

ЛИМФАТИЧЕСКИЙ РЕГИОН ПЕЧЕНИ КРЫС ВИСТАР В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО ВЛИЯНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Светлана Викторовна МИЧУРИНА¹, Юрий Иванович БОРОДИН², Ирина Юрьевна ИЩЕНКО², Анатолий Дмитриевич БЕЛКИН¹, Анна Вениаминовна ШУРЛЫГИНА², Петр Михайлович ЛАРИОНОВ³

¹Центральная научно-исследовательская лаборатория ГОУ ВПО НГМУ Росздрава 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

²ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН 630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

³ФГУ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н.Мешалкина 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Цель исследования состояла в изучении морфофункциональной организации печени и ее регионарных лимфатических узлов у животных, подвергшихся сочетанному воздействию этанола (15%, 1.5мл, ежедневно, 28 сут) (А) и круглосуточного освещения (КО). Использован метод световой микроскопии, выполнен морфометрический анализ гистологических препаратов печени и регионарных печеночных лимфоузлов. Установлено, что сочетанное воздействие А+КО приводит к нарушению крово- и лимфообращения, выраженным дистрофическим изменениям, усилению апоптоза гепатоцитов и напряженному состоянию соединительно-тканного компартмента. При этом происходит миграция лимфоидных элементов в паренхиму органа с дальнейшим образованием временных скоплений лимфоидной ткани. В регионарных лимфатических узлах выявлена стимуляция В-зависимых зон, что можно рассматривать как усиление протективной функции всей лимфоидной системы.

Ключевые слова: печень, лимфатические узлы, алкогольная интоксикация, круглосуточное освещение.

В последние годы влияние антропогенных факторов на человеческий организм резко возросло. Так, изменение светопериодичности в жизни людей, например, в результате частой смены часовых поясов при перелетах, вахтового режима работы, освещения улиц городов в ночное время и т. д. ведет к нарушению циркадных и сезонных биоритмов. Сдвиг биологических ритмов приводит к угнетению функции эпифиза и снижению им продукции гормона мелатонина. Последний является основным регулятором эндогенных ритмов в организме и кроме того мощным антиоксидантом и иммунорегулятором. Нарушение как количества, так и ритма продукции мелатонина является пусковым моментом, приводящим на начальных этапах к десинхронозу, за которым следует возникновение органической патологии [1, 2, 3]. Другой фактор, влияющий на здоровье человека, — неумеренное употребление слабоалкогольных напитков и, как правило, на фоне нарушения светового режима. В этих условиях важную роль в обеспечении гомеостаза организма играют основной орган детоксикации — печень — и регионарные лимфатические узлы,

осуществляющие ее лимфодетоксикацию. Известно, что в лимфатических узлах происходит не только биохимическая обработка приносимой лимфы, но и формирование иммунного ответа на поступающие антигены [4]. Это и определило цель настоящей работы — изучение лимфатического региона печени крыс в условиях сочетанного влияния алкогольной интоксикации и круглосуточного освещения.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на самцах крыс Вистар весом 250-300 г в условиях содержания на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Животные группы «Алкоголь» ежедневно через зонд получали 15%й этанол (1,5 мл) в течение 28 сут. и находились в условиях естественного освещения. Крысы группы «Алкоголь+КО» в течение 28 сут. получали дозированно 15%й этанол, а с 15-х по 28-е сутки подвергались воздействию круглосуточного освещения (КО). Группой сравнения были интактные животные. По истечении сроков эксперимента крыс забивали под эфирным наркозом методом декапитации и забирали образцы печени и ее регионарные лимфати-

Мичурина С.В. — д.м.н., профессор, зав. ЦНИЛ

Бородин Ю.И. — академик РАМН, профессор, советник при дирекции

Ищенко И.Ю. — к.б.н., старш.н.с.

Белкин А.Д. — к.м.н., вед.н.с.

Шурлыгина А.В. — д.м.н., профессор, главн.н.с.

