

О.Ю.Потоцкая¹
А.С.Лапсарь²

¹ ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

² КУ «Запорожское областное патологоанатомическое бюро» ЗОС

Ключевые слова: гемолимфатические узлы, макрофаги, эритрофагоцитоз, липофусцин, гемосидерин, гистиоциты морской синовии, меланомакрофаги.

Надійшла: 17.02.2016

Прийнята: 19.03.2016

УДК [611.42+612.1]:611.018

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПАНКРЕАТОЛИЕНАЛЬНЫХ ГЕМОЛИМФОУЗЛОВ ЧЕЛОВЕКА

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Нормальный и аномальный морфогенез компонентов сердечно-сосудистой системы человека и экспериментальных животных» (номер государственной регистрации 0114U005592).

Реферат. С помощью стандартных гистологических, а также гистохимических методов для выявления железа, липофусцинов и компонентов желчи, были исследованы панкреатолиенальные гемолимфатические узлы (ГЛУ) человека. Установлено, что к ГЛУ притекает смесь крови и лимфы; в ходе циркуляции через систему синусов все эритроциты разрушаются путем фагоцитоза макрофагами. Железо, высвобождающееся в результате расщепления гемоглобина, макрофаги выделяют в окружающую их среду, а непереващенные мембраны эритроцитов, подверженные перекисному окислению липидов, накапливаются внутри клеток в виде липофусцина.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 1. – С. 77-86.

© О.Ю.Потоцкая, А.С.Лапсарь, 2016

✉ Pototskaya.o.yu@gmail.com

Pototska O.Yu., Lapsar H.S. Peculiarities of human pancreatolienal hemolymph node structure and cellular composition.

ABSTRACT. Background. Hemolymph nodes (HLNs) are well described in animals, while in humans they are still poorly characterized; little is known about the role of HLNs in red blood cells destruction, erythropoiesis, iron metabolism etc. **Objective.** To determine the peculiarities of HLN structure and cellular composition. **Methods.** Pancreatolienal HLNs were taken during autopsy from patients who died due to cardiovascular or respiratory pathology. Standard histological and histochemical methods were used to detect iron, bile components, lipofuscin. **Results.** Inside afferent vessels of HLNs equal numbers of red and white blood cells were found. The same ratio was in subcapsular and cortical sinuses, while in medullary sinus erythrocytes were absent. Some RBCs enter lymphoid follicles through opened blood capillaries. Inside HLNs parenchyma large lipofuscin-laden cells are frequently observed, by their staining properties they resemble sea-blue histiocytes found under normal circumstances in red bone marrow. **Conclusions.** HLNs receive mixture of blood and lymph; during circulation through the system of sinuses all erythrocytes are destroyed via phagocytosis by local macrophages. During hemoglobin degradation these macrophages release iron outside, but undigested membranes of RBCs undergo lipid peroxidation giving rise to lipofuscin stored inside the cell.

Key words: hemolymph nodes, macrophages, erythrophagocytosis, lipofuscin, hemosiderin, sea-blue histiocytes, melanomacrophages.

Citation:

Pototska OYu, Lapsar HS. [Peculiarities of human pancreatolienal hemolymph node structure and cellular composition]. Morphologia. 2016;10(1):77-86. Russian.

Введение

В синусах некоторых лимфоузлов в норме циркулируют эритроциты. В зависимости от типа притекающей жидкости эти узлы разделяют на гемальные, получающие только кровь, и гемолимфатические (ГЛУ), получающие дополнительно приток лимфы. В экспериментах на крысах было продемонстрировано, что внутривенное введение частиц угля приводит к их появлению в синусах гемолимфатических, но не обычных лимфоузлов [1]. В той же работе была определена

на способность ГЛУ к продукции антител, и по совокупности полученных данных был сделан вывод о том, что ГЛУ относятся к промежуточной форме лимфоидных органов между селезенкой и обычными ЛУ. Исследованию этих узлов у различных видов животных посвящено много работ [1-5], в то время как у человека они малоизучены. Открытыми остаются вопросы участия гемальных и гемолимфатических узлов человека в элиминации дефектных эритроцитов, миелопозе, обмене железа и др.

Цель – определить особенности строения и клеточного состава ГЛУ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили ГЛУ умерших вследствие соматических заболеваний (инфаркт миокарда, расслоение и разрыв аорты, бактериальная пневмония). Материал фиксировали в нейтральном забуференном формалине, обезжовивали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Для изучения гистологического строения гемолимфатических узлов на светооптическом уровне срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином в соответствии с общепринятой методикой, а также применяли ряд описанных ниже способов окрашивания.

Окрашивание азуром В – эозином У по Романовскому производили с использованием готового красителя (ООО «МиниМед», РФ) в соответствии с описанной методикой [6]. Для этого готовили красящий раствор из расчета 1 мл красителя на 9 мл дистиллированной воды, окрашивали срезы в термостате при 37°C в течение 1 ч, тщательно промывали в водопроводной воде и дифференцировали в воде, подкисленной уксусной кислотой. Затем срезы промывали, доводили дифференцировку до конца 96%-ным этанолом, отжимали фильтровальной бумагой, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол.

Окрашивание реактивом Шиффа-йодной кислотой по McManus [7]. Депарафинированные срезы доводили до дистиллированной воды, окисляли 0,5%-ным водным раствором йодной кислоты в течение 3-5 мин, промывали в дистиллированной воде и обрабатывали реактивом Шиффа в течение 10-15 мин. Затем промывали в проточной воде 5-10 мин и докрашивали гематоксилином, обезжовивали в спиртах, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол.

Выявление гемофусцина по Mallory [8]. Депарафинированные срезы доводили до воды, окрашивали в течение 5-10 мин в квасцовом гематоксилине, тщательно промывали в воде, затем окрашивали 5-15-20 мин в 0,5%-ном растворе основного фуксина в равных объемах дистиллированной воды и 96%-ного этанола. Срезы промывали в воде, дифференцировали в 96%-ном этаноле, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол.

