

I.V. Твердохліб<sup>1</sup>  
Д.Ю. Зіненко<sup>2</sup>


<sup>1</sup> ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро  
<sup>2</sup> КНП «Міська клінічна лікарня №16» КМР, Кривий Ріг, Україна

Надійшла: 09.11.2020  
Прийнята: 17.12.2020

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.4.79-89>

УДК: 616.361-007.272:616.37:616-005

## УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЕМОМІКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ТА ПАРЕНХІМАТОЗНО- СТРОМАЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ПЕЧІНКИ В МОДЕЛІ ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ ДОЗ L- АРГІНІНУ

Tverdokhlib I.V. , Zinenko D.Yu. ✉ **Ultrastructure of the hemomicrocirculatory bed and parenchymatous-stromal elements of the pancreas and liver in a model of acute pancreatitis using different doses of L-arginin.** SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine».

**ABSTRACT. Background.** The development of acute pancreatitis is not limited to isolated damage to the pancreas. After creating models of acute pancreatitis using various substances that enhance the secretion of the gland, have a toxic or local activating effect, the researchers showed their dose-dependent effect. The question of the reaction of the hepatic microcirculation system during the development of acute pancreatitis, as well as their pathogenetic significance in the development of pathomorphological changes in the pancreas and liver in most aspects remains open. **Objective.** The purpose of the current study was to define the role of the hepatic microcirculation in development of ultrastructural parenchymatous-stromal changes of the pancreas and liver in a model of acute pancreatitis using different doses of L-arginin. **Methods.** The variants of acute pancreatitis model were used with injection of L-arginin in dosage 3 g/kg; 4 g/kg and 5 g/kg. The morphological research of pancreas and liver were carried out in 1, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after initiation of inflammation. **Results.** The visible reaction of hepatic microcirculation in the experimental model of acute pancreatitis was depended on character of pathomorphological changes in pancreas. This reaction demonstrated the phase character including: 1) activation of hepatic circulation, first of all in portal component, against a background of pancreatic enzyme toxemia; 2) development of inflammatory, dystrophic, destructive and necrotic changes in hepatic parenchyme together with microcirculation disorders against a background of pancreatic necrotic toxemia; 3) recovery and adaptation or decompensation processes in microcirculation system of liver and hepatic parenchyme depending on the degree of pancreatogenic toxemia. **Conclusion.** Within 72 hours of the experiment, at the lowest and middling doses of L-arginin, in the context of reduction of acute pancreatitis, there is a gradual renovation of the structure of the microvessels and normalization of the microcirculation of the liver. In the maximum doses L-arginin cause degradation of the liver microvessels with the progression of hemorrhages, slit red blood cells and platelet aggregation, which causes blockage of the microcirculation and the development of necrotic changes in the hepatic parenchyme.

**Key words:** model of acute pancreatitis, rats, pancreas, liver, microcirculation, ultrastructure.

### Citation:

Tverdokhlib IV, Zinenko DYu. [Ultrastructure of the hemomicrocirculatory bed and parenchymatous-stromal elements of the pancreas and liver in a model of acute pancreatitis using different doses of L-arginin]. Morphologia. 2020;14(4):79-89. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.4.79-89>

 Tverdokhlib I.V. 0000-0002-8672-3773

✉ [d.zinenko0606@gmail.com](mailto:d.zinenko0606@gmail.com)

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

### Вступ

Протягом останніх 10 років гострий панкреатит (ГП) стабільно посідає третє місце в структурі гострої абдомінальної патології, причому близько 70 % хворих на ГП складають особи ак-

тивного працездатного віку. Печінка виявляється першим органом-мішенню, на який доводиться головний удар панкреатогенної токсемії у вигляді активованих панкреатичних і лізосомальних ферментів, біологічно активних речовин, токсич-

чних продуктів розпаду паренхіми підшлункової залози при некробіозі і активації калікреїн-кінінової системи. Така агресія ендотоксинів викликає зміни гістоструктури гепатоцитів, інтенсивності синтезу ДНК в гепатоцитах і їх проліферації, а також вмісту в них глікогену, блокаді метаболізму гепатоцитів вже на ранніх стадіях розвитку гострого панкреатиту. Значне місце належить також апоптотичним процесам [1-3]. Сучасні технології інтенсивної терапії й оперативного лікування дозволили досягти значного прогресу, проте й на сьогодні загальна летальність при ГП складає 6,4 %, сягаючи 35-50 % при деструктивних формах, що свідчить про невирішеність проблеми лікування хворих даного контингенту [4].

