

ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 616-001.17-08

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ПОРУШЕННЯ НЕРВОВИХ ВОЛОКОН МОЗКОВОЇ РЕЧОВИНИ НАДНИРКОВОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ОПІКОВІЙ ТРАВМІ

Титаренко В.М.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Регенерація при опіковій травмі є актуальною проблемою. Поліорганні порушення при термічному ураженні покриву викликають дистрофічні зміни надниркової залози. На ультраструктурному рівні встановлено еритроцитарний стаз і дилатацію гемокапілярів, проникнення дериватів некротизованих клітин в мікроциркуляторне русло, паравазальний набряк, дистрофічні зміни ендотелію, дезгрануляцію і подальшу активацію синтезу катехоламін-вмісних секреторних гранул норегінефроцитів та епінефроцитів, пошкодження мієлінових оболонок симпатичних нервових волокон. Введення кверцетину і маннітолу зменшувало ступінь набряку хромафінної тканини, мало цитопротекторний вплив на нервові волокна і ендотелій гемокапілярів мозкової речовини надниркової залози.

Ключові слова: надниркова залоза, опікова травма, ультраструктура, кверцетин, маннітол.

Вступ. Травматичне і термічне ураження спричинює розвиток стресової, гормональної і функціональної відповіді гіпофізарно-адреналової системи [1]. Дослідженню реакції кіркової і мозкової речовини надниркової залози присвячено ряд наукових робіт, зокрема морфологічним змінам органу при опіковій травмі [2, 3, 4]. Разом з тим елементам симпатичних нервових волокон в наднирковій залозі, їх структурним змінам та відновленню на тлі опікової травми не приділялась увага. Зважаючи на це метою дослідження було дослідити ультраструктурні порушення представництва симпатичної нервової системи у наднирковій залозі у різні терміни опікової травми і їх цитопротекції на тлі патогенетичної фармакокорекції.

Матеріал і методи.

Дослідження проведено на 95 щурах-самцях масою 205-260 г. Тварин утримували за умов постійного доступу до стандартного гранульованого комбінованого корму та питної води, при контрольованих умовах температури ($22,0 \pm 3,0^\circ\text{C}$), вологості ($55,0 \pm 5,0\%$) і періодизації світлового дня.

В залежності від мети та задач дослідження тварини були розділені на 5 дослідних груп:

- 1) група 1 – контрольна група інтактних щурів ($n=5$);
- 2) група 2 – дослідна група щурів, яким моделювали локальний термічний опік ($n=30$);
- 3) група 3 – дослідна група щурів, яким моделювали термічний опік і вводили маннітол (D-маннітол, інтраперитоніально, 100 мг/кг) ($n=20$);
- 4) група 4 – дослідна група щурів, яким моделювали термічний опік і вводили кверцетин (інтраперитоніально, 100 мг/кг) ($n=20$);

5) група 5 – дослідна група щурів, яким вводили комбінацію маннітолу і кверцетину після моделювання термічного опіку (інтраперитоніально, 100 мг/кг) ($n=20$).

Моделювання термічного опіку

В дослідженні застосовано модель локального термічного опіку, що полягає у прикладанні до бічних поверхонь тулуба тварин чотирьох мідних пластинок (по 2 пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом шести хвилин у воді з постійною температурою 100°C . Перед моделюванням термічного опіку дослідних тварин здійснювали премедикацію шляхом введення тіопенталу натрію (і.р., 60 мг/кг), попередньо видаляли шерсть в ділянці спини, окреслювали межу, на якій планується нанесення опіку. Ретельна депіляція шкіри особливо необхідна, тому що навіть коротко обстрижена шерсть різко перешкоджає прогріванню тканин при дії термічного агента.

Опік, отриманий описаним вище способом, супроводжується формуванням сухого коагуляційного некрозу шкіри без загибелі поверхневого шару м'язів. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складала 21-23% при експозиції 10 сек., що є достатнім для формування опіку II ступеня – термального поверхневого опіку (колишній III А ступінь) та розвитку шокового стану середнього ступеня важкості. Чітка межа некрозу починає простежуватися з 3-5 доби експерименту. Шкіра в ділянках некрозу повністю втрачає свою структуру, поверхневі м'язи зберігають структуру, а підшкірна клітковина заміщується щільною волокнистою тканиною. Починаючи з 10-13 доби реєструється крайова епітелізація зони термічного пошкодження шкіри.