Окрашивание суданом чёрным В по McManus [9]. Депарафинированные срезы окрашивали насыщенным раствором судана черного В в 70%-ном этаноле, удаляли избыток красителя быстрым ополаскиванием в 70%-ном спирте, промывали в проточной воде и, опуская этап докрашивания кармином, заключали в глицерин.

Окрашивание нильским голубым по Lillie [7; 9]. Депарафинированные срезы доводили до воды, окрашивали в течение 20 мин 0,05%-ным раствором нильского голубого в 1%-ной серной

кислоте, промывали в проточной воде 10-20 мин и заключали в глицерин.

Методика выявления Fe^{2+} и Fe^{3+} по Lillie [7; 8]. Депарафинированные срезы доводили до дистиллированной воды, инкубировали в растворе 400 мг ферроцианида калия (для выявления Fe^{3+}) либо 400 мг феррицианида калия (для выявления Fe^{2+}) в 40мл 0,5%-ной соляной кислоты в течение 30 мин. Затем промывали в дистиллированной воде, обезжовивали в спиртах, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол.

Методика выявления Fe^{2+} с помощью раствора ортофенантролина. Основой для примененной нами методики послужила методика, описанная *Hukill and Putt* [7; 8]. Депарафинированные срезы доводили до дистиллированной воды, инкубировали в растворе ортофенантролина (100 мг ортофенантролина в 100 мл 3%-ного водного раствора уксусной кислоты) в термостате при 60°C в течение 2 ч, затем тщательно промывали в дистиллированной воде, докрашивали метиленовым синим, высушивали, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол.

Реакция с йодом на желчные пигменты по Stein [9]. Депарафинированные срезы доводили до воды, обрабатывали йодным реактивом (2 части раствора Люголя на 1 часть 10% спиртового раствора йода), промывали в проточной воде, обесцвечивали в 5%-ном водном растворе тиосульфата натрия, промывали в проточной воде, высушивали и, опуская этап докрашивания кармином, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол.

Методика выявления желчных пигментов по Fouchet в модификации Hall [7]. Депарафинированные срезы доводили до дистиллированной воды, окрашивали в течение 10 мин в растворе *Fouchet* (свежеприготовленная смесь 36 мл 25%-ной водной трихлоруксусной кислоты и 4 мл 10% водного раствора хлорида железа III). Далее срезы тщательно промывали в нескольких сменах дистиллированной воды (опуская этап докрашивания по *Van Gieson*), просветляли в ксилоле и заключали в полистирол.

Результаты и их обсуждение

Существует несколько предположений относительно того, каким образом эритроциты попадают в синусы лимфоузлов. Некоторые авторы, анализируя сканирующие электронные микрофотографии гемальных узлов быка, предположили наличие открытых капилляров, которые приносят кровь в субкапсулярный синус и непосредственно в лимфоидную ткань коркового вещества ГЛУ [10]. Далее, согласно этой модели, клетки крови собираются из синусов в воротную вену и таким образом покидают ГЛУ. По данным исследований ГЛУ крысы, эритроциты попадают в субкапсулярный синус ГЛУ из приносящих сосудов путем диапедеза через стенку кровеносных капилляров лимфоидной ткани коры, плотно

прилегающих к выстилке синуса [11]. Эта модель также предполагает наличие небольшого числа приносящих лимфатических сосудов и одного выносящего, расположенного в области ворот. Именно этот факт дает основания называть такие узлы не гемальными, а гемолимфатическими. Также имеются данные, что ГЛУ получают эритроциты из лимфатических сосудов, куда они попадают в близлежащих органах. Примером может служить селезенка, в паренхиме которой экстравазально присутствует большое количество эритроцитов, которые могут попадать в высокопроницаемые эфферентные лимфатические сосуды [12]. В экспериментах на крысах спленэктомия и лигирование сосудисто-нервного пучка селезенки приводили к побледнению ГЛУ и исчезновению из них красных клеток крови [13; 14]. В то же время при этих условиях не происходило атрофии ГЛУ, что свидетельствует о наличии дополнительных путей притока лимфы к ним. Здесь следует отметить, что в нашем исследовании был представлен один случай наблюдения ГЛУ у пациента со спленэктомией в анамнезе. Но, в отличие от экспериментальных работ, мы наблюдали увеличение количества панкреатолиенальных ГЛУ, а также их размеров; изменений содержания эритроцитов в синусах ГЛУ по сравнению с нормой не наблюдалось. Конечно же, единичное наблюдение нельзя противопоставлять тщательно спланированному эксперименту, но подобное расхождение результатов требует дальнейших исследований в этом направлении. Другим примером может быть исследование лимфатических сосудов почки крысы, сопровождающих междольковые, аркуатные, междольковые и воротные артерии, в которых были обнаружены эритроциты [15]. Клетки крови попадали в лимфу путем диапедеза из перитубулярных капилляров и вен; на основании этих данных было сделано предположение, что основным предназначением ГЛУ является отделение лимфы от крови.

По нашим наблюдениям, приток к ГЛУ обеспечивается сосудами со смешанным содержанием (приблизительно равное количество эритроцитов и лейкоцитов, рис. 1А), что отрицается в некоторых работах [11]. Из субкапсулярного синуса гемолимфа устремляется в корковый, но уже в мозговом синусе из нее исчезают эритроциты, что свидетельствует о наличии механизма их фильтрации и согласуется с наблюдениями других исследователей [11]. Эритроциты также встречаются в виде скоплений внутри некоторых лимфоидных узелков ГЛУ; в отдельных случаях эти участки напоминают очаговые кровоизлияния. На гистологических препаратах в этих зонах также выявляются единичные открытые капилляры (рис. 1В), из которых эритроциты выходят в паренхиму коркового вещества, что дает основания утверждать о наличии допол-

нительного источника крови ГЛУ в виде приносящих артерий. Но, поскольку эритроциты обнаруживаются далеко не во всех фолликулах, этот источник не может считаться основным. Нельзя также исключать возможность проникновения части эритроцитов в фолликулы ГЛУ из синусов, поскольку ретикулоэндотелиоциты не образуют непрерывной выстилки последних. Специалисты предполагают неселективное уничтожение абсолютно всех эритроцитов ГЛУ, как в синусах, так и в лимфоидной ткани, за счет эритрофагоцитоза макрофагами [11], что подкреплено высококачественными электронограммами этого процесса. Учитывая высокую проницаемость венул с высоким эндотелием, можно также предположить существование механизма возврата эритроцитов из фолликулов ГЛУ в кровеносное русло путем диапедеза. Для того чтобы выяснить, является ли функция эритрофагоцитоза отличительной особенностью ГЛУ, в серии экспериментов на крысах была проведена ауто трансплантация фрагмента селезенки в мезентериальные лимфоузлы [16]. В результате макрофаги лимфоузла активно уничтожали аутологичные эритроциты, имитируя функцию и морфологию ГЛУ.