В основі підвищення ефективності лікувальних заходів при ГП лежить тісна взаємодія між клініцистами і дослідниками в різних експериментальних напрямках. З боку практичної панкреатології активно зростає інтерес до результатів прямих морфологічних досліджень, проведених із використанням модельних дослідів. Численними дослідженнями детально описано три головні рівні проявів у розвитку ГП: ураження ацинуса (тканинний рівень), локальних змін у залозі (органний рівень) і системні прояви (рівень організму). Також доведено, що провідна роль у формуванні патоморфологічних змін паренхіми ПЗ і печінки на тлі ГП належить раннім циркуляторним реакціям [5-8], проте й досі відомості про послідовність структурних і функціональних перебудов системи мікроциркуляції залишаються фрагментарними, а часто й протилежними одне одному [9-14].

Отже, питання про реакції системи мікроциркуляції під час розвитку ГП, а також про їх значення у формуванні патологічних змін ПЗ і печінки у переважній більшості морфологічних аспектів залишається відкритим, що обумовлює актуальність і напрямок даного дослідження.

**Мета дослідження** – визначити роль печінкової мікроциркуляції в розвитку ультраструктурних змін паренхіматозно-стромальних елементів ПЗ і печінки під час розвитку експериментального ГП з використанням різних доз L-аргініну.

#### **Матеріали та методи**

Статевозрілі щури-самці лінії Wistar (вага 150–200 г) утримувалися при звичайних умовах (вільний доступ до їжі й води, температура повітря 22-24°C). Для вивчення патоморфологічних змін у ПЗ і печінці внаслідок ГП після нічного голодування щурам одноразово інтраперитонеально вводили розчин L-аргініну в дозах 3 г/кг 4 г/кг і 5 г/кг у 0,2 мл фізіологічного розчину в ліву нижню частину черевної порожнини. Для контрольних тварин використовували відповідний об'єм фізіологічного розчину. Експеримент виконувався згідно з рекомендаціями С.Н. Kubisch

зі співавторами [15]. Тварин мертили за допомогою ефірного наркозу через 1, 4, 8, 12, 24, 48 та 72 години після ін'єкції.

Експеримент відповідав вимогам Закону України №3447-І від 21.02.06 р. „Про захист тварин від жорстокого поводження”. Тканину ПЗ і печінки використовували для ультраструктурного дослідження. Для аналізу стану ПЗ окремо висікали ділянки голівки (дуоденальної частини) та хвоста (гастролієнальної частини) залози.

Для ультраструктурного аналізу зразки ПЗ і печінки протягом 2 годин фіксували при +2°C в 2,5%-ному розчині глутарового альдегіду, виготовленому на 0,2М фосфатному буфері (рН 7,4). Матеріал переносили для постфіксації в 1%-ний забуферений (рН 7,4) розчин тетроксиду осмію (“SPI”, США) на 1 годину. Зневоднювали зразки за допомогою пропіленоксиду в розчинах зростаючої концентрації. Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію епон-аралдіт. Зрізи контрастували за Рейнольдсом при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (ТЕМ) ПЕМ-100-01 (“SELM”, Україна) при напрузі прискорення 65-90 кВ і первинних збільшеннях від 3000 до 12000. У цілому, електронномікроскопічне дослідження проводили за стандартною схемою [16-18]. Статистичний аналіз проводили із використанням рангового критерію Ван-дер-Вардена [19].

#### **Результати та їх обговорення**

При ультраструктурному аналізі через 1 і 4 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг у ПЗ експериментальних тварин внутрішньоклітинна будова екзокринних та ендокринних клітин не відрізнялася від норми. Також залишалися без істотних змін структури міжклітинного простору, проте у складі ГМЦР просвіти фенестрованих гемокапілярів панкреатичних острівців звужувались, містили значні скупчення ущільнених мас плазми крові та залишки дезорганізованих еритроцитів. У більшості спостережень плазматичні мембрани еритроцитів виявлялися з істотними пошкодженнями, еритроцити своїми розпушеними поверхнями тісно прилягали до дезорганізованих частин люмінальної поверхні ендотеліальних клітин. У цих мікросудинах цитоплазма ендотеліальних клітин витончувалася та насичувалася осміюфільними гомогенними масами. Перичити в безпосередній близькості до описаних ділянок ендотеліальних клітин мали підвищену електронну щільність і своїми пошкодженими кортикальними шарами об'єднувалися із гомогенними масами потовщених і розпушених базальних мембран.

