

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616–073.7+616.24+616.381-002+615.279+616-092.9

©М. Р. Герасимчук

Івано-Франківський національний медичний університет

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ АЛЬВЕОЛ У ЛЕГЕНЯХ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГОСТРОМУ РОЗЛИТОМУ ПЕРИТОНИТІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ ЛІПІНУ Й ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ АЛЬВЕОЛ У ЛЕГЕНЯХ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГОСТРОМУ РОЗЛИТОМУ ПЕРИТОНИТІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ ЛІПІНУ Й ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ – Метою роботи було встановити закономірності перебудови ультраструктури альвеол легень при експериментальному гострому розлитому перитоніті (ГРП) та за умов його корекції вітчизняними препаратами “Ліпін” і “Церулоплазмін”. Досліди проведено на 52 статевозрілих нелінійних білих щурах, у яких моделювали ГРП та проводили корекцію ліпіном і церулоплазміном одноразово через 30 хв від початку експерименту. Проведені електронно-мікроскопічні дослідження встановили, що в основі морфогенезу легеневого ушкодження при експериментальному ГРП лежить порушення ультраструктури легневих альвеол. Доведено позитивний протекторний вплив застосування ліпіну та церулоплазміну на ультраструктурні компоненти легень та зменшення їх ушкодження при ГРП в експерименті.

ЕЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ АЛЬВЕОЛ ЛЕГКИХ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ РОЗЛИТОМУ ПЕРИТОНИТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПИНА И ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА – Целью работы было установить закономерности перестройки ультраструктуры клеток респираторного отдела легких при экспериментальном остром разлитом перитоните (ОРП) и при условиях его коррекции отечественными препаратами “Липин” и “Церулоплазмин”. Опыты проведены на 52 половозрелых нелинейных белых крысах, в которых моделировали ОРП и проводили коррекцию липином и церулоплазмином один раз через 30 мин от начала эксперимента. Проведенные электронно-микроскопические исследования установили, что в основе морфогенеза легочного повреждения при экспериментальном ОРП лежит нарушение ультраструктуры альвеол. Доказано позитивное протекторное влияние применения липина и церулоплазмина на ультраструктурные компоненты легких и уменьшения их повреждения при ОРП в эксперименте.

ELECTRO-MICROSCOPIC CHANGES OF STRUCTURAL COMPONENTS OF PULMONARY ALVEOLUS AT THE ACUTE PERITONITIS AND APPLICATION OF LIPIN AND CERULOPLAZMIN – The purpose of work was to ascertain appropriateness of the ultrastructural alteration of pulmonary alveolus during experimental acute peritonitis occurs and his correction by domestic drugs such as “Lipin” and “Ceruloplasmin”. Experiments performs on 52 adult nonlinear white rats in which it was modelling acute peritonitis and made “Lipin” and “Ceruloplasmin” one-time correction through 30 min. from the beginning of experiment. Electro-microscopic researches displays that in basis of morphogenesis of pulmonary damage at experimental acute peritonitis lay violation of alveolocytes I and II types ultrastructure. The changes of functioning which leads to microcirculation and to the all aerohaematic barrier disorders. Positive protector influence of “Lipin” and “Ceruloplasmin” application is well-proven on the ultrastructural components of lungs and diminishing of their damage at acute peritonitis in an experiment.

Ключові слова: гострий розлитий перитоніт, ультраструктура альвеол, щури, ліпін, церулоплазмін.

Ключевые слова: острый разлитой перитонит, ультраструктура альвеол, крысы, липин, црулоплазмин.

Key words: acute peritonitis, ultrastructure of alveolus, rats, “Lipin”, “Ceruloplasmin”.

ВСТУП На сьогодні не існує єдино думки щодо механізмів розвитку і терапі гострого розлитого перитоніту (ГРП). Проте багато пацієнтів із ГРП помирають внаслідок розвитку синдрому гострого ушкодження легень (СГУЛ) [4, 10], одним з перших проявів якого є дихальна недостатність. Останню за такого стану, як правило, не вдається усунути використанням штучно вентиляції легень та традиційно терапі [9].