Известно, что ретикулоэндотелиальная система обеспечивает большую часть суточной потребности в железе за счет переработки гемоглобина «состарившихся» эритроцитов [17]. Наиболее действенными в этом отношении являются макрофаги селезенки, печени и красного костного мозга, что было определено путем измерения активности ключевого фермента утилизации гемоглобина – гемоксигеназы [18]. При воспалительных реакциях классически активированные макрофаги (M1) секвестрируют «добытое» из гема железо в своей цитоплазме при помощи ферритина с целью снижения доступа к этому микроэлементу патогенной флоры [19]. Альтернативно активированные макрофаги (M2), напротив, активно разрушают гем и продуцируют железо в окружающую их среду при помощи ферропортинов; такой алгоритм характерен для процессов регенерации, ангиогенеза, клеточного роста и т.п.

Информация о гемоксигеназной активности макрофагов ГЛУ практически отсутствует в литературе, так же, как и анализ роли ГЛУ в обмене железа. В то же время некоторые авторы обращали внимание на отложения железа в паренхиме ГЛУ и внутри его фагоцитов, но при этом не все верифицировали подобные наблюдения гистохимическими методами [13; 20]. В ГЛУ человека нами также часто обнаруживались крупные макрофаги, переполненные гранулами желто-коричневого пигмента (рис. 1С). Учитывая активное участие ГЛУ в разрушении эритроцитов, было сделано предположение, что данный пигмент относится к железосодержащим и, вероятнее всего, является гемосидерином.

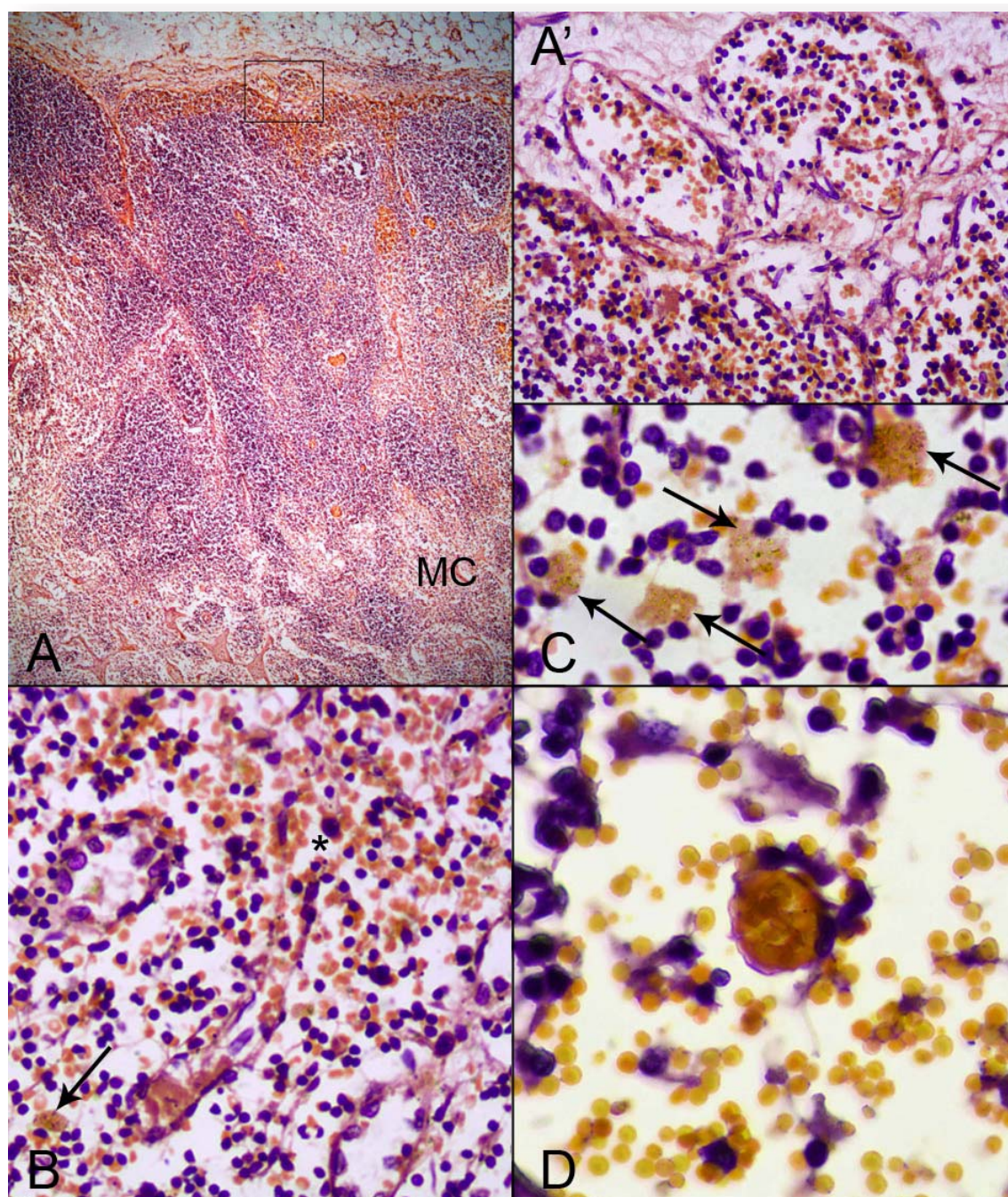


Рис. 1. Панкреатолиенальный гемолимфоузел человека. А' – увеличенный фрагмент, выделенный на А. А. Срез ГЛУ, демонстрирующий основные синусы. На выделенном фрагменте (А') видны приносящие сосуды и субкапсулярный синус, содержащие равные количества лейкоцитов и эритроцитов. В мозговом синусе (МС) эритроциты отсутствуют. В. Фрагмент лимфатического фолликула ГЛУ с открытым капилляром (отмечен звездочкой). С. Фрагмент ГЛУ, содержащий группу макрофагов, заполненных желтым пигментом. D. Участок кортикального синуса ГЛУ в котором видна группа плотно расположенных эритроцитов, окруженных тонким слоем базофильной цитоплазмы. Также заметен анизоцитоз, который обусловлен спленэктомией у данного пациента. Стрелками обозначены макрофаги, переполненные желто-коричневыми гранулами. Окраска гематоксилином и эозином. А ×100; А', В ×200; С, D ×1000.

