

УДК 616-018.2:612.34/.35+616-008.852]-092.9

С.Б.Павлов,**О.Б.Літвінова,****Н.Г.Семко**Харківська медична академія
післядипломної освіти

ЗМІНИ СТАНУ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ І ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ТРОМБОЦИТІВ У ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПАТОЛОГІЇ ОРГАНІВ ПАНКРЕАТОДУОДЕНАЛЬНОЇ ЗОНИ

Ключові слова: сполучна тканина, панкреатодуоденальна зона, фіброз, агрегація тромбоцитів, оксипролін.

Резюме. У роботі наведено дані про взаємозв'язок морфофункціонального стану сполучної тканини паренхіматозних органів панкреатодуоденальної зони та характеру функціональної активності тромбоцитів у щурів із експериментальною моделлю хронічної патології панкреатодуоденальної зони. Виявлено деструктивно-дистрофічні зміни та фіброз, явища тканинного набряку, розширення і повнокров'я кровоносних судин та зміни агрегаційних властивостей тромбоцитів.

Вступ

Розвиток фібротичних змін панкреатодуоденальної зони обумовлено процесами, локалізованими у вогнищі запалення, а так само станом і реактивністю різних систем організму. Запальний процес супроводжується порушенням процесів проліферації, диференціювання і регенерації клітин паренхіматозних органів та змінами тромбоцитарної та коагуляційної ланок гемостазу [4]. Розвиток хронічного запалення паренхіматозних органів супроводжується надмірною продукцією позаклітинних матриксних протеїнів, зокрема колагену, що призводить до фіброзу. У відповідь на дію пошкоджуючого фактору відбувається збільшення продукції цитокінів. Надмірна кількість цитокінів, у свою чергу, активує профібротичні клітини, зокрема зірчасті клітини печінки і підшлункової залози, що призводить до збільшення продукції колагену, а в подальшому - до фіброзу цих органів [5].

Відзначено, що самі активовані зірчасті клітини здатні синтезувати цитокіни, що їх активують [6]. Це може свідчити про можливість постійної активації зірчастих клітин печінки та продукції ними колагену, що обумовлює прогресування фіброзу.

У той же час у процесах запалення важливу роль відіграють тромбоцити. Під впливом інтерлейкіну-1, фактору некрозу пухлини-а відбувається активація тромбоцитів з наступною продукцією факторів росту, що призводить до стимуляції колагеноутворення та запуску фібротичних процесів в органі [7, 8]. У свою чергу вивільнені із тромбоцитів речовини впливають на стан сполучної тканини і кровообіг у всьому організмі. Таким чином, під дією пошкоджуючого фактору відбувається виділення медіаторів

запалення, що активують як фізіологічну систему сполучної тканини (ФССТ), так і тромбоцитарну ланку системи гемостазу.

Крім того, внаслідок активації тромбоцитів порушується мікрогемодинаміка, змінюються властивості формених елементів крові, що поглиблює ступінь утворених порушень.

Відбувається зниження фізіологічних резервів організму, що може мати наслідком хронічні захворювання. Підсумовуючи аналіз літератури, можна припустити наявність взаємозв'язку між функціональною активністю тромбоцитів і розвитком фібротичних процесів за рахунок загальних механізмів регуляції реакцій системи сполучної тканини на пошкодження. Вивчення цього взаємозв'язку має істотне значення для подальшого з'ясування патофізіологічних механізмів захворювань, а також для діагностики та прогнозу стану хворих.

Мета дослідження

Встановити взаємозв'язок морфофункціонального стану сполучної тканини паренхіматозних органів панкреатодуоденальної зони та характеру функціональної активності тромбоцитів у щурів в умовах хронічної патології.

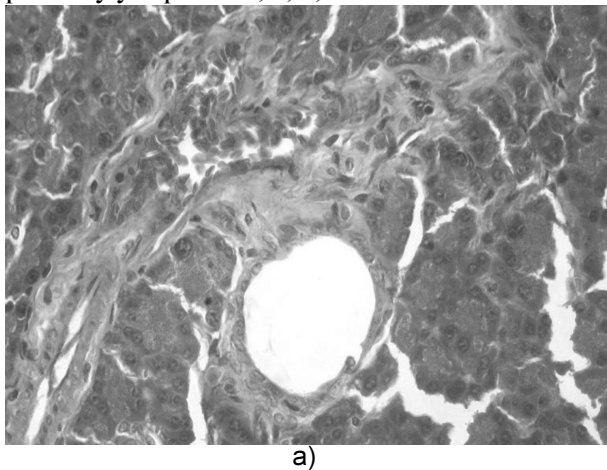
Матеріал і методи

Дослідження проводилося на двох групах (по 10 тварин) білих щурів самців у віці 6 міс. масою 210 + 30 г відповідно до принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) і "Спільними принципами експериментів на тваринах", схваленими I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Перша група - контрольна, була сформована з інтактних тварин. Тваринам другої експериментальної групи па-