Гострий розлитий перитоніт уже на ранніх стадіях супроводжується вираженою тканинною гіпоксією та активацією процесів вільнорадикального окиснення (ВРО). Одним з найбільш важливих віддалених наслідків цього є окиснення і фрагментація жирних кислот (у тому числі й мембранних фосфоліпідів). Перетворення останніх відбувається каскадним шляхом з утворенням активних продуктів і токсичних метаболітів. Встановлено, що мішенями цього впливу стають, як правило, цитоплазматичні та субклітинні біомембранні структури [8]. Ушкодження мембран внаслідок перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і вплив запальних медіаторів призводить до підвищення проникності ендотелію, виникнення набряку тканин і органно дисфункції. Тому для попередження або усунення респираторних розладів при ГРП може виявитися перспективним застосування препаратів, що мають антиоксидантну, антигіпоксичну та мембранопротекторну активність. Одними з таких є препарати вітчизняного виробництва “Ліпін” (“Біолік”, Харків, Україна) та “Церулоплазмін” (ЦП) (“Біофарма”, Київ, Україна) природного походження. Перший представляє собою ліпосомальну форму фосфатидилхоліну, має виражені антигіпоксичні, метаболічні властивості; нормалізує процеси тканинного дихання, функціональну активність ендотеліальних клітин; поліпшує реологічні властивості крові; пригнічує процеси ПОЛ, має мембраностабілізуючий, сорбційний та репаруючий ефекти [6]. Другий – є основним зовнішньоклітинним антиоксидантом плазми, який перешкоджає утворенню вільних радикалів. Каталізує окиснення Fe^{2+} до Fe^{3+} , ЦП підтримує співвідношення (Fe^{2+}/O_2), яке дорівнює 1/4, забезпечуючи при цьому перенесення O_2 4-х електронів з утворенням води, та попереджує неферментативну реакцію, у результаті яко утворюється O_2^- , інгібує супероксидне та феритинзаляжне ПОЛ [1, 2].

Метою дослідження стало встановлення особливостей ультраструктурних змін компонентів аль-

веол у легенях при експериментальному гострому перитоніті за умов корекції препаратом "Ліпін" і "Церулоплазмін".

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідження проведено на 52 нелінійних білих щурах-самцях масою 180–230 г, яких було поділено на чотири групи: перша група тварин з відтвореним ГРП за допомогою внутрішньоочеревинного введення 10 % калово суспензії з розрахунку 1 мл на 100 г маси щура [3, 10]; друга група тварин – з експериментальним перитонітом та одноразовим введенням препарату "Ліпін" в дозі 50 мг/кг внутрішньоочеревинно через 30 хв від початку моделювання ГРП; третя група тварин – з експериментальним перитонітом та одноразовим введенням препарату "Церулоплазмін" в дозі 10 мг/кг одноразово внутрішньоочеревинно через 30 хв від початку експерименту та четверта контрольна – з введенням еквівалентно дози фізіологічного розчину. Всі дослідження проводили під загальним знеболюванням, з використанням кетаміну (40 мг/кг). Утримання тварин та маніпуляції проводили відповідно до положень Закону України "Про захист тварин від жорстокого відношення" (№ 1759-VI від 15.12.2009).

Після закінчення експерименту всі тварини піддавалися евтаназії. Забір матеріалу для електронно-мікроскопічних досліджень здійснювали в найкоротший термін за єдиним планом через 1, 12, 24 та 48 год дослідження. Маленькі шматочки легень, як правило без великих бронхів і судин, переважно з нижніх часток, фіксували у 2,5 % розчині глутаральдегіду, постфіксували 1 % розчином тетраоксиду осмію на фосфатному буфері. Подальшу обробку проводили згідно з загальноприйнятою методикою [7]. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамикротомі УМПП-7, контрастували ураніацетатом, цитратом свинцю відповідно методу Рейнольдса та вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ Проведені електронно-мікроскопічні дослідження респіраторного відділу легень у тварин другої групи через 1 год при експериментальному ГРП за умов застосування ліпіну, порівняно з першою групою, встановили, що більшість альвеолярних гемокапілярів були розширені та кровонаповнені, в них багато еритроцитів. У складі аерогематичного бар'єру наявний набряк цитоплазматичних ділянок респіраторних альвеолоцитів, нерівномірно потовщена базальна мембрана. Ядра частини ендотеліоцитів (Ен) пікнотично змінені, з осміофільною каріоплазмою і нерівномірною каріолею. Цитоплазматичні ділянки ендотелію також змінені, мають світлі й темні ділянки. Піноцитоз в цей термін погано виражений.