Подтверждение факта секвестрации железа в цитоплазме клеток помогло бы выяснить их принадлежность к M1 или M2 типу. С этой целью были проведены гистохимические реакции по *Lillie* на трехвалентное и двухвалентное железо (с желтой и красной кровяной солью соответственно). Обе реакции были отрицательными, и

цвет гранул макрофагов оставался неизменным, в то время как внеклеточные депозиты железа (обнаруженные у пациентов с расслоением и разрывом аорты) давали выраженную положительную реакцию в обоих случаях. Следует также отметить, что в паренхиме ГЛУ, особенно в мозговых синусах, а также в стенках сосудов

наблюдались внеклеточные гранулы размером 3-4 мкм, по своему цвету сходные с таковыми внутри макрофагов; они также не давали позитивной реакции на железо. Еще одним интересным обнаружением были макрофаги с темно-коричневыми гранулами (1-2 мкм в диаметре), которые наблюдались внутри выносящих сосу-

дов ГЛУ. В отличие от уже упомянутых нами клеток с желто-коричневым пигментом, они были нормальных размеров и содержали намного меньше включений, что позволяло идентифицировать округлое ядро. Гранулы этих клеток также не вступали в реакцию с желтой и красной кровяными солями (рис. 2 А, С).

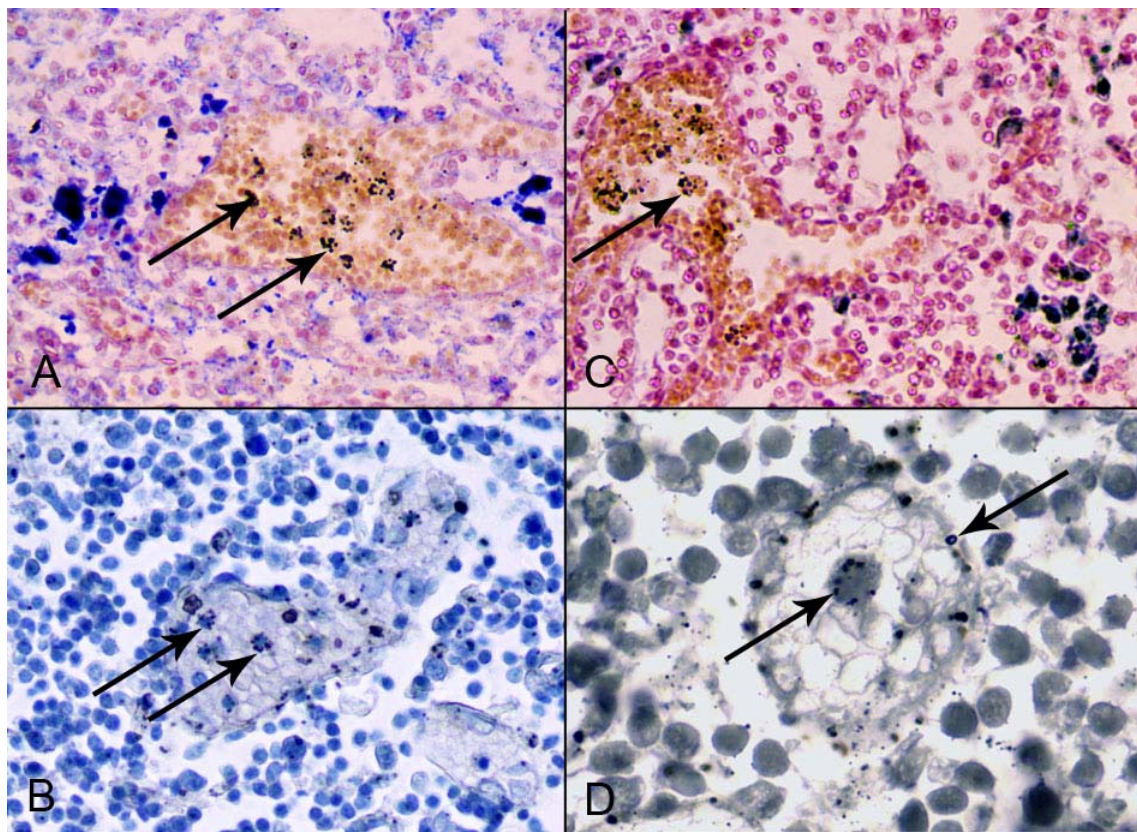


Рис. 2. Сосуды мозгового вещества ГЛУ, содержащие лейкоциты с большим количеством гранул. Стрелками обозначены гранулы внутри лейкоцитов и в стенке сосуда (D). Окраска: А, С – методика на выявление Fe^{3+} и Fe^{2+} по Lillie, соответственно; В – нильский голубой; D – судан черный В. А-С $\times 400$; D $\times 1000$.

Поскольку при постановке реакций на железо эритроциты оставались неокрашенными, не смотря на большое содержание гема, с целью демаскировки железа (как гема, так и гемосидерина) была проведена дополнительная предобработка срезов 10% перекисью водорода при температуре $60^{\circ}C$, а также повышена температура проведения самой реакции по Lillie. В результате крупные макрофаги окрашивались в ярко-голубой цвет, сопоставимый по оттенку и насыщенности с окраской эритроцитов (рис. 3А), но их гранулы, как и сходные с ними внеклеточные депозиты, сохраняли желтый цвет (рис. 3В). Важно уточнить, что изменение фокуса наблюдения приводило к визуальному эффекту смены цвета гранул – те из них, которые оказывались перед, или за фокусом, казались коричневыми и синими соответственно. Этот эффект может привести к ложному выводу о положительной реакции при наблюдениях на малых увеличениях.