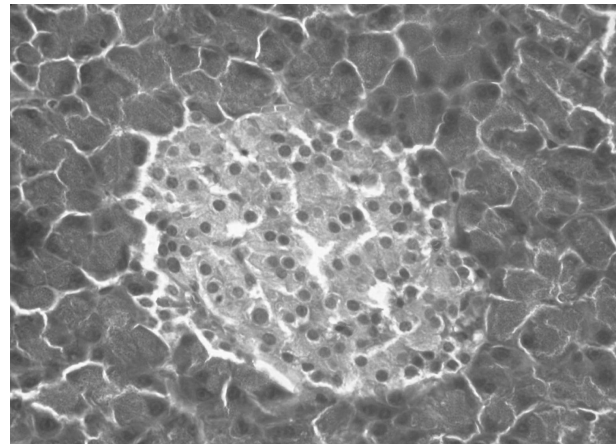
тологію моделювали за модифікованою методикою [3] шляхом введення в область проєкції панкреатодуоденальної зони 50% розчину медичної консервованої жовчі по 0,1 мл кожному щуру 2 рази на тиждень протягом 4 місяців (всього 30 ін'єкцій).

Кров для дослідження агрегації тромбоцитів брали із серця щурів під час виведення з експерименту. Індукована агрегація тромбоцитів досліджувалася із застосуванням комп'ютеризованого аналізатора агрегації тромбоцитів "SOLAR 2110" (Білорусь). Як індуктор агрегації використовували аденозиндифосфат (НБО "Ренам", Росія; далі АДФ) в концентрації 2,5 і 10,0 мкмоль/л. Запис агрегатограм проводився при 37°C протягом 10 хвилин. Подальший аналіз агрегаційної кривої містив визначення наступних показників: 1) ступеня агрегації - максимального % світлопропускання плазми; 2) часу досягнення максимальної швидкості агрегації - часу досягнення максимального % світлопропускання; 3) швидкості агрегації, що розраховується через 30 секунд після початку агрегації тромбоцитів.

Для вивчення показників метаболізму сполучної тканини визначали сумарний, вільний та зв'язаний оксипролін у сечі щурів за методикою П.Н. Шарасєва [2] перед початком і в ході експерименту у терміни 1, 2, 3, 4 міс.



а)



б)

Рис. 1 Фрагмент підшлункової залози щура. Явища тканинного набряку і повнокров'я. а) екзокринна частина; б) панкреатичний острівцев. Гематоксилін і еозин. Ок. 10[×], об. 40[×]

печінки щурів визначалися деструктивні зміни, які були пов'язані з порушенням радіального малюнка печінкових трабекул, явищами тканинного набряку з розширенням просторів Діссе. Гепатоцити втрачали полігональну форму, їх цитоплазма набувала зернистості. Визначалися клітини різних розмірів - від дрібних з невеликим ядром, яке вміщувало 1-2 ядерця, до великих набряклих гепатоцитів із нечіткими контурами. Спостерігалися значні території, на яких розміщувалися клітини на різних стадіях некрозу і клітинний детрит. Уздовж портальних трактів

Зразки тканин підшлункової залози і печінки фіксували в 10% нейтральному формаліні, заключали у парафін за загальноприйнятою методикою. Зрізи, завтовшки 4-6 мкм, фарбували гематоксилін-еозином та пікрофуксином за Ван-Гізоном [1]. Гістологічні препарати аналізували в полі зору мікроскопу "Micros MC50", фотовідбитки виконували за допомогою цифрової камери Canon A510.

Обробка результатів була проведена із застосуванням пакету статистичного аналізу Statistica 6.0. Відмінності між порівнюваними показниками вважали достовірними, якщо значення ймовірності було більше або дорівнювало 95% ($p < 0,05$).