Крім деструктивно змінених альвеолоцитів II типу (Ал-II) в цей термін спостерігаються клітини, в яких краще збереглася структура ядра – вони мають округло-овальну форму, еухроматин в каріоплазмі, рівні контури каріолеми. В цитоплазмі наявні рибосоми і полісоми, некротичні каналці гранулярно ендоплазматичної сітки (ГЕС). Проте секреторних гранул мало, вони електронно-прозорі, відсутні

осміофільні пластинчасті структури. Плазмолема таких альвеолоцитів має мікрворсинки.

Через 12 год дослідження при застосуванні ліпіну в альвеолах наявні ознаки регенераторних процесів. Субмікроскопічно це проявляється активацією ядер альвеолоцитів I типу (Ал-I), вони значно збільшували площу поверхні за рахунок глибоких інвагінацій, в каріоплазмі переважав еухроматин, наявні ядерця. В перинуклеарній зоні визначалось багато рибосом, а в нерівномірних за товщиною ділянках цитоплазми наявні піноцитозні пухирці і кавеоли. Проте наявна деструкція органел як в респіраторних альвеолах, так і ендотеліоцитах. В Ал-II виявлено різно величини секреторні гранули з малим вмістом осміофільних пластинчастих структур. Наявні гіпертрофовані мітохондрії, що мають круглу форму і насичені кристами. Цитолема на апікальній поверхні утворює мікрворсинки (рис. 1).

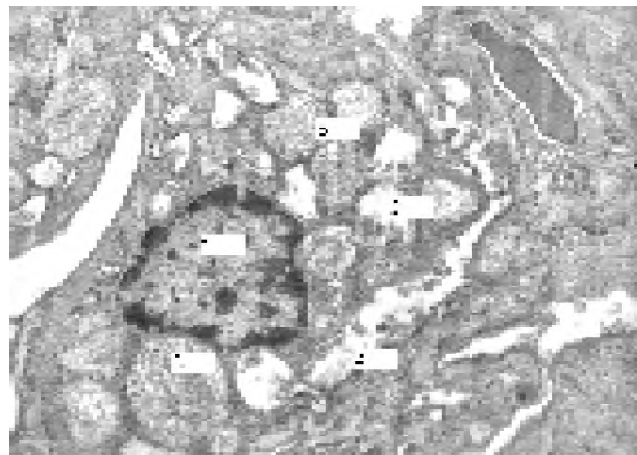


Рис. 1. Субмікроскопічний стан альвеолоциту 2 типу в складі альвеоли легень при експериментальному перитоніті за умов лікування ліпіном через 12 год. Ядро (1) секреторного альвеолоцита, секреторні гранули (2), мітохондрії (3), мікрворсинки на поверхні клітини (4), х 7 000.

Результати ультраструктурного дослідження структурних компонентів альвеол, проведеного через 24 год в умовах використання ліпіну при перитоніті, виглядає менш зміненою, ніж без лікування. Так, в ендотеліоцитах округло-овальні ядра з чіткими контурами каріолеми, еухроматином у каріолемі. Цитоплазматичні ділянки ендотеліальних клітин нерівномірно товщини, проте без ознак значного набряку. Базальна мембрана також менше змінена. Цитоплазматичні ділянки респіраторних альвеолоцитів мають хвилясту поверхню плазмолем, нерівномірну товщину, проте наявні пухирці і кавеоли.

Для частини секреторних альвеолоцитів в цей термін характерним є насиченість цитоплазми секреторними гранулами та гіпертрофованими мітохондріями. Ці структури навіть деформують х ядро, утворюють своєрідні інвагінації каріолеми. До великих мітохондрій щільно прилягають секреторні гранули. Більша площа секреторних гранул електронно-прозора, має окремі пластинчасті осміофільні структури.