Ларионов П.М. — д.м.н., профессор

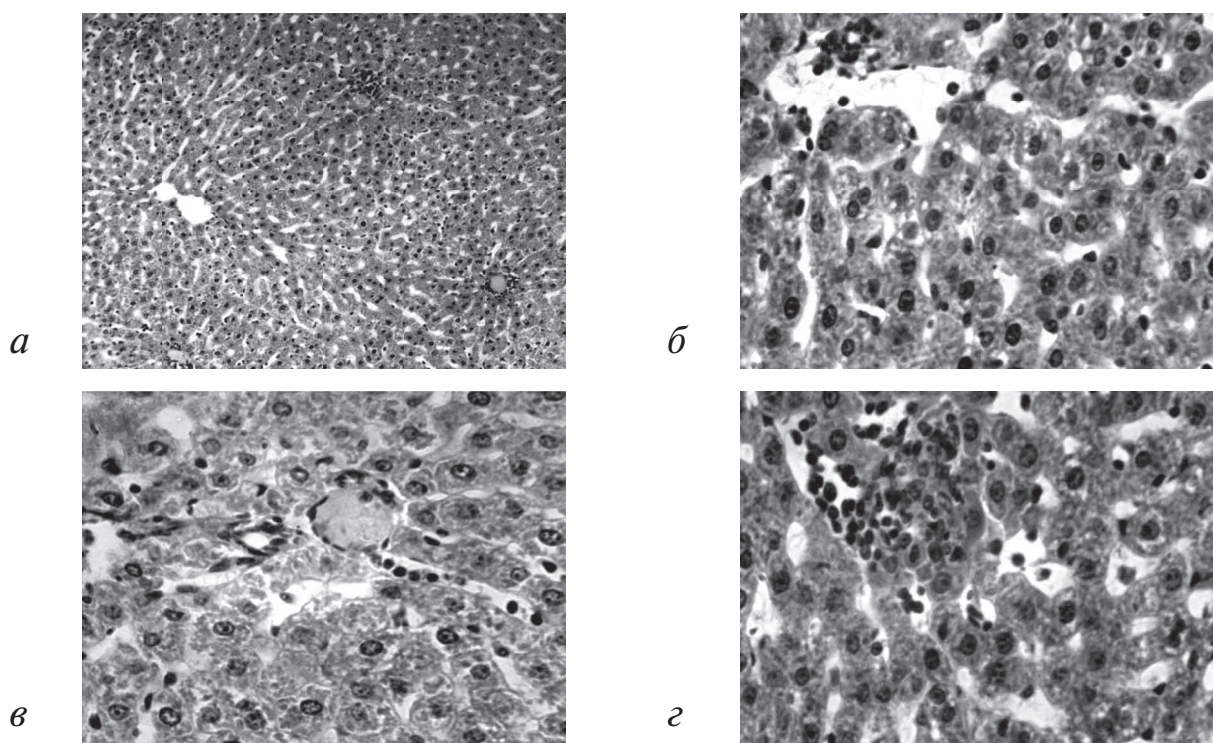


Рис. 1. Печень животных после алкогольной интоксикации:
 а — расширение синусоидов (объектив 10, окуляр 10);
 б — вакуолярная дистрофия гепатоцитов в зоне триад (об. 40, ок. 10);
 в — краевое стояние лимфоцитов в синусоиде (об. 40, ок. 10);
 г — инфильтрация паренхимы лимфоидными элементами и формирование временных скоплений лимфоидной ткани (об. 40, ок. 10).

ческие узлы. Перед взятием гистологического материала животных и органы взвешивали. Для светооптического исследования кусочки печени и лимфоузлы фиксировали в нейтральном 10%-формалине и растворе Телесницкого. Гистологический материал проводили по общепринятой методике, окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Выполняли морфометрический анализ промежуточных зон печеночных долек и стереометрический анализ лимфоузлов [5]. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t* критерия Стьюдента. Для выяснения частоты встречаемости гепатоцитов с апоптотической трансформацией ядер изготавливали криостатные срезы; был применен флюоресцентный метод окрашивания ядер с Hoechst 33342 (концентрация 1мкг/мл на фосфатном буфере). Анализ проводили на микроскопе Zeiss Axioskop FL 40, camera AxioCam MRc, в оптической схеме использовали блок фильтров 02 filter set (excitation 365 nm, emission 420 nm), объектив Hlan-Neofluar $\times 40/075$. Анализ получаемых изображений выполняли с помощью программного пакета AxioVision. Все экспериментальные работы были проведены с соблюдением

принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Результаты и обсуждение

Гистологическая оценка препаратов печени животных с алкогольной интоксикацией выявила признаки изменений крово- и лимфообращения: расширение синусоидных капилляров, в отдельных участках перипортальных областей — дилатацию лимфатических пространств Малла, в единичных случаях наблюдалось появление извилистости центральных вен. Хотя общая структура долек печени сохранена, встречаются дистрофически измененные гепатоциты и отмечается инфильтрация лимфоцитами отдельных участков зон портальных трактов (**рис. 1**). На фоне достоверного снижения относительного веса печени выявлено увеличение относительной площади сети синусоидов и уменьшение относительной площади паренхимы. Морфометрически установлено уменьшение среднего размера гепатоцитов, снижение суммарной удельной площади ядер и цитоплазмы паренхиматозных клеток, ядерно-цитоплазматического отношения в них, возрастание численной плотности последних. Доля двуядерных

Таблица 1

Относительный вес (%) и результаты морфометрического исследования печени крыс (относительные площади — S , %; численные плотности — N , количество клеток на единицу площади; $M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Группа «Алкоголь»	Группа «Алкоголь +КО»
Относительный вес печени	3,28±0,21	2,65±0,12 *	3,17±0,14
S синусоидов	7,0 ± 0,29	13,49 ± 0,36 *	16,01 ± 0,56 *#
S паренхимы	90,64 ± 0,3	85,01 ± 0,38 *	81,92 ± 0,65 *#
S цитоплазмы гепатоцитов	80,36 ± 0,45	77,00 ± 0,40 *	72,61 ± 0,70 *#
S ядер гепатоцитов	10,28 ± 0,28	8,02 ± 0,25 *	9,31 ± 0,35 *#
Я/Ц гепатоцита	0,129 ± 0,004	0,104 ± 0,004 *	0,129 ± 0,005 #
N гепатоцитов	39,03 ± 0,42	42,28 ± 0,71 *	36,50 ± 0,73 *#
S паренхимы / N гепатоцитов	2,33 ± 0,03	2,03 ± 0,04 *	2,26 ± 0,05 #
N двуядерных гепатоцитов / N гепатоцитов	0,044 ± 0,004	0,041 ± 0,005	0,114 ± 0,012 *#
S синусоидных клеток	2,36 ± 0,11	1,49 ± 0,10 *	2,03 ± 0,23 #
N синусоидных клеток	8,58 ± 0,39	5,8 ± 0,29 *	8,5 ± 0,46 #

Примечания: Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: * — с интактными животными, # — с группой «Алкоголь».

Таблица 2

Частота встречаемости гепатоцитов с апоптотической трансформацией ядер ($M \pm m$)

Интактные животные	Группа «Алкоголь»	Группа «Алкоголь +КО»
18,60±1,54	25,30±3,72	31,6±2,36*

Примечания: * — различия достоверны по сравнению с интактными животными при $p < 0,05$.

Таблица 3

Результаты стереометрического исследования регионарных лимфатических узлов печени животных (V — относительный объем, %; $M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Группа «Алкоголь»	Группа «Алкоголь +КО»
V коры	64,79 ± 2,27	71,69 ± 3,80	64,59 ± 2,54
V мозгового вещества	35,21 ± 2,27	28,31 ± 3,80	35,41 ± 2,54
Корково-мозговой индекс	1,86 ± 0,18	2,71 ± 0,6	1,86 ± 0,19
V паракортекса	50,19 ± 3,15	51,27 ± 2,83	40,45 ± 2,75 *#
V краевого синуса	3,13 ± 1,17	3,67 ± 0,61	3,59 ± 0,31
V межузелковой зоны	1,34 ± 0,85	2,32 ± 0,51	1,99 ± 0,42
V всех лимфоидных узелков	10,12 ± 3,39	14,42 ± 1,28	18,57 ± 1,84 *
V герминативных центров	0,79 ± 0,18	2,01 ± 0,43 **	2,71 ± 0,44 **
Доля герминативных центров в узелковом аппарате	8,3 ± 1,32	14,01 ± 3,12	14,55 ± 1,77 **
V мозговых тяжей	23,38 ± 1,95	16,15 ± 2,13 *	2,22 ± 3,36
V мозговых синусов	11,84 ± 0,77	12,17 ± 2,09	13,21 ± 0,83

Примечания: различия достоверны по сравнению с интактными животными: * — при $p < 0,1$, ** — при $p < 0,05$; # — по сравнению с группой «Алкоголь» при $p < 0,05$.

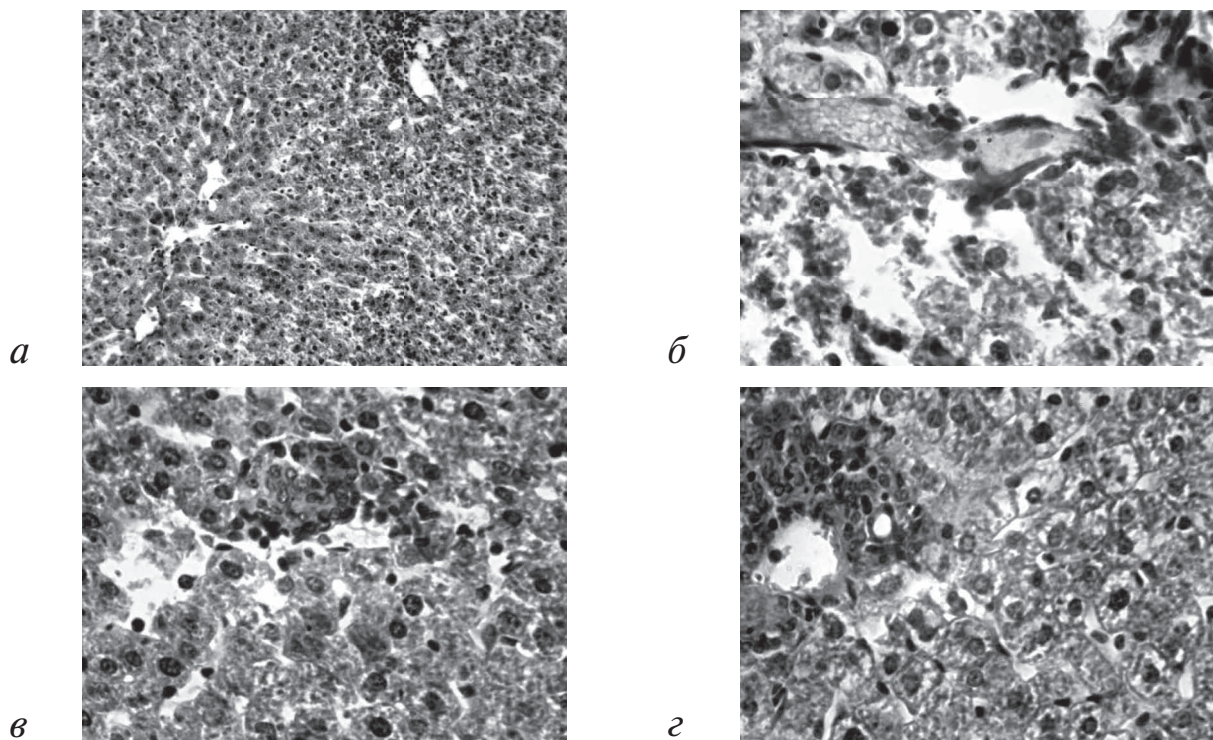


Рис. 2. Печень животных после сочетанного воздействия алкогольной интоксикации и круглосуточного освещения: а — дистрофия гепатоцитов, нарушение архитектоники центральных вен (объектив 10, окуляр 10); б — зона некроза гепатоцитов (об.40, ок.10); в — инфильтрация паренхимы лимфоидными элементами и формирование временных скоплений лимфоидной ткани (об.40, ок.10); г — периваскулярная инфильтрация в перипортальной зоне (об.40, ок.10).

гепатоцитов в промежуточных зонах не изменялась (**табл. 1**), однако светооптически выявлено большое количество диплокариоцитов в областях центральных вен. Частота встречаемости гепатоцитов с апоптотической трансформацией ядер оставалась на уровне интактных животных (**табл. 2**). Выявлено уменьшение относительной площади и численной плотности синусоидных клеток по сравнению с интактными животными. В регионарных лимфатических узлах печени нами обнаружены значительные тенденции к изменению в В-зависимых зонах — уменьшение относительного объема мозговых тяжей с одновременным увеличением относительного объема лимфоидных узелков и доли в них герминативных центров; удельный объем герминативных центров в лимфоузле был достоверно увеличен (**табл. 3**). Изменение синусной системы в печеночных лимфоузлах не выявлено.

Результаты светооптического и морфометрического анализа печени у животных со слабой алкогольной интоксикацией свидетельствуют о напряженном состоянии микроциркуляции в органе и снижении функциональной активности паренхиматозных клеток. Стимуляция

узелкового аппарата и герминативных центров в регионарных лимфоузлах печени свидетельствует о нарастании антигенной нагрузки на основной орган детоксикации.