Після моделювання опіку щоденно вводили лікарські засоби з урахуванням дозування та періоду виведення щурів із експерименту залежно до мети та задач дослідження. Кверцетин вводили у дозі 50 мг/кг, 15%-розчин маннітолу у об'ємі 2,5 мл/кг (0,4 г/кг) згідно рекомендацій, що наведені у фаховій науковій літературі [5,6].

Електронномікроскопічне дослідження

Через 3, 7, 14, 21 і 30 добу після опіку здійснювали забір лівої і правої надниркової залози для електронномікроскопічного дослідження. Для гуманного виведення щурів із експерименту тваринам інтраперитоніально вводили тіопентал натрію в дозі 70 мг/кг. Фрагменти мозкової речовини фіксували 2,5% розчином глутарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією у 1% забуференому розчині чотирьохокису осмію. Зневоднювання проводили у спиртах зростаючої концентрації (70%, 80%, 90%, 100%) та ацетоні. Просочували та заливали у суміш епон-аралдит, згідно загальноприйнятій методиці. Для прицільної орієнтації напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім, після чого на ультратомі LKB III (Швеція) та Reihart (Австрія) виготовляли ультратонкі зрізи. Контрастування проводили 2% розчином уранілацетату та цитратом свинцю. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом Tescan Mira 3 LMU (Чехія) при збільшеннях в 6–70 тисяч.

Морфометричне і статистичні дослідження

Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1). Порівняння отриманих результатів здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента та U-критерію Манна-Уїтні. Рівень статистичної значущості був встановлений на рівні $P < 0,05$.

Біоетика

Всі експериментальні маніпуляції із дослідними тваринами проведено із дотриманням положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, відповідно до протоколів "Regulations on the animal use of in research biomedical research", "European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes", "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", що використовуються в експериментальних наукових дослідженнях.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені нами електронномікроскопічні дослідження показали основні прояви ультраструктурних порушень мозкової речовини надниркової залози на тлі опікової травми (група 2). Характерними порушеннями були різка дилатація гемокапілярів, поява продуктів розпаду ушкоджених і некротизованих клітин в просвіті мікросудин, висока електронна щільність плазми крові в мікросудинах, еритроцитарних стаз, периваскулярний набряк, набряк та фрагментація мітохондрій ендотеліоцитів, норепінефроцитів і епінефроцитів. В останніх встановлено різку дегрануляцію із подальшою активацією репродукції катехоламін-вмісних секреторних гранул. Виражену динаміку ультраструктурних порушень реєстрували з 3 по 21 добу.

Дистрофічні зміни на рівні нервових волокон надниркової залози полягали у набряку та деструкції осьового циліндра, ламелярному набряку і розшаруванні мієлінової оболонки (рис. 1). Ультраструктурні зміни нейролемоцитів включали в себе набряк цитоплазми та мітохондрій, збільшення об'єму та фрагментації цистерн ендоплазматичної сітки, регрес кількості рибосом та полісом. Ядра нейролемоцитів мали різко збільшений перинуклеарний простір, відмічено порушення ядерних пор та контуру зовнішньої ядерної мембрани. Встановлені порушення свідчать про наявність трофічної недостатності на тлі опіку. Морфометричне дослідження засвідчило збільшення товщини структурно ушкоджених мієлінових оболонок нервових волокон (табл. 1). Пік набряку та розшарування ламел мієліну зареєстровано на 7 добу опіку, що співпадало з рівнем дистрофічних змін мікросудин, епінефроцитів та норепінефроцитів. Ультраструктурні і морфометричні дослідження показали системний характер розвитку морфологічних порушень мозкової речовини надниркової залози при опіковій травмі. При цьому елімінація структурно уражених органел та клітин реалізувалася шляхом аутофагії. Як відомо, аутофагія є одним із способів позбавлення клітин ушкоджених і нефункціональних органел, а також для отримання необхідних метаболітів за умов їх дефіциту. Гіперпродукція продуктів аутолізу також є одним із проявів і причин розвитку клітинної дисфункції [7,8]. Поява значної кількості аутофагосом у фібробластах також може свідчити про активацію ендогенних механізмів репарації надниркової залози після опіку.