У складі мікросудин інсуло-ацінарної портальної системи ультраструктура клітин не відрізнялася від норми. В соматичних гемокапілярах панкреатичних ацинусів цитоплазма ендотеліа-

льних клітин у зоні органел зберігала типovu для неї структуру, однак більшість ділянок люмінальної та базальної частин плазматичної мембрани була розпушеною. На люмінальній поверхні ендотеліоцитів виявлявся хвиляподібної форми рельєф зі значними інвагінаціями у формі кавеол, які були заповнені щільним гомогенним матеріалом. У деяких випадках на люмінальній поверхні ендотелій утворював значну кількість мікрворисинок, що вказувало на наявність циркуляторної гіпоксії. Цитоплазма базальної частини ендотеліальних клітин містила нечіткі профілі поодиноких мітохондрій і рибосом. Плазматична мембрана в даних ділянках не виокремлювалася та разом із базальною мембраною утворювала гомогенний матеріал високої електронної щільності. Ядра ендотеліальних клітин були збільшені, наповнені значною масою гетерохроматину, містили дезорганізовані ядерця. Мембрани каріотекки по периметру ядра мали локуси розпушення (рис. 1).

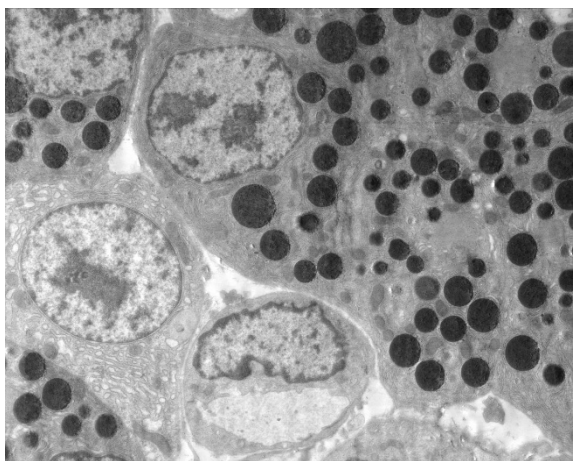


Рис. 1. Метод ТЕМ. Соматичний гемокапіляр і ультраструктура ациноцитів голівки ПЗ щура через 4 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг.  $\times 4000$ .

Після ініціації ГП з використанням L-аргініну в дозі 4 г/кг через 1 і 4 години після інтраперитонеального введення препарату спектр ультраструктурних змін ГМЦР ПЗ був схожим на морфологічні перетворення у попередній експериментальній підгрупі, проте їх виразність була помітно вищою. Найбільш часто виявлялися явища сладжування еритроцитів в просвіті соматичних гемокапілярів.

Застосування L-аргініну в дозі 5 г/кг у даний термін експерименту призводило до суттєвого ушкодження цілісності ендотеліального вистелення мікросудин панкреатичних острівців і ацинусів, різкого посилення проявів циркуляторної гіпоксії та порушень внутрішньосудинної циркуляції. Означені зміни мали дифузний характер і зустрічалися у різних досліджуваних діля-

нках залози (рис. 2).

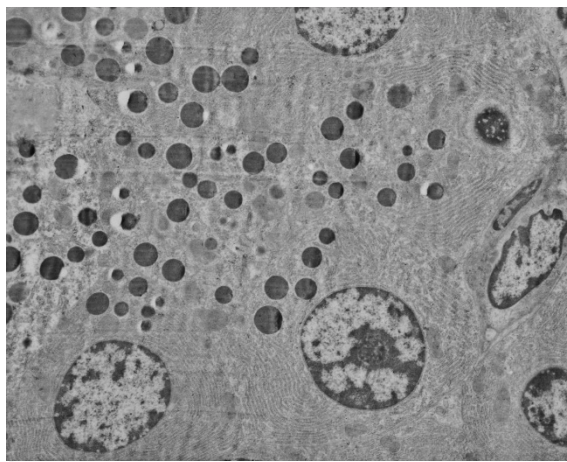


Рис. 2. Метод ТЕМ. Екзокринний відділ голівки ПЗ щура через 4 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 5 г/кг.  $\times 3000$ .

У термін від 8 до 24 годин після введення L-аргініну в різних дозах дослідження ультраструктури виявило зміни ацинарних клітин ПЗ у вигляді вакуолізації або ущільнення цитоплазми, набряку та пікнозу ядер, набряку і редукції органел, що відповідало некрозу клітини. Переважали панкреатоцити в цілому зі збереженою структурою. Ациноцити знаходилися в різних фазах секреторного циклу, містили 1 або 2 ядра з добре вираженим ядерцем, комплексом Гольджі з ознаками гіперплазії. У деяких клітинах знаходилися ядра з щільною каріоплазмою. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум, локалізований в базальній частині панкреатоцитів, був представлений близько розташованими цистернами. Останні в ряді клітин були розширені, іноді аж до утворення вакуолей (рис. 3, 4).