Для верификации селективности этой реакции в цитоплазме макрофагов и эритроцитов была дополнительно использована реакция с ортофенантролином для выявления двухвалентного железа. Но как с предобработкой, так и без нее эритроциты окрашивались достаточно плохо, что свидетельствовало о нарушении избирательности реакции с красной кровяной солью по Lillie при повышении температуры. Следует также заметить, что кирпично-красный цвет, проявляющийся в результате реакции с ортофенантролином, мало отличим от натурального цвета железосодержащих пигментов, что снижает его значимость в данном исследовании.

Таким образом, на основании комплекса гистохимических методов было сделано заключение, что внутриклеточный пигмент макрофагов и сходные с ним внеклеточные депозиты ГЛУ не содержат железа. Поскольку вторым продуктом распада гема, который экспортируют

макрофаги, является биливердин, мы провели две гистохимические реакции – по *Fouchet* в модификации *Hall*, а также по *Stein*, - для выявле-

ния желчных пигментов; обе они оказались отрицательными.

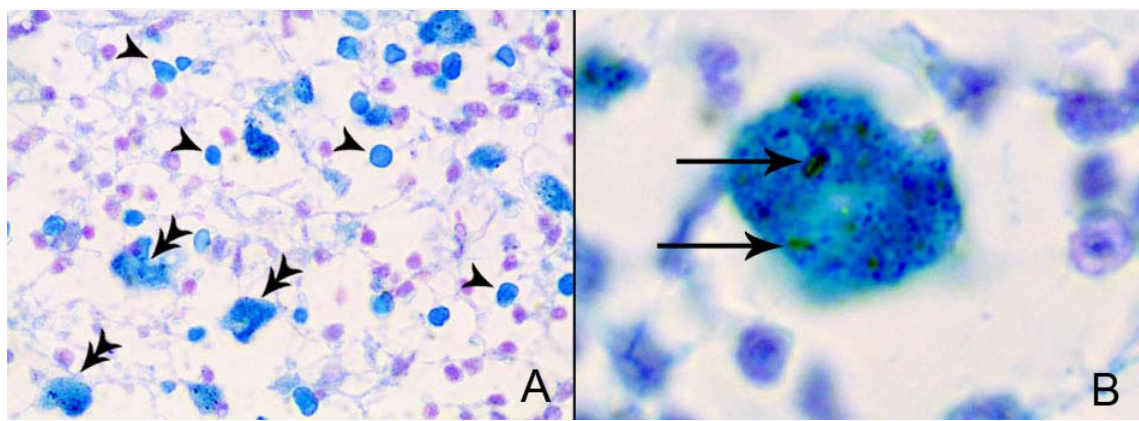


Рис. 3. Участок коркового вещества ГЛУ, содержащий свободные эритроциты. Макрофаги, переполненные пигментом, указаны двойными головками стрелок; эритроциты – одинарными. Стрелками на В показаны желтые гранулы макрофагов, различные на фоне голубой цитоплазмы. Окраска с использованием красной кровяной соли в модификации, описанной в тексте. А×400; В ×1000.

Следующее предположение состояло в липидной природе пигмента макрофагов, соответственно этому были проведены окрашивания нильским голубым, суданом черным В, гематоксилином-основным фуксином по *Mallory*, и по методу ШИК в модификации *McManus* для выявления гранул липофусцина (рис. 4). На этот раз реакции были положительными. Наиболее показательной была окраска с суданом черным В, которая проявлялась уже в первые минуты (еще до реакции эритроцитов) (рис. 4D). Она позволила выявить в цитоплазме крупных макрофагов разные по диаметру гранулы, которые отличались также и по интенсивности окраски, что свидетельствует о гетерогенности природы их содержимого. Также многие макрофаги демонстрировали бухтообразные вдавления довольно крупных размеров, что может свидетельствовать о фагоцитозе крупных частиц (см. рис. 4D). Здесь следует добавить, что в синусах ГЛУ часто обнаруживались группы плотно упакованных эритроцитов, окруженных тонким ободком базофильной цитоплазмы (рис. 1D); иногда такие образования могли достигать 50 мкм в диаметре. Возможно, подобный способ позволяет иммобилизовать эритроциты и способствует их более эффективному поглощению макрофагами.

Как и при других методах, окраска суданом черным В почти никогда не позволяла выявить ядро в исследуемых клетках, поскольку их цитоплазма была плотно заполнена гранулами, а срезы были 5-7 мкм в толщину. Сходные с гранулами макрофагов внеклеточные депозиты, а также гранулы внутрисосудистых макрофагов также приобретали темный цвет при окраске суданом черным В (рис. 2D). Но при детальном рассмотрении в этих гранулах выявлялся светлый центр,

что может свидетельствовать об их высокой плотности и кристаллической природе, которая препятствует проникновению красителя внутрь. Реакция с нильским голубым также демонстрировала разную степень окраски гранул внутри макрофагов, и приводила к потемнению периметра внеклеточных депозитов и гранул внутрисосудистых макрофагов (рис. 4A). Положительным качеством этого метода можно считать разную степень окраски цитоплазмы и гранул, что позволяло довольно четко выявлять последние даже в небольшом количестве (рис. 2B). Метод ШИК по *McManus* приводил к окраске гранул макрофагов и внеклеточных депозитов в розовый цвет, методика по *Mallory* давала более выраженное и контрастное окрашивание гранул основным фуксином (рис. 4 C, F). Следует также отметить, что среди макрофагов ГЛУ встречались клетки, заполненные не желтым, а темно-коричневым и даже черным пигментом; такие гранулы не окрашивались ни одной из представленных методик. Исходя из проведенных наблюдений можно предположить, что пигмент макрофагов на первых этапах имеет желтый цвет, а со временем переходит в коричневый и черный, что сопровождается изменением его химических свойств.