Обговорення результатів дослідження

При гістологічному дослідженні підшлункової залози дослідних щурів з моделлю хронічної патології панкреатодуоденальної зони встановлені незначні зміни у структурі органа, а саме - явища тканинного набряку та повнокров'я, що свідчить про порушення регіонарного кровообігу. Підшлункова залоза мала типову часточкову будову, ацинозний малюнок був чітким. Панкреатичні острівці були представлені у достатній кількості, містили повнокровні капіляри (рис. 1 а, б).

При мікроскопічному аналізі препаратів

формувався прошарки сполучної тканини різної товщини, які чітко визначалися при фарбуванні пікрофуксином за Ван-Гізоном (рис.2). У всіх тварин поблизу деяких тріад виявлялися інфільтрати, які склалися з круглоклітинних елементів, плазматичів та еозинофілів, що свідчить про наявність запального процесу. По всій території печінки виявлялися розширені центральні вени, повнокровні внутрішньочасточкові капіляри, нерівномірність заповнення капілярних синусів клітинами крові.

Отже, моделювання хронічної патології

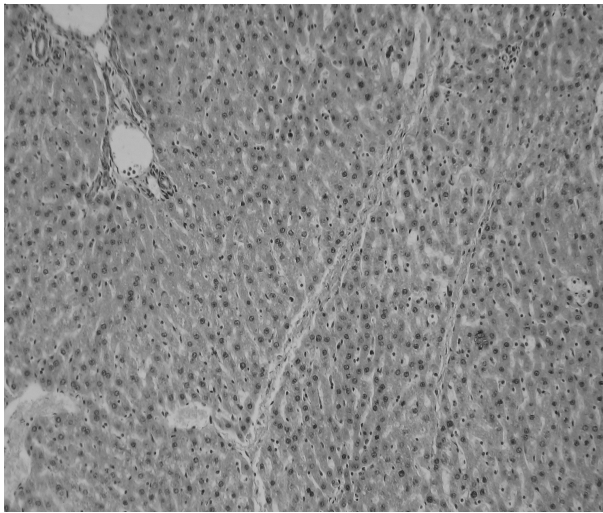


Рис. 2 Фрагмент печінки щура. Формування прошарків сполучної тканини. Порушення трабекулярної структури розташування гепатоцитів, розширені центральні вени. Ван Гізон. Ок.10х, об. 10х

панкреатодуоденальної зони введенням жовчі призводить до розвитку деструктивно-дистрофічних змін в першу чергу в печінці. У підшлунковій залозі тварин встановлено незначні зміни в структурі органу, що свідчать про порушення місцевого кровообігу.

При дослідженні рівня сумарного оксипроліну та його фракцій на всіх термінах експерименту визначалася тенденція до підвищення рівня сумарного оксипроліну у перший місяць після початку ін'єкцій, а потім до поступового його зниження на віддалених термінах. Це підвищення

більшою мірою відбувалося за рахунок зв'язаного оксипроліну і ймовірно може віддзеркалювати інтенсивний фіброгенез у відповідь на пошкодження. На віддалених термінах спостерігалася тенденція до зниження рівня зв'язаного і підвищення рівня вільного оксипроліну, що може свідчити про розпад надлишково вироблених, незрілих колагенових волокон. Однак статистично достовірних змін не було встановлено (табл. 1). Відсутність статистично значущих відмінностей дозволяє припустити, що порушення стану колагену, що спостерігаються при морфологічних дослідженнях, носять локальний характер і зачіпають тільки невелику частину сполучної тканини, а обмін її основної маси залишається в межах норми. Можна припустити, що таким чином відбувається дія компенсаторних механізмів у ФССТ на даному етапі розвитку експериментальної патології.

При дослідженні функціональної активності тромбоцитів щурів контрольної групи і щурів з моделюванням патології панкреатодуоденальної зони порівнювали спочатку при концентрації індуктора агрегації 2,5 мкмоль/л. При цьому виявилось, що ступінь агрегації у щурів із патологією був набагато нижчим, ніж у контролі. Нижче була і швидкість агрегації. Час досягнення максимальної швидкості агрегації при цьому був коротше даного показника щурів контрольної групи (табл.2).