Проведені експериментальні та ультраструктурні дослідження показали порушення мікроциркуляції, структурної організації мікроциркуляторного русла і спричинені цим дистрофічні зміни хромафінної тканини надниркової залози. Зважаючи на це постала необхідність дослідити можливість потенційного відновлення регіонарної мікроциркуляції з метою збільшення перфузії та оксигенації надниркової залози з метою запобігання та зменшення розвитку поліорганної недостатності. Для відновлення реологічних показників крові на тлі опіку, відновлення мікроциркуляції та зменшення розвитку периваскулярного набряку застосовували органічний спирт манніт (маннітол) [9,10]. Для утилізації гіперпродукції вільних радикалів (пероксиду водню, супероксидрадикалу, пероксинітриду) і зменшення оксидативного стресу клітин хромафінної тканини застосували флавоноїд кверцетин [11].

У групі 3, 4 і 5 відмічено зменшення дистрофічних змін ендотелію гемокапілярів, епінефроцитів і норепінефроцитів. В гемокапілярах із значною плазмозовною щільністю протеїнових коагулятів відмічено еритроцитарний стаз. Інтерстиційний простір характеризувався зменшенням ступеню набряку хромафінної тканини. В цитоплазмі епінефроцитів реєстрували структурно неушкоджені мітохондрії, збільшення щільності електроннощільних секреторних гранул. Цистерни ендоплазматичної сітки мали ознаки набряку та фрагментації з формуванням вакуолей. Епінефроцити та норепінефроцити щільно контактували між собою та з фібробластами, порушення

Зміни товщини мієлінової оболонки нервових волокон мозкової речовини надниркової залози, мкм

Група	Доба спостереження					
	1	3	7	14	21	30
1	Контроль					
	0,34±0,01					
2	0,43±0,01 *	0,47±0,03 *	0,73±0,05 *	0,56±0,05 *	0,49±0,03 *	0,44±0,03 *
3	0,52±0,02 *#	0,55±0,03 *#	0,54±0,04 *#	0,50±0,04 *	0,35±0,01 #	0,35±0,01 #
4	0,56±0,04 *#	0,67±0,03 *#	0,53±0,03 *#	0,54±0,05 *	0,53±0,05 *	0,51±0,05 *
5	0,38±0,01 #	0,35±0,01 #	0,58±0,01 *#	0,51±0,01 *	0,46±0,01 *	0,41±0,01 *

Примітка: * - достовірно до групи 1 ($p < 0,05$); # - достовірно до групи 2 ($p < 0,05$)

міжклітинних контактів не відмічено. За рівнем зазначених ультраструктурних змін найбільш виражений корегуючий вплив встановлено у групі 5, тобто при комбінованому введенні маннітолу та кверцетину.

Крім мікроциркуляторного русла та ендокриноцитів між структурними елементами інтерстицію хромафінної тканини реєстрували нервові волокна, що в більшій мірі були представлені мієліновим типом (рис. 2,3). У групах із фармакокорекцією (групи 3, 4 і 5) рівень набряку мієлінових оболонок нервових волокон був меншим порівняно до групи 2, що мало відображення у зменшенні товщини структурно порушеної мієлінової оболонки (рис. 4, 5). Відмічено статистичні розбіжності між групами порівняння, проте загальна динаміка проявів гідропічної дистрофії була значно меншою, що відобразилось у

кількісних показниках товщини мієлінової оболонки. При цьому значення досягали рівня контрольної групи лише при комбінованому введенні маннітолу з кверцетином на 30 добу спостереження.

Нервові волокна були щільно організовані в інтерстиційній стромальній тканині надниркової залози, взаємодіють з оточуючими нейролемоцитами. Мієлінові оболонки у терміни 7-30 доби без ознак різкого набряку та розшарування ламел мієлінової оболонки. Лише в окремих нервових волокнах реєстрували фокальне порушення контакту аксолеми з мієліновою оболонкою. Безмієлінові нервові волокна також характеризувалися відновленням ультраструктури цитоскелету та мітохондрій, що свідчить про цитопротекторний вплив маннітолу і кверцетину при опіковій травмі (рис. 6). Разом з тим