Содержание алкоголизированных животных в условиях постоянного освещения приводит (по сравнению с группой «Алкоголь») к еще большему расширению кровеносных синусоидных капилляров печени, дилатации лимфатических коллекторов Малла и заполнению их лимфоидными элементами, нарушению архитектоники центральных вен (**рис. 2а**). Такие изменения, как правило, отражают состояние повышенного давления в микрососудах, что свидетельствует о нарушении крово- и лимфообращения.

В ранее проведенных экспериментах [6] показано, что под влиянием КО в лимфатическом регионе печени нарушается лимфатический дренаж во всех его звеньях, включая пути несосудистого массопереноса в интерстиции, лимфатические капилляры и сосуды, регионарные лимфатические узлы. Разбалансировка корней лимфатической системы в печени приводит к нарушению гемато-паренхиматозных барьеров, развитию тканевой гипоксии, усилению

процесса апоптоза. У животных с сочетанным воздействием алкогольной интоксикации и КО в перипортальных и промежуточных областях печеночных долек нами обнаружены дистрофия и некроз гепатоцитов (рис. 2 б, в), а при молекулярно-клеточном анализе установлен достоверный рост частоты встречаемости гепатоцитов с апоптотической трансформацией ядер (табл. 2).

На фоне роста относительного веса печени у крыс группы «Алкоголь+КО» по сравнению с группой «Алкоголь» выявлено уменьшение относительной площади паренхимы и увеличение площади сети синусоидов, что, по-видимому, свидетельствует об отечности органа (табл. 1). По расширенным тканевым щелям и лимфатическим сосудам происходит интенсивная миграция лимфоидных элементов. Наблюдается образование лимфоидных узелков (рис. 2 в, г), которые согласно концепции академика Ю. И. Бородина [4], рассматриваются как временные скопления лимфоидной ткани, формирующиеся в ответ на повреждение.

Стереометрический анализ регионарных лимфатических узлов печени у крыс с сочетанным воздействием алкогольной интоксикации и постоянного освещения не выявил значительного увеличения относительного объема мозговых синусов (табл. 3). Отсутствие реакции синусной системы на увеличение емкостей синусоидных капилляров в печеночных дольках, по-видимому, свидетельствует о недостаточности дренажной функции лимфоузлов, что еще больше усугубляет состояние микроциркуляторного русла печени и способствует напряженности гемато-лимфатических барьеров органа.

Морфометрическое исследование промежуточных зон печеночных долек крыс группы «Алкоголь+КО» выявило по сравнению с группой «Алкоголь» возрастание суммарной площади ядер гепатоцитов, увеличение среднего размера паренхиматозных клеток, ядерно-цитоплазматического отношения в них, уменьшение численной плотности гепатоцитов и увеличение доли диплокариоцитов среди них (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют об усилении функциональной активности и интенсивности восстановительных процессов в паренхиматозных клетках печени, что обычно сопровождается высоким функциональным напряжением капилляро-соединительнотканых структур. Установленное нами увеличение площади сети синусоидов, возрастание численной и объемной плотности синусоидных клеток

у животных группы «Алкоголь+КО» (табл. 1), по-видимому, отражает напряженное состояние капилляро-соединительнотканного компартмента тканевого микрорайона печени.

В регионарных лимфатических узлах печени отмечается угнетение Т-зависимой паракортикальной зоны и развитие В-зависимых зон — увеличение относительных объемов всех лимфоидных узелков, доли в них герминативных центров, относительного объема последних в лимфоузле; по сравнению с группой «Алкоголь» заметна тенденция к увеличению мозговых тяжей (табл. 3). Наши данные согласуются с результатами исследований, в которых показано, что у животных с КО разрушение эндотелиоцитов синусоидных капилляров печени приводит к проникновению клеточных элементов крови и продуктов некроза в перисинусоидальные пространства и далее в регионарные лимфатические узлы; при этом морфометрический анализ этих печеночных лимфоузлов выявил стимуляцию В-зависимых зон [6], что может свидетельствовать о протективной функции лимфоидной системы.

Согласно концепции Ю.И. Бородина [4], лимфатический дренаж в анатомическом регионе является трехуровневым: 1) пути несосудистого массопереноса в интерстиции (прелимфатики), 2) лимфатические капилляры и сосуды, 3) регионарные лимфоузлы. Под влиянием круглосуточного освещения у животных группы «Алкоголь+КО» в лимфатическом регионе печени нарушается лимфатический дренаж во всех его звеньях. Это в свою очередь усиливает сдвиг гемато-лимфатического равновесия в печени, что приводит к расширению синусной системы, увеличению в ней давления, нарушению гемато-лимфатических барьеров, развитию тканевой гипоксии, дистрофии и некрозу паренхиматозных клеток, напряженному состоянию соединительнотканного компартмента. При этом миграцию лимфоидных элементов в паренхиму с дальнейшим образованием временных скоплений лимфоидной ткани, а также стимуляцию развития В-зависимых зон регионарных лимфоузлов печени можно рассматривать как усиление протективной функции всей лимфоидной системы.

Литература

1. Ha M., Park J. Shiftwork and metabolic risk factors of cardiovascular disease // J. Occup. Health. 2005. 47: 89-95.
2. Jasser S.A. Blask D.F., Brainard G.C. Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology // Cancer Causes Control. 2006.

17: 515-523.

3. *Knutsson A.* Health disorders of shift workers // *Occupat. Med.* 2003.53: 103-108.

4. *Бородин Ю.И.* Регионарный лимфатический дренаж и лимфодетоксикация. // *Морфология* 2005.128(4):25-28.

Borodin Yu.I. Regional lymphatic drainage and lymphodetoxication // *Morphology* 2005. 128(4):25-28.

5. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия. Москва: Медицина, 1990. 384.

Avtandilov G.G. Medical morphometry. Moscow: Medicine, 1990. 348.

6. *Мичурина С.В., Шурлыгина А.В., Белкин А.Д. и др.* Изменения печени и некоторых органов иммунной системы животных в условиях круглосуточного освещения // *Морфология* 2005. 128(4): 65-68.

Michurina S.V., Shurlygina A.V., Belkin A.D. et al. Changes in liver and in some organs of immune system of animals exposed to twenty-four-hour illumination // *Morphology* 2005. 128(4):65-68.

LYMPHATIC LIVER REGION OF WISTAR RATS EXPOSED TO ALCOHOLIC INTOXICATION COMBINED WITH TWENTY-FOUR-HOUR ILLUMINATION

Svetlana Viktorovna MICHURINA¹, Yuri Ivanovich BORODIN², Irina Yurievna ISCHENKO², Anatoliy Dmitrievich BELKIN¹, Anna Veniaminovna SHURLYGINA², Piter Mihailovich LARIONOV³

¹*Central Scientific Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospekt, Novosibirsk, 630091*

²*Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology of RAMS SB 4, Ac.Timakov str., Novosibirsk, 630117*

³*Federal State Institution Academician E.N.Meshalkin Novosibirsk State Research Institute Of Circulation Pathology Rusmedtechnology 15, Rechkunovskaya str., Russian Federation, Novosibirsk, 630055*

The aim of this research was to study the morpho-functional organization of liver in animals exposed to ethanol (15%; 1,5 ml, everyday, 28 days) (A) combined with twenty-four-hour illumination (CI). The light microscopy method was used, morphometric analysis of histological liver and regional lymph nodes preparations was performed. There was found that combined action A+CI resulted in disturbances of hemo- and lymphocirculation, marked dystrophic changes, increase of hepatocyte apoptose and strained state of connective tissue compartment. More over lymphoid cells migration into parenchyma of the organ was being for subsequent formation of temporary lymphoid tissue aggregations. Stimulation of B-dependent areas was found in the regional lymph nodes, that was considered as protective function intensification of all lymphoid system.

Key words: liver, lymph node, alcoholic intoxication, twenty-four-hour illumination.

Borodin Yu.I. — full member of the RAMN, directorate consultant

Michurina S.V. — professor, doctor in Medical Sciences, Head of Central Scientific Research Laboratory

Ischenko I.Yu. — candidate in Biological Sciences, senior research fellow,

Belkin A.D. — candidate in Medical Sciences, key research fellow, Central Scientific Research Laboratory, e-mail: ad_belkin@mail.ru

Shurlygina A.V. — professor, doctor in Medical Sciences, Head research fellow

Larionov P.M. — professor, doctor in Medical Sciences, Head of Experimental Surgery and Morphology Laboratory