Таблиця 1

Рівень оксипроліну в сечі щурів на різних термінах експерименту, мг/сут

Термін експерименту	Сумарний	Вільний	Зв'язаний
Вихідний	0,32±0,03	0,09±0,01	0,23±0,02
1 міс.	0,53±0,12	0,12±0,02	0,41±0,1
2 міс.	0,47±0,09	0,1±0,02	0,37±0,07
3 міс.	0,37±0,08	0,12±0,05	0,25±0,04
4 міс.	0,39±0,26	0,14±0,09	0,25±0,17

Порівняння параметрів агрегації цих груп щурів при концентрації АДФ 10,0 мкмоль/л показало відмінності за ступенем агрегації: нижчий показник знову був відзначений у щурів із патологією. Так само, як і при першій концентрації АДФ, коротше був час досягнення максимального ступеня агрегації. Лише швидкість агрегації при даній концентрації індуктора не відрізнялася від контрольної (табл.3).

Оскільки, порушення функції тромбоцитів проявляються у вигляді підвищеної або зниженої агрегаційної здатності у відповідь на дію сти-

муляторів агрегації, отримані дані можуть свідчити про такі порушення на віддаленому етапі моделювання хронічної патології панкреатодуоденальної зони. Зміни тромбоцитарної ланки гемостазу виражаються в ослабленні агрегаційної активності тромбоцитів у досліджуваному періоді.

Аналізуючи вищесказане, можна припустити, що в умовах експерименту на віддаленому етапі відбулися патологічні зміни, що на місцевому рівні виявляються у деструктивно-дистрофічних змінах та фіброзі у печінці і порушенні регіонарного

Таблиця 2

Зміни параметрів агрегації у щурів із експериментальною патологією при концентрації АДФ 2,5 мкмоль/л

Групи тварин	Параметри агрегації		
	Ступінь агрегації, %	Час досягнення максимальної швидкості агрегації, сек	Швидкість агрегації, %/мин
Контрольна	48,9±10,6	67,2 ±3,7	65,5±13,37
Експериментальна	2,77±1,28*	45,33±5,46	33,2±12,98*

Примітка: *- p<0,05 у порівнянні із контролем

Таблиця 3

Зміни параметрів агрегації у щурів із експериментальною патологією при концентрації АДФ 10,0 мкмоль/л

Групи тварин	Параметри агрегації		
	Ступінь агрегації, %	Час досягнення максимальної швидкості агрегації, сек	Швидкість агрегації, %/мин
Контрольна	87,3±10,27	270,4±32,25	79,5±10,43
Із експериментальною патологією	47,4±1,2*	76,0±19,0*	78,7±8,3

Примітка: *- p<0,05 у порівнянні із контролем

кровообігу органів панкреатодуоденальної зони. При цьому спостерігаються морфологічні зміни у стані сполучної тканини паренхіматозних органів при незміненому рівні показника її метаболізму - оксипроліну сечі. Це можна пояснити локалізованим характером пошкодження без залучення в патологічний процес всієї ФССТ і дією компенсаторних механізмів на віддаленому етапі експерименту. При цьому зниження функціональної активності тромбоцитів на цьому етапі моделювання хронічної патології панкреатодуоденальної зони відображає порушення реакції вивільнення тромбоцитарних факторів, що, в свою чергу, призводить до зниження колагеноутворення, яке відображає рівень оксипроліну (табл. 1).

Висновки

На віддаленому етапі хронічної експериментальної патології панкреатодуоденальної зони відбувається зниження агрегаційної активності тромбоцитів на тлі локалізованих змін сполучної тканини паренхіматозних органів. Достовірно не змінені рівні фракцій оксипроліну вказують на те, що на даному етапі немає переважання процесів

синтезу або розпаду колагену у системі сполучної тканини. У той же час початкові процеси ремоделювання тканин печінки і підшлункової залози, зміни в агрегаційних властивостях тромбоцитів свідчать про напруженість компенсаторних механізмів, які забезпечують регенерацію і збереження функцій даних органів.

Перспективи подальших досліджень

Результати досліджень по визначенню рівня оксипроліну та функціональної активності тромбоцитів у перспективі можуть бути використані для розширення області критеріїв діагностики захворювань панкреатодуоденальної зони та прогнозування їх перебігу.