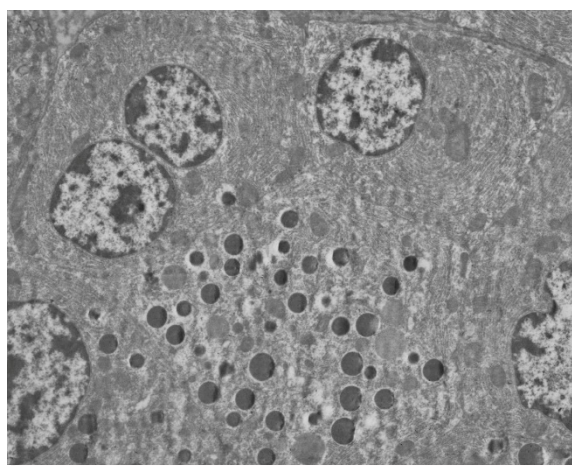


Рис. 3. Метод ТЕМ. Екзокринний відділ хвоста ПЗ щура через 8 годин після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг.  $\times 3000$ .

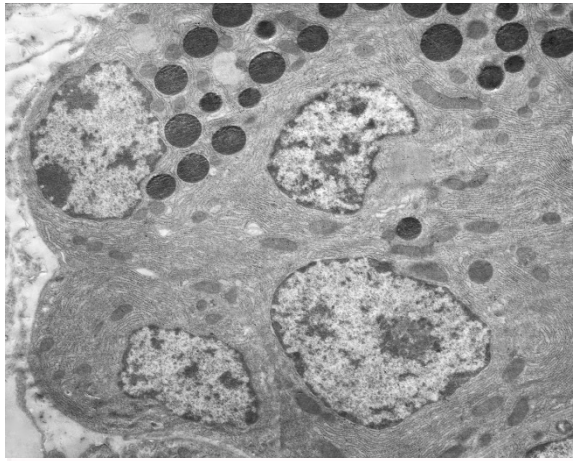


Рис. 4. Метод TEM. Екзокринний відділ голівки ПЗ щура через 12 годин після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 4 г/кг.  $\times 4000$ .

Тільки в окремих випадках відзначалася втрата паралельного розташування цистерн. У деяких клітинах спостерігалися вакуолі з гомогенним слабо осміофільним вмістом, аналогічним гранулам прозимогена. Мітохондрії мали видовжену форму і щільний матрикс. В апікальній частині ациноцитів була присутня значна кількість зимогенів гранул. Центральна ацинарна протока була заповнена помірно осміофільним гомогенним матеріалом, ультраструктура епітелію міжацинарних проток була збережена. Ознаки дистрофії виявлялися лише в окремих клітинах у вигляді просвітлення цитоплазми, набряку мітохондрій з частковою деструкцією крист. Було характерним розширення ядерних пор, поява мієліноподібних структур, накопичення ліпідів і вторинних лізосом.

У термін від 8 до 24 годин після введення L-аргініну в дозі 3 г/кг у ПЗ фенестровані гемокапіляри панкреатичних острівців зберігали ознаки uszkodження кровообігу, що спостерігалися на попередньому терміні дослідження. Стінка артеріол була деформованою, з окремими локусами порушень зв'язку між ендотеліоцитами, перицитами та адвентиційними клітинами. Потовщені та розпушені базальні мембрани заповнювали проміжки між відокремленими ендотеліальними клітинами артеріол.

Мікросудини інсуло-ацинарної портальної системи на люмінальній поверхні мали численні мікроворсинки, що свідчило про посилення ступеня впливу гіпоксії. Стінка означених мікросудин набувала ознак міжклітинного та цитоплазматичного набряку. Соматичні гемокапіляри значно розширювались, їх внутрішній рельєф містив значну кількість інвагінацій та мікроворсинок. Цитоплазма ендотеліоцитів містила поодинокі мікропіноцитозні везикули, набрякли мітохондрії з фрагментованими кристами, невелику кількість рибосом і елементів гранулярної

ендоплазматичної сітки. Ущільнені ядра з великим вмістом конденсованого хроматину свідчили про обмеження ядерної активності. Характерним для даного терміну експерименту було uszkodження цілісності стінки соматичних гемокапілярів ацинусів не лише шляхом дезінтеграції контактів ендотеліального вистелення, а й за рахунок фрагментації зовнішніх клітинних мембран ендотеліоцитів. Також було характерним сладжування еритроцитів і утворення тромботичних мас у просвіті соматичних гемокапілярів.

У дренажній ланці гемомікроциркуляції спостерігалось значне розширення просвітів венул, проте їх вміст залишався збіднілим на формені елементи крові. Суцільна стінка венул мала виразні ознаки міжклітинного набряку та атрофії ендотеліоцