолярных растворов в условиях появления зон «протекания» и «проникновения» в изученных органах нейроиммуноэндокринной системы при ожоговой болезни не ограничивается эффектами (дезинтоксикационным, реологическим, протившоковым) их собственно инфузионного влияния, но и проявляется их цитопротекторным и ангиопротекторным эффектами, которые обусловлены возможностями привлечения компонентов растворов для репаративных (а в широком смысле – пластических) потребностей органа. Особенностью лактопротеина с сорбитолом является то, что он, благодаря своей электронной плотности, маркирует зоны «протекания» и «проникновения», в которых компоненты раствора достаточно быстро подлежат активной переработке и/или модификации за счет синтезирующей активности клеток сосудистой стенки и прилежащих клеток. Свойства раствора HAES-LX-5% как маркера зон «протекания» и «проникновения» в изученных органах не являются достаточно выраженными, но показатели летальности и результаты проведенного морфологического анализа свидетельствуют, что он, как цито- и ангиопротектор, действует эффективно и гармонично, не вызывая существенных изменений органной цитоархитектоники.

Перспектива дальнейших исследований в данном направлении заключается в изучении изменений иммунологических показателей организма животных при экспериментальной ожоговой травме кожи при условии применения инфузии лактопротеина с сорбитолом и HAES-LX-5%.

Литература

1. Акмаев, И. Г. От нейроэндокринологии к нейроиммуноэндокринологии / И. Г. Акмаев, В. В. Гриневиц // Бюл. экспер. биол. - 2001. - Т. 131, № 1. - С. 22-32.
2. Кветной, И. М. Нейроиммуноэндокринология тимуса / И. М. Кветной, А. А. Ярыгин, В. О. Полякова, И. В. Князькин. – СПб: Издательство ДЕАН, 2005. – 160 с.
3. Фещенко, Ю. И. Инфузионная терапия в клинике внутренних болезней / Ю. И. Фещенко, Н. И. Гуменюк // Укр. хіміотерапевт. журн. - 2008. - № 1-2(22). - С. 1-5.
4. Atiyeh B. S. State of the art in burn treatment / B. S. Atiyeh, S. W. Gunn, S. N. Hayek // World J. Surg. - 2005. - Vol.29. - P. 131-148.
5. D'Elia M. T cells from burn-injured mice demonstrate a loss of sensitivity to glucocorticoids / M. D'Elia, J. Patenande, C. Dupras, J. Bernier // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. - 2010. - Vol.299. - P. 299-307.
6. Demling R. H. Burns: what are the pharmacological treatment options / R. H. Demling // Crit. Care Med. - 2008. - Vol.9. - P. 1895-1908.
7. Kamel E. Neuroendocrinology of stress / E. Kamel, M. Habib, W. Philip // Endocrinology and Metabolism Clinics. - 2001. - Vol.30 (3) - P. 1-18.
8. Kamolz L.-P. Burns: learning from the past in order to be fit for the future / L.-P. Kamolz // Critical Care. - 2010. - Vol.14 - P. 106-110.
9. Keck M. Pathophysiology of burns / M. Keck, D. Ytrdon, L.-P. Kamolz // Wien Med. Wochenschr. - 2009. - Vol.159 - P. 327-336

Literatura

1. Akmaev, I. G. Ot nejroendokrinologii k nejroimmunoendokrinologii / I. G. Akmaev, V. V. Grinevich // Byul. eksper. biol. - 2001. - T. 131, № 1. - S. 22-32.
2. Kvetnoj, I. M. Nejroimmunoendokrinologiya timusa / I. M. Kvetnoj, A. A. Yarygin, V. O. Polyakova, I. V. Knyazkin. – SPB: Izdatelstvo DEAN, 2005. – 160 s.
3. Feshhenko, Yu. I. Infuzionnaya terapiya v klinike vnutrennix boleznej / Yu. I. Feshhenko, N. I. Gumenyuk // Ukr. ximioterapevt. zhurn. - 2008. - № 1-2(22). - S. 1-5.
4. Atiyeh B. S. State of the art in burn treatment / B. S. Atiyeh, S. W. Gunn, S. N. Hayek // World J. Surg. - 2005. - Vol.29. - P. 131-148.
5. D'Elia M. T cells from burn-injured mice demonstrate a loss of sensitivity to glucocorticoids / M. D'Elia, J. Patenande, C. Dupras, J. Bernier // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. - 2010. - Vol.299. - P. 299-307.
6. Demling R. H. Burns: what are the pharmacological treatment options / R. H. Demling // Crit. Care Med. - 2008. - Vol.9. - P. 1895-1908.
7. Kamel E. Neuroendocrinology of stress / E. Kamel, M. Habib, W. Philip // Endocrinology and Metabolism Clinics. - 2001. - Vol.30 (3) - P. 1-18.
8. Kamolz L.-P. Burns: learning from the past in order to be fit for the future / L.-P. Kamolz // Critical Care. - 2010. - Vol.14 - P. 106-110.
9. Keck M. Pathophysiology of burns / M. Keck, D. Ytrdon, L.-P. Kamolz // Wien Med. Wochenschr. - 2009. - Vol.159 - P. 327-336

10. Sherren P. B. Acute burn induced coagulopathy / P. B. Sherren // Burns. - 2013. – Vol.39, № 6 - P. 1157-1161.

10. Sherren P. B. Acute burn induced coagulopathy / P. B. Sherren // Burns. - 2013. – Vol.39, № 6 - P. 1157-1161.

ULTRASTRUCTURE OF BLOOD VESSELS IN THE ORGANS OF NEUROIMMUNOENDOCRINE SYSTEM DURING EXPERIMENTAL BURN DISEASE IN RATS AND ITS TREATMENT WITH COMBINED HYPEROSMOLAR SOLUTIONS

Cherkasov E.V., Dzevulska I.V., Kovalchuk A.I.

National O.O. Bohomolets Medical University, Kiev, Ukraine

Selecting of combined hyperosmolar solutions for infusion therapy of burn disease remains one of the most topical problems of modern combustiology. We studied structural changes in blood vessels of adenohipophysis, adrenal cortex and thymus in experimental burn disease in rats and its treatment with combined hyperosmolar solutions by means of electron microscopy. It was established that hyperosmolar solutions administered intravenously acted as vascular wall protectors and lactoprotein-C initiated membranoplastic influence on organ structure.

Key words: burn disease, adenohipophysis, adrenal cortex, thymus, blood vessels, electronic microscopy.

Адрес для корреспонденции: e-mail: timur_x007@i.ua

Поступила 18.02.2014