Література. 1.Саркисов Д., Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю.Л. Перова. - М.: Медицина, 1996. - 542с. 2.Шараев П.Н., Определение свободного и связанного оксипролина в моче / П.Н. Шараев, Е.А. Ботникова, В.М. Иванова и др. // Лаб. дело. - 1990. - № 12. - С.23-25. 3.Aho HJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischaemia and oedema after intraductal sodium taurocholate injection / HJ Aho, TJ Nevalainen, AJ Aho // Eur Surg Res. - 1983. - Vol.15(1). - P. 28-36. 4.Ghoshal K. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis / K Ghoshal, M Bhattacharyya // Sci World J. - 2014. - Vol. 2014.

- Article ID 781857, 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/781857>. 5. Gutierrez-Ruiz M.C. Liver fibrosis: searching for cell model answers / M.C. Gutierrez-Ruiz, L.E. Gomez-Quiroz // *Liver Intern.* - 2007. - Vol. 10. - P. 434-439. 6. Koyama Y. Stellate Cells, Portal Myofibroblasts, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. In: *Stellate Cells in Health and Disease* / Y Koyama, P Wang, DA Brenner [et al.]. - Pinzani: Academic Press, 2015. - pp. 87-106. 7. Papatheodoridis G. Thrombotic risk factors and liver histologic lesions in non-alcoholic fatty liver disease. / G. Papatheodoridis, N Chrysanthos, E Cholongitas [et al.] // *J Hepatol.* - 2009. - Vol. 51(5). - P. 931-938. 8. Zarbock A. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation / A Zarbock, RK Polanowska-Grabowska, K Ley // *Blood Rev.* - 2007. - Vol. 21. - P. 99-111.

**ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ
ТКАНИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ТРОМБОЦИТОВ У КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ
ПАТОЛОГИИ ОРГАНОВ
ПАНКРЕАТОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ**

С.Б.Павлов, О.Б.Литвинова, Н.Г.Семко

Резюме. В работе приведены данные о взаимосвязи морфофункционального состояния соединительной ткани паренхиматозных органов панкреатодуоденальной зоны и характера функциональной активности тромбоцитов у крыс с экспериментальной моделью хронической патологии панкреатодуоденальной зоны. Выявлено деструктивно-дистрофические изменения и фиброзе, явления тканевого отека, расширение и полнокровие кровеносных сосудов и изменения агрегационных свойств тромбоцитов.

Ключевые слова: соединительная ткань, панкреатодуоденальная зона, фиброз, агрегация тромбоцитов, оксипролин.

**CHANGES OF THE STATE OF THE CONNECTIVE
TISSUE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PLATELETS
IN RATS AT MODELING PATHOLOGY OF ORGANS
OF PANCREATODUODENAL ZONE**

S.B.Pavlov, O.B.Litvinova, N.H.Semko

Abstract. The development of chronic inflammation of parenchymal organs is accompanied by increased synthesis of cytokines that activate stellate cells of the liver and pancreas, leading to an increase in the collagen production, and eventually to fibrosis of organs. At the same time, under the influence of pro-inflammatory cytokines activation of platelets with subsequent production of growth factors occurs that leads to the stimulation of collagen formation and beginning of fibrotic processes in the body. Release of inflammatory mediators activating both as physiological system of the connective tissue and platelet hemostasis occurs under the effect of damaging factor. The aim of the study was to investigate the relationship of morpho-functional state of the connective tissue of parenchymal organs in pancreatoduodenal zone and the nature of the functional activity of platelets in rats with chronic pathology.

On the distant stage of chronic experimental pathology of pancreatoduodenal zone morphological changes in the state of the connective tissue of parenchymal organs at a constant level of indicator of its connective tissue metabolism - urinary hydroxyproline took place. Level of hydroxyproline fractions were not significantly changed. This indicates that, at this stage there is no predominance of processes of synthesis or breakdown of collagen in the connective tissue. At the same time, initial processes of remodeling of the liver and pancreas tissue, changes in platelet aggregation testify about the intensity of compensatory mechanisms that ensure the regeneration and conservation functions of these bodies. Thus, on the distant stage of the experiment a damages parenchymatous organs of pancreatoduodenal zone have a local character and do not involve the entire system of the connective tissue into the pathological process.

Key words: connective tissue, pancreatoduodenal zone, fibrosis, platelet aggregation, hydroxyproline.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, №2 (52). - P. 139-143.

Надійшла до редакції 15.05.2015

Рецензент – проф. І.С. Давиденко

© С.Б.Павлов, О.Б.Литвинова, Н.Г.Семко, 2015