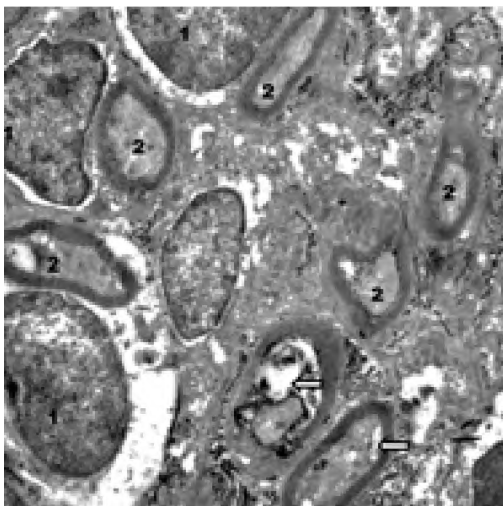


Рис. 1. Дистрофічні зміни нервових волокон мозкової речовини надниркової залози. Відшарування мієлінової оболонки від осевого циліндра, гострий набряк нейролемоцитів. Умовні позначення: 1 – ядра нейролемоцитів; 2 – мієлінові нервові волокна; ← відшарування мієлінової оболонки від осевого циліндра. Термін спостереження: 21 доба. Електронограма Ч 29400.

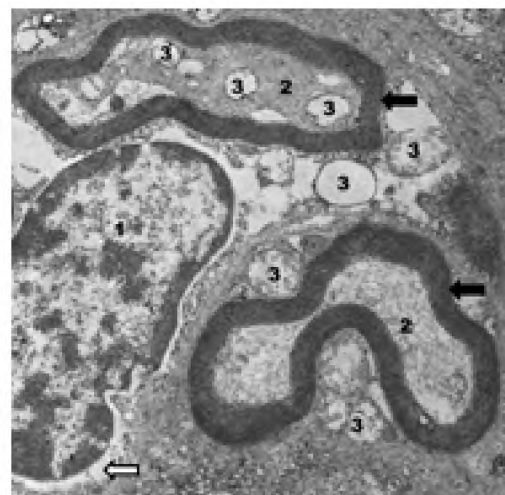


Рис. 2. Ультраструктура нервових волокон мозкової речовини надниркової залози при термічному опіку та застосуванні кверцетину. Набряк мітохондрій осевих циліндрів, структурно неушкоджена мієлінова оболонка, набряк цитоплазми нейролемоцита. Умовні позначення: 1 – ядро нейролемоцита; 2 – осевий циліндр нервового волокна; 3 – ушкоджені мітохондрії; ← набряк перинуклеарного простору; → мієлінова оболонка. Термін спостереження: 1 доба. Електронограма Ч 24200.

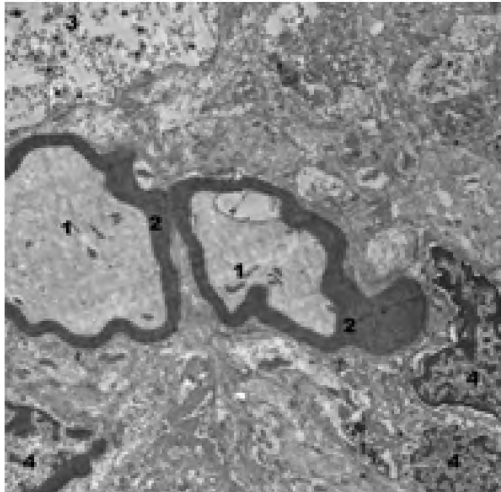


Рис. 3. Ультраструктурні зміни хромафінної тканини надниркової залози при введенні комбінації кверцетину і маннітолу на тлі термічного опіку. Набряк периваскулярного інтерстиційного простору, структурно неушкоджені мієлінові нервові волокна. Умовні позначення: 1 – осьовий циліндр мієлінового волокна; 2 – мієлінова оболонка; 3 – просвіт гемокapіляра; 4 – ядро фібробласта. Термін спостереження: 3 доба. Електронोगрама x14300.

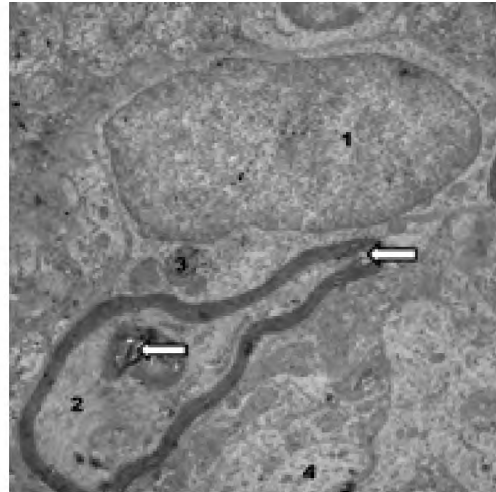


Рис. 4. Зміни ультраструктурної організації нервових волокон хромафінної тканини при термічному опіку та застосуванні кверцетину. Активований нейролемоцит, фокальний набряк та розширення мієлінової оболонки нервового волокна. Умовні позначення: 1 – ядро нейролемоцита; 2 – осьовий циліндр нервового волокна; 3 – аутофagosома; 4 – безмієлінове волокно; \rightleftarrows розширення ламел мієлінової оболонки. Термін спостереження: 7 доба. Електронोगрама x22500.