Електронно-мікроскопічно через 48 год при експериментальному ГРП у тварин другої групи встановлено кращий стан компонентів альвеол, ніж у респіраторному відділі легень тварин першої групи. Просвіти більшості кров'яних капілярів були помірними, переважно з еритроцитами. Їх мають подовжені ядра з окремими інвагінаціями каріолеми і чіткими контурами. Цитоплазматичні ділянки Ен і Ал-I неширокі, мають помірну електронну щільність, багато міхурців і кавеол. Базальна мембрана в складі аерогематичного бар'єру відносно рівномірна, неширока, світла, а з боку строми потовщена і нерівномірна (рис. 2).

В Ал-II у цей термін досліду в цитоплазмі спостерігаються різно величини секреторні гранули, які окрім електронно-світлих ділянок мають неправильно форми і конфігурації осміофільні структури. Наявні гіпертрофовані мітохондрії, каналці ГЕС, цистерни комплексу Гольджі (КГ) та полісоми. У каріоплазмі ядер переважає еухроматин, гетерохроматин осміофільними ділянками, розташований поздовж каріолеми. Наявні крупні ядерця, що зміщені до ядерної оболонки. Така ультраструктурна організація альвеолоцитів II типу свідчить про їх напружену функціональну активність.

Виявлена в наших дослідженнях коригуюча дія ліпіну при використанні даної моделі перитоніту, може пояснюватися тим, що ліпін, як ліпосомальна форма фосфатидилхоліну, має потужну антиоксидантну й антигіпоксичну активність [6]. Відомо, що внаслідок взаємодії літіну із ліпосомами суттєво модифікуються мембранні структури і змінюється функціональна активність клітин в цілому. Окрім того, купування ПОЛ, що має місце при запальних процесах, зокрема при ГРП та СГУЛ, під дією ліпосом і заміщення дефектів клітинних мембран можуть розглядатися як патогенетично обґрунтовані фактори при впливі на вогнище запалення [8].

Субмікроскопічні дослідження респіраторного відділу легень через 1 год при експериментальному

ГРП за умов застосування ЦП у тварин третьої групи встановили, що в цей термін у частині Ал-II типу є ознаки підвищення їх функціонального стану. Наявність мікроворсинок на апікальній поверхні, округло-овальне ядро з еухроматином у каріоплазмі і ядерцем (рис. 3). У цитоплазмі таких клітин добре структуровані каналці ГЕС, цистерни КГ, багато рибосом. Проте секреторних гранул небагато, вони у вигляді круглих, світлих порожнин з окремими осміофільними шароподібними структурами.

В умовах застосування церулоплазміну при перитоніті через 12 год субмікроскопічно наявні ознаки покращання структури частини альвеол. Ядра Ен гемокапілярів мають неправильну форму за рахунок інвагінацій каріолеми, що збільшує площу їх поверхні. Окремі ядра мають ядерця. Цитоплазматичні ділянки ендотелію як потовщені, так і вузькі, набряк не такий значний. Ал-I типу мають також ядра з інвагінаціями, а цитоплазматичні ділянки різну товщину. Проте наявні мікропухирці, кавеоли. Базальна мембрана таких альвеол відносно рівномірно товщина.

У цей термін досліду секреторні альвеолоцити мають округло-овальні або подовгасті форми ядер, часто в каріолемі наявне ядерце і багато рибосомальних гранул. Каріолема на окремих ділянках нерівна, з інвагінаціями, невеликий перинуклеарний простір і чіткі ядерні пори. У цитоплазмі є різного ступеня зрілості секреторні гранули, багато незрілих. На поверхні альвеолоцитів спостерігаються чисельні мікроворсинки.

На 24 год дослідження у тварин третьої групи, порівняно з першою групою, встановлено, що субмікроскопічно Ал-II мають округло-овальні або подовгасті форми ядер, в каріоплазмі переважає еухроматин, в каріолемі – чіткі ядерні пори. На вільній поверхні клітин плазмолема має мікроворсинки. В цитоплазмі секреторні гранули у вигляді світлих крупних вакуолей, лише в окремих наявні осміофільні включення.