Использованный комплекс реакций позволил сделать заключение о наличии липофусцина в цитоплазме крупных макрофагов и паренхиме ГЛУ, для выяснения причин этого явления мы обратились к анализу литературы. Выяснилось, что некоторые авторы ошибочно идентифицируют желто-коричневый пигмент макрофагов ГЛУ как гемосидерин [13; 14], поскольку ориентируются только на цвет пигмента и не проводят дополнительных гистохимических реакций.

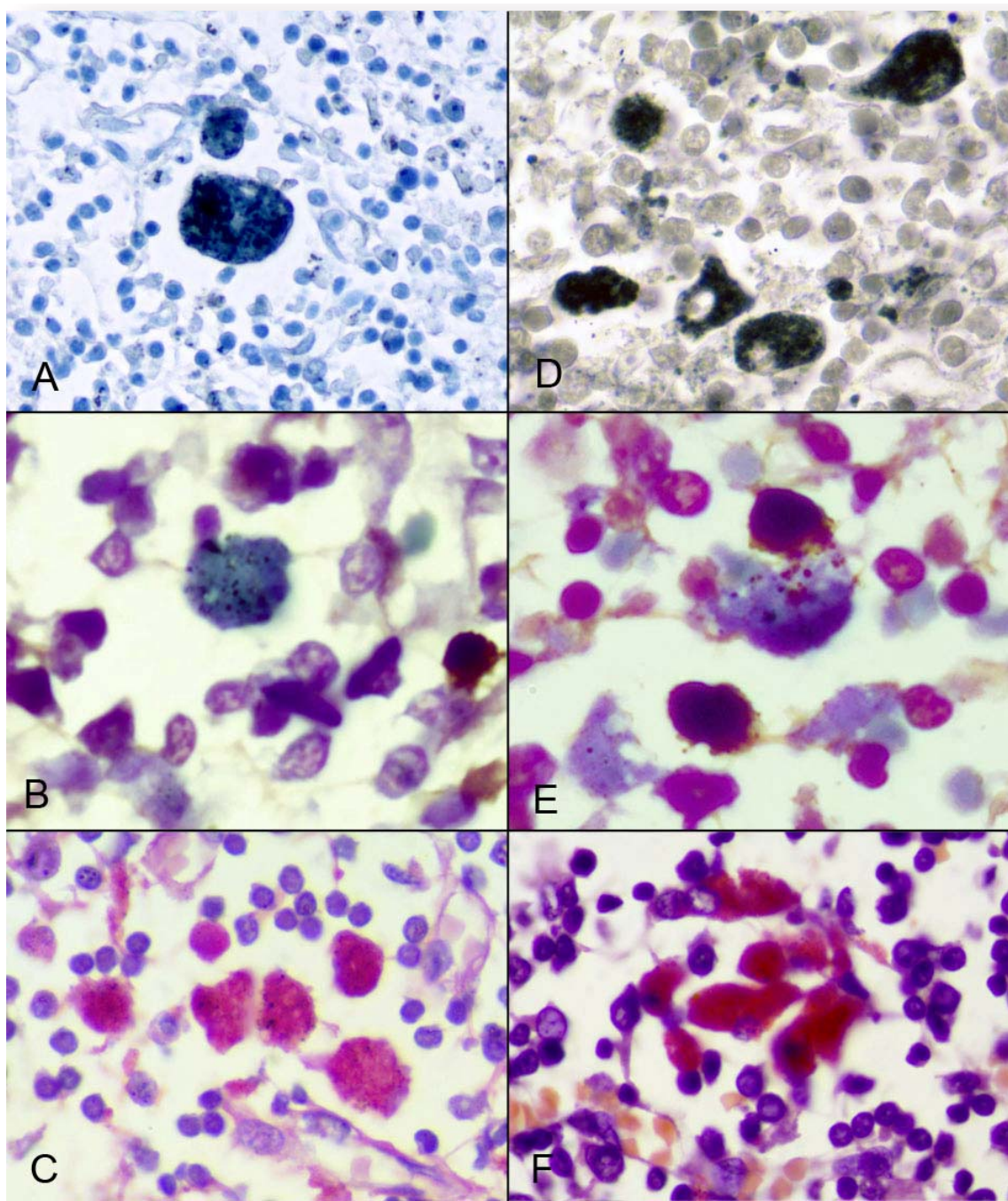


Рис. 4. Макрофаги ГЛУ, заполненные пигментом. В, Е – в центре фотографии клетки, сходные с «гистиоцитами морской синевы»; на Е продемонстрировано взаимодействие такой клетки с эозинофилом – единичное наблюдение у пациента с эозинофилией. Окраска: А – нильским голубым; В, Е – азуром В – эозином Y по Романовскому; С – реактивом Шиффа-йодной кислотой; D – суданом черным В; F – на гемофусцин по Mallory. $\times 1000$.

Похожие по совокупности свойств макрофаги описаны в составе красного костного мозга и часто упоминаются в литературе как «гистиоциты морской синевы» («sea-blue macrophages») по характерному цвету при окраске по Романовскому [21; 22]. Для подтверждения этого предположения мы дополнительно использовали окраску азуром В – эозином Y по Романовскому, в результате которой исследуемые клетки приобрели сине-зеленый цвет (рис. 4 В, Е). В красном

костном мозге гистиоциты морской синевы обнаруживаются в норме и не демонстрируют корреляций с возрастом, или сопутствующей патологией, не смотря на то, что липофусцин обычно идентифицируется как пигмент старения [21]. В других органах подобные клетки выявляются при заболеваниях, связанных с нарушением обмена липидов, как врожденных (например, Болезнь Ниманна-Пика) [23], так и приобретенных (длительное парентеральное питание) [22], что

дало основания выделить синдром «гистиоцитаза морской синевы». Подмечена связь между увеличением количества «гистиоцитов морской синевы» и повышенной клеточностью красного костного мозга, что позволило предположить активное образование липофусцина за счет массового клеточного распада [21; 24]. Принимая во внимание приведенные данные, можно заключить, что наличие липофусцина внутри макрофагов и в паренхиме ГЛУ является следствием массового разрушения эритроцитов, а сам липофусцин представляет собой скопления непереваренных продуктов распада мембран этих клеток крови.

В исследованиях с окклюзией приносящих лимфатических сосудов обычных лимфоузлов также было описано накопление макрофагов, переполненных липофусцином и резидуальными тельцами, при сохраненной нормальной морфологии узлов в целом [25]. Также накопление липофусцина в макрофагах регионарных лимфоузлов было выявлено при хронических заболеваниях печени [26], что свидетельствует о возможных альтернативных, независимых от эритрофагоцитоза, причинах накопления пигмента старения в лимфоузлах. Несмотря на эти наблюдения, макрофаги, переполненные липофусцином, в гемолимфатических узлах встречались намного чаще, чем в обычных, что можно объяснить присутствием большого количества ионов железа, высвобождающихся при распаде гемоглобина. Как известно, двухвалентное железо участвует в реакции образования активированных кислородсодержащих метаболитов (например, реакция Фентона), которые запускают перекисное окисление липидов [27]. Одновременное наличие в фагосомах гистиоцитов большого количества железа и мембран эритроцитов способствует образованию липофусцина, который снижает фагоцитарную активность клеток, поскольку новообразованные ферменты затрачиваются на переваривание липофусцина и не выполняют свою прямую функцию [28]. Отсутствие подобных клеток в селезенке и печени при нормальных условиях, а также их появление в этих органах при патологиях липидного обмена дает основания предположить, что фагоцитарная активность макрофагов ГЛУ несколько ниже, либо «эритроцитарная нагрузка» в перерасчете на один макрофаг в ГЛУ выше. Следует также уточнить, что использованный в настоящем исследовании материал был в основном получен от пациентов пожилого возраста, у которых могут наблюдаться возрастные снижения числа моноцитов и активности их ферментов, хотя ни в селезенке, ни в печени этих пациентов клетки, переполненные липофусцином, не обнаруживались.

В плазме здоровых людей в норме содержится свободный гемоглобин (до 5 мг/дл), что свидетельствует о внутрисосудистом гемолизе,

как способе уничтожения части обработанных эритроцитов. Также продемонстрирована более высокая чувствительность к гемолизу у старых эритроцитов, по сравнению с молодыми [29]. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что полная элиминация эритроцитов из синусов ГЛУ может происходить не только за счет эритрофагоцитоза, но также и благодаря созданию условий микроокружения, способствующих гемолизу.

В ретикулоэндотелиальной ткани лимфоидных органов костных рыб отсутствуют герминативные центры, но описаны меланомакрофагические, которые представляют собой агрегаты макрофагов, переполненных липофусцином, гемосидерином и меланином. Учитывая сходные иммуногистохимические характеристики, а также способность к захвату комплексов антиген-антитело, некоторые ученые полагают, что подобные макрофаги являются гомологами фолликулярных дендритных клеток, а их агрегаты – гомологами герминативных центров кроветворных органов [30]. Вероятно, что в ходе филогенеза произошло разграничение клеточных линий макрофагов, активно фагоцитирующих эритроциты, и дендритных клеток, которые презентуют антигены лимфоцитам. Сочетание этих функций в одной клетке малоэффективно, так как известно, что гематопорфирины и продукты деградации гемоглобина вызывают перекисное окисление липидов и угнетают презентацию антигена в дозозависимой форме [31]. Интересно отметить, что меланомакрофаги обнаруживаются в кроветворных органах рыб – селезенке и почках, и именно около этих органов чаще всего располагаются ГЛУ у человека. Наблюдаемые нами клетки ГЛУ содержали в основном желтый пигмент, но в некоторых случаях также присутствовали коричневые гранулы. Для уточнения наличия меланина при окраске нильским голубым было дополнительно проведено споласкивание серной кислотой, но полученные результаты не дали возможности с уверенностью утверждать как отсутствие, так и наличие меланина.

Заключение

1. Синусы панкреатолиенальных гемолимфоузлов наполняются сосудами со смешанным содержимым, что может быть результатом слияния венозных и лимфатических сосудов, либо внесением части эритроцитов в лимфатическое русло селезенки. Частично попадание эритроцитов в фолликулы ГЛУ может быть обусловлено наличием открытых капилляров, но подобный способ не может быть основным, т.к. в большей части фолликулов ГЛУ эритроциты не выявляются. Полное отсутствие эритроцитов в мозговых синусах ГЛУ свидетельствует об их элиминации за счет фагоцитоза макрофагами, а также, возможно, за счет гемолиза.

2. Для ГЛУ характерно наличие клеток, пе-

реполненных липофусцином, что является свидетельством активного эритрофагоцитоза. Одновременное отсутствие скоплений железа в этих клетках дает основания отнести их к альтернативно активированным макрофагам (M2), активно экспортирующим железо после его высвобождения из гемоглобина. По совокупности свойств окраски эти клетки сходны с «гистиоцитами морской синевы», которые обнаруживаются в норме в красном костном мозге, а при нарушениях липидного обмена – в селезенке и печени.

Перспективы дальнейших исследований

Представляет собой интерес сравнительная характеристика гемоксигеназной активности макрофагов ГЛУ, печени, селезенки и других лимфоидных органов с целью определения роли ГЛУ в обмене гемоглобина и железа. Также с этой целью имеет смысл провести эксперименты по моделированию нарушений обмена железа (перегрузки железом, железодефицитных анемий) и изучению соответствующих изменений со стороны ГЛУ.

Литературные источники References

1. Sakita K, Fujino M, Koshikawa T, Ohmiya N, Ohbayashi M, Asai J. Structure and function of the hemolymph node in rats. *Nagoya J Med Sci.* 1997 Nov;60(3-4):129-37.
2. Yoon YS, Lee JS, Shin JW. Age-related morphological studies on hemal node and hemolymph node in Korean native goat. *Korean Journal of Veterinary Research.* 1999;39(5):865-77.
3. Zidan M, Pabst R. Histology of hemal nodes of the water buffalo (*Bos bubalus*). *Cell Tissue Res.* 2010 Jun;340(3):491-6. doi: 10.1007/s00441-010-0962-z.
4. Zidan M, Pabst R. Histological, histochemical and immunohistochemical study of the haemal nodes of the dromedary camel. *Anat Histol Embryol.* 2004 Oct;33(5):284-9.
5. Thorp BH, Seneque S, Staute K, Kimpton WG. Characterization and distribution of lymphocyte subsets in sheep hemal nodes. *Dev Comp Immunol.* 1991 Fall;15(4):393-400.
6. Merkulov GA. [The course of histopathologic techniques]. 5th ed., rev. and enl. Leningrad: Meditsina; 1969. 423 p. Russian.
7. Suvarna K, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier, 2013. 654 p.
8. Lillie RD, author; Portugalov VV, editor of translation. [Histopathologic technic and practical histochemistry]. Moscow: Mir; 1969. 639 p. Russian.
9. Pearse E, author; Portugalov VV, editor of translation. [Histochemistry theoretical and applied]. Moscow: Izdatelstvo inostranoi literatury; 1962. 962 p. Russian.
10. Zhang W, Yasuda M, Hosaka YZ, Nasu T. Scanning electron microscopic study of the vascular system in the hemal node of the bovine cervical region. *J Vet Med Sci.* 2013 Jan 31;75(1):79-83.
11. Nopajaroonsri C, Luk SC, Simon GT. The structure of the hemolymph node – a light, transmission, and scanning electron microscopic study. *J Ultrastruct Res.* 1974;48(3):325-41. doi:10.1016/S0022-5320(74)80003-1.
12. Pellas TC, Weiss L. Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. *Am J Anat.* 1990 Apr;187(4):347-54.
13. Slusarczyk K, Marniok B, Rudnicki P. Effect of splenectomy on the morphology of haemolymph splenic nodes in Wistar rats. *Med Sci Monit.* 2000 Jul-Aug;6(4):675-9.
14. Slusarczyk K, Marniok B, Ekkert M. Effect of the ligation of spleen neurovascular pedicle on the morphology of hemolymph splenic nodes in Wistar rats. *Med Sci Monit.* 2000 May-Jun;6(3):486-90.
15. Hogg CM, Reid O, Scothorne RJ. Studies on hemolymph nodes. III. Renal lymph as a major source of erythrocytes in the renal hemolymph node of rats. *J Anat.* 1982 Sep;135(Pt 2):291-9.
16. Sasaki K. Erythrophagocytosis of the lymph node macrophages caused by autotransplantation of the splenic tissue into the lymph nodes of rat. *Anat Anz.* 1990;171(5):335-42.
17. Kong W, Duan X, Shi Z, Chang Y. Iron metabolism in the mononuclear phagocyte system. *Progress in Natural Science.* 2008;18(10):1197-202. doi:10.1016/j.pnsc.2008.03.024.
18. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med.* 1970 Mar;75(3):410-21.
19. Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* 2011 Jun;32(6):241-7. doi: 10.1016/j.it.2011.03.007.
20. Cerutti P, Guerrero F. Erythropoiesis and erythrophagocytosis in bovine haemal nodes. *Int J Morphol.* 2008;26(3):557-62.
21. Clark KG, Davidson WM. Bone marrow lipofuscin. *J Clin Pathol.* 1972 Nov;25(11):947-50.
22. Bigorgne C, Le Tourneau A, Messing B, Rio B, Giraud V, Molina T, Audouin J, Diebold J. Sea-blue histiocyte syndrome in bone marrow secondary to total parenteral nutrition including fat-emulsion sources: a clinicopathologic study of seven cases. *Br J Haematol.* 1996 Nov;95(2):258-62.

23. Suzuki O, Abe M. Secondary sea-blue histiocytosis derived from Niemann-Pick disease. *J Clin Exp Hematop.* 2007 Apr;47(1):19-21.
24. Howard MR, Kesteven PJ. Sea blue histiocytosis: a common abnormality of the bone marrow in myelodysplastic syndromes. *J Clin Pathol.* 1993 Nov;46(11):1030-2.
25. Hendriks HR, Eestermans IL. Phagocytosis and lipofuscin accumulation in lymph node macrophages. *Mech Ageing Dev.* 1986 Jul;35(2):161-7. doi: 10.1016/0047-6374(86)90006-0.
26. Hübscher SG, Harrison RF. Portal lymphadenopathy associated with lipofuscin in chronic cholestatic liver disease. *J Clin Pathol.* 1989 Nov;42(11):1160-5.
27. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Aug;36(8):1400-4.
28. Terman A, Dalen H, Brunk UT. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during amino acid starvation. *Exp Gerontol.* 1999 Dec;34(8):943-57.
29. Walls R, Kumar KS, Hochstein P. Aging human erythrocytes. Differential sensitivity of young and old erythrocytes to hemolysis induced by peroxide in the presence of thyroxine. *Arch Biochem Biophys.* 1976 Jun;174(2):463-8.
30. Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM. Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol.* 2006 Oct;21(4):467-71.
31. Carrasco-Marín E, Alvarez-Domínguez C, López-Mato P, Martínez-Palencia R, Leyva-Cobián F. Iron salts and iron-containing porphyrins block presentation of protein antigens by macrophages to MHC class II-restricted T cells. *Cell Immunol.* 1996 Aug 1;171(2):173-85.

Потоцька О.Ю., Лапсарь Г.С. Особливості будови та клітинного складу панкреатолієнальних гемолімфовузлів людини.

Реферат. За допомогою стандартних гістологічних, а також гістохімічних методів для виявлення заліза, ліпофусцинів і компонентів жовчі, було досліджено панкреатолієнальні гемолімфатичні вузли (ГЛВ) людини. Встановлено, що до ГЛВ притікає суміш крові та лімфи; у ході циркуляції крізь системи синусів усі еритроцити руйнуються шляхом фагоцитозу макрофагами. Залізо, що вивільняється в результаті розщеплення гемоглобіну, макрофаги виділяють у середовище, що їх оточує, а неперетравлені мембрани еритроцитів піддаються перекисному окисленню ліпідів і накопичуються всередині клітин у вигляді ліпофусцину.

Ключові слова: гемолімфатичні вузли, макрофаги, еритрофагоцитоз, ліпофусцин, гемосидерин, гістіоцити морської блакиті, меланомакрофаги.