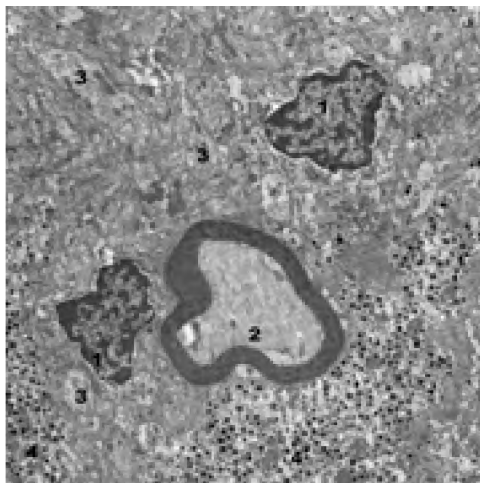


Рис. 5. Зміни нервових елементів хромафінної тканини при термічному опіку та застосуванні кверцетину. Фокальне відшарування аксолеми від мієлінової оболонки, збільшення перинуклеарного простору ядер нейролемоцитів, кількісне відновлення гранул епінефроцитів. Умовні позначення: 1 – ядро нейролемоцита; 2 – осьовий циліндр нервового волокна; 3 – безмієлінове волокно; 4 – епінефроцит. Термін спостереження: 30 доба. Електронोगрама x16200.

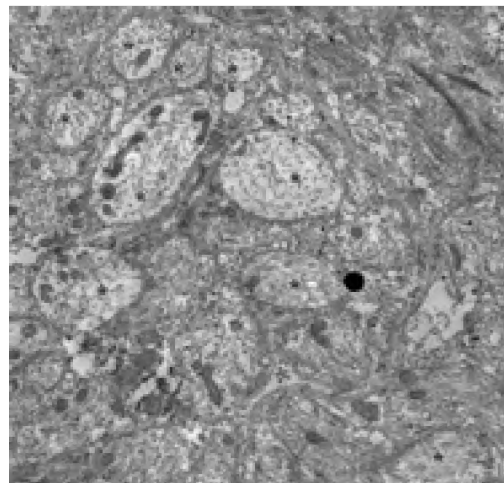


Рис. 6. Кластер безмієлінових нервових волокон хромафінної тканини при введенні комбінації кверцетину і маннітолу на тлі термічного опіку. Структурно неушкоджені нервові волокна (*). Термін спостереження: 21 доба. Електронोगрама x31000.

ядра нейролемоцитів мали деформований контур нуклеолеми з ознаками незначного набряку перинуклеарного простору, цілісність ядерної оболонки залишалася непорушеною, що також свідчить про ураження досліджуваних клітин.

Таким чином, узагальнюючи результати електронно-мікроскопічного та морфометричного дослідження можна стверджувати про позитивний вплив застосованих

лікарських засобів на темпи розвитку морфологічних змін мозкової речовини надниркової залози та особливості її післяопікової репарації. Проявом дії маннітолу було зменшення периваскулярного та інтерстиційного набряку, збільшення числа структурно збережених та функціонально активних гемокapілярів, зменшення рівня насиченості плазми крові продуктами клітинного аутолізу та некрозу, що в загальному плані сприяло відновлен-

ню регіонарної гемодинаміки. Кверцетин позитивно вплинув на стабілізацію мембранних структур, зменшував ультраструктурні порушення органел, тобто здійснював цитопротекторну дію. Всі вищевикладені факти дозволяють припустити, що комбінація маннітолу та кверцетину покращує мікроциркуляторні процеси та впливає на процеси перекисидатії в уражених тканинах, тим самим здійснюючи реологічну, антиоксидантну та мембранопротекторну дію при термічному опіку, сприяє відновленню ендогенних адаптаційних і репаративних процесів, пригнічує прогресивний розвиток поліорганної недостатності і прискорює процеси структурного та функціонального відновлення ураженого органу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Морфологічні зміни гіпофізарно-адренової системи щурів при термічній травмі / Ковальчук О.І., Черкасов В.Г., Дзевульська І.В., [і ін.] // УНММЖ. – 2015. – № 1(86). – С. 10-16.
2. Структурные особенности адаптации и компенсации нарушенных функций внутренних органов при инфузионной терапии ожоговой болезни // Черкасов В. Г., Ковальчук А. И., Дзевульская И. В., [и др.] // Мир медицины и биологии. – 2014. – Т. 10, № 4-1 (46). – С. 165-170.
3. A Study of Histopathological Changes of Suprarenal Glands in Cases of Ante-mortem Burn Deaths / Raihan Uddin Ahmed,