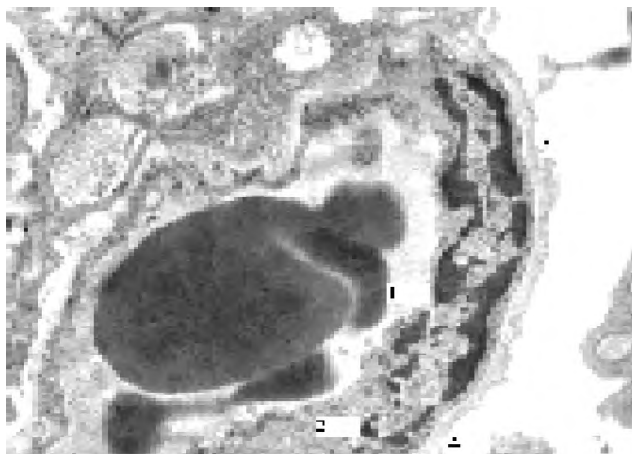


Рис. 2. Субмікроскопічний стан альвеоли респіраторного відділу легень при експериментальному перитоніті в умовах лікування ліпіном через 48 год. Просвіт альвеоли з еритроцитами (1), ендотелій (2), цитоплазма респіраторного епітелію (3), базальна мембрана (4), $\times 9\ 000$.

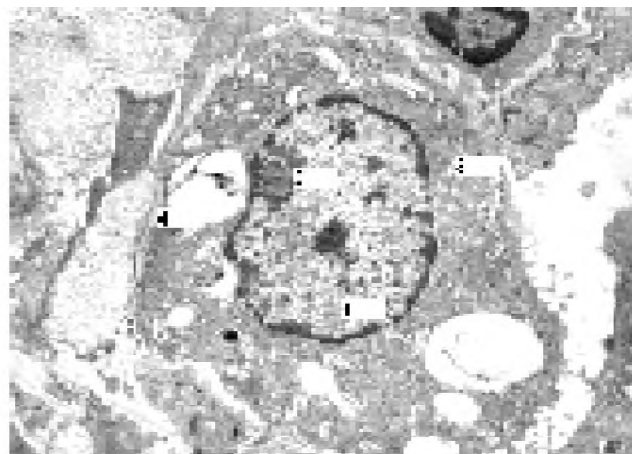


Рис. 3. Субмікроскопічна організація секреторного епітелію при експериментальному перитоніті за умов використання церулоплазміну через 1 год. Ядро (1), ядерце (2), цитоплазма (3), секреторні гранули (4), $\times 9\ 000$.

Субмікроскопічно в умовах використання ЦП при експериментальному ГРП через 48 год досліджує краще структуровані компоненти альвеол, ніж у тварин першо групи. Респіраторні альвеолоцити не так змінені, ядра клітин круглясто або подовгасто форми, в х каріоплазмі переважає еухроматин, контури каріолеми чіткі і рівні. Цитоплазма має ознаки набряку, але не такі виразні. Цитоплазматичні ділянки альвеолоцитів відносно рівномірні, мають мікропухирці й вакуолі (рис. 4).

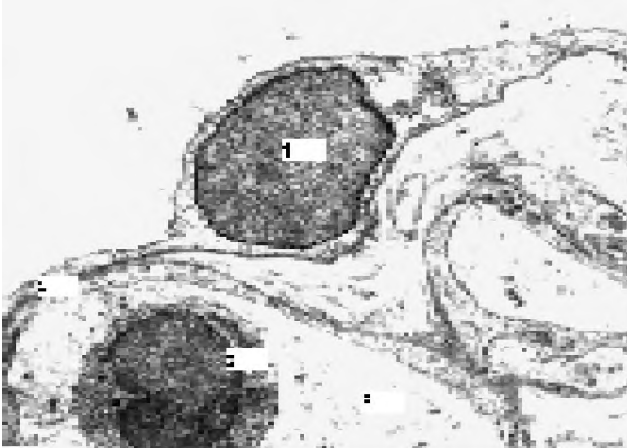


Рис. 4. Ультраструктура альвеоли респіраторного відділу легень при експериментальному перитоніті за умов використання церулоплазміну через 48 год. Ядра респіраторного альвеолоцита (1), просвіт гемокapіляра (2) з лімфоцитом (3), аерогематичний бар'єр (4), $\times 500$.

У цитоплазмі Ал-II в цей термін досліджується різно величини, переважно круглі секреторні гранули. В них переважає електронно-прозорий компонент, проте більше ніж у попередній термін в секреторних гранулах наявні осміофільні включення. У цитоплазмі відмічається багато органел, каналці ГЕС, цистерни і вакуолі КГ, рибосоми, окремі мітохондрі. На вільній поверхні плазмолемі багато мікроворсинок.

Таким чином, електронно-мікроскопічні дослідження альвеол легень щурів із змодельованим експериментальним ГРП виявило протекторний вплив "церулоплазміну". Так, позитивний ефект застосування ЦП може пояснюватися тим, що він веде до зниження активності ефektorних клітин гострого ушкодження фагоцитів і тромбоцитів, процесів ВРО в організмі. ЦП порушує автономію вогнища запалення за рахунок пригнічення фібриноутворення, підвищення фібринолізу, відновлення транспортних властивостей еритроцитів. Відомо, що антипротейолітична дія ЦП сприяє зменшенню ступеня ушкодження і призводить до пришвидшення морфологі-

чного відновлення тканин у вогнищі запалення [1].

ВИСНОВКИ 1. При розвитку гострого розлитого перитоніту відбуваються значні ультраструктурні зміни клітин альвеол та аерогематичного бар'єру, що слід вважати результатом гостро гіпоксії та ендогенно інтоксикації.

2. Застосування препаратів "Ліпін" та "Церулоплазмін" з антиоксидатною та антигіпоксичною дією при гострому розлитому перитоніті має позитивний протекторний вплив на ультраструктурні компоненти альвеол та зменшує х ушкодження в усі терміни досліджу.

Перспективи подальших досліджень Результати ультраструктурного стану альвеол легень у подальшому можуть бути використані для патогенетичного застосування препаратів антиоксидантів-антигіпоксантів "Ліпін" і "Церулоплазмін" в комплексному лікуванні та профілактиці розвитку гострого легеневого ушкодження хворих з перитонітом, а також дозволять проводити подальші морфофункціональні дослідження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Церулоплазмін: від біотехнології до клінічного застосування : монографія / Н. К. Бердинських, Л.С. Рядська, В.Ф. Чехун [та ін.]. – К. : Вид-во медично літератури СПД Шкода Ю. В., 2006. – 273 с.
2. Активність НАДФ-оксидази та NO-синтази нейтрофільних гранулоцитів хворих на рак шлунка або рак кишечника при курсовому застосуванні церулоплазміну / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик, В. М. Півнюк [та ін.] // Онкологія. – 2006. – Т. 8, № 4. – С. 375–376.
3. Герасимюк І. Є. Особливості динаміки морфофункціональних змін у судинному руслі печінки та нирок при перебігу гострого розлитого перитоніту в експерименті / І. Є. Герасимюк, А. В. Гантімуrow, В. О. Чепесюк // Вісник морфології. – 2010. – № 16 (1). – С. 125–128.
4. Нестеров Е. Н. Сурфактантная система легких и коррекция ее нарушенной при бронхолегочных заболеваниях / Е. Н. Нестеров, Г. Н. Паневская // Пульмонология. – 2000. – № 3. – С. 19–23.
5. Полянський І. Ю. Деякі аспекти патогенезу кишково недостатності при перитоніті / І. Ю. Полянський, Я. Ю. Войтів // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 12–15.
6. Похилько В. І. Особливості мітохондріального енергетичного обміну в новонароджених, які перенесли перинатальну асфіксію. Нейропротекторний та метаболічний захист / В. І. Похилько, О. М. Ковальова, Н. Р. Касянчук // Международный неврологический журнал. – 2009. – № 2 (24). – С. 3–9.
7. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Петрова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
8. Ступницька Г. Я. Використання фосфатидилхолінових ліпосом у хворих із патологією органів дихання та нирок / Г. Я. Ступницька, С. М. Мереуца // Клінічна та експериментальна патологія. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 110–112.
9. Чучалин А. Г. Синдром острого повреждения легких / А. Г. Чучалин // Пульмонология. – 2007. – № 1. – С. 5–11.
10. Intravenous glutamine decreases lung and distal organ injury in an experimental model of abdominal sepsis / Gisele P. Oliveira, Mariana B. G. Oliveira, Raquel S. Santos [et al.] // Critical Care. – 2009. – Vol. 13, № 3. – P. 74–85.

Отримано 28.03.11