H.K. Mahanta // J. Indian Acad. Forensic. Med. – 2015. – Vol. 37(1). – P. 62-64.

4. Low-dose hydrocortisone reduces norepinephrine duration in severe burn patients: a randomized clinical trial // Venet F., Textoris J., Cazalis M. [et al.] // Crit. Care. – 2015. – Vol. 19(1). – P. 21.

5. Quercetin inhibits the cytotoxicity and oxidative stress in liver of rats fed aflatoxin-contaminated diet / Aziza A. El-Nekeety, Sekena H. Abdel-Azeim, Aziza M. [et al.] // Toxicology Reports. – 2014. – Vol. 1. – P. 319-329.

6. Mannitol-enhanced delivery of stem cells and their growth factors across the blood-brain barrier / Gonzales-Portillo G.S., Sanberg P.R., Franzblau M. [et al.] // Cell Transplant. – 2014. – Vol. 23(4-5). – P. 531-539.

7. Autophagy in the endocrine glands / Weckman A., Di Ieva A., Rotondo F. [et al.] // J Mol Endocrinol. – 2014. – Vol. 52(2). – P. 151-163.

8. Dehydroepiandrosterone prevents linoleic acid-induced endothelial cell senescence by increasing autophagy / Lee M.J., Kim E.H., Lee S.A. [et al.] // Metabolism. – 2015. – Vol. 64(9). – P. 1134-1145.

9. Effect of mannitol on serum tumor necrosis factor- β and interleukin-6 levels and the mechanism of its organ-protective effect in rabbits early after severe burn injury / Liang R., Rong X., Zhang T. [et al.] // Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. – 2013. – Vol. 33(4). – P. 598-602.

10. Sanford A., Gamelli RL. Lightning and thermal injuries. // Handb Clin Neurol. – 2014. – Vol. 120. – P. 981-986.

11. New Potential Pharmaceutical Applications of Hypericum Species. Marrelli M., Statti G., Conforti F., Menichini F. // Mini Rev Med Chem. – 2016. – Vol. 16(9). – P. 710-720.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ

Титаренко В.Н.

Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, г.Киев, Украина

Регенерация при ожоговой травме является актуальной проблемой. Полиорганные нарушения при термическом поражении наружного покрова вызывают дистрофические изменения надпочечников. На ультраструктурном уровне установлены эритроцитарный стаз и дилатация гемокапилляров, проникновение дериватов некротизированных клеток в микроциркуляторное русло, паравазальной отёк, дистрофические изменения эндотелия, дегрануляция и последующая активация синтеза катехоламин-содержащих секреторных гранул нореpineфроцитов и еpineфроцитов, повреждение миелиновых оболочек симпатических нервных волокон. Введение кверцетина и маннитола уменьшало степень отёка хромафинной ткани, имело цитопротекторное влияние на нервные волокна и эндотелий гемокапилляров мозгового вещества надпочечников.

Ключевые слова: надпочечники, ожоговая травма, ультраструктура, кверцетин, маннитол.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF NERVE FIBERS IN ADRENAL MEDULLA AT BURN INJURY

V.N. Tytarenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Regeneration at burn injury is an actual problem. Multiple organ disorders in thermal cover lesions cause degenerative changes in the adrenal gland. At the ultrastructural level we were set erythrocyte aggregation and stasis, dilatation of hemocapillaries, penetration of derivatives necrotic cells in microvessels, paravasal swelling, degenerative changes of endothelium, degranulation and subsequent activation of the synthesis of catecholamine-containing secretory granules in norepinephrocyte and epinephrocyte, disruption of sympathetic myelinated nerve fibers. Mannitol and quercetin application reduced the degree of swelling in chromaffin tissue; promote protective effects on nerve fibers and endothelium of hemocapillaries in adrenal medulla.

Keywords: adrenal gland, burn injury, ultrastructure, quercetin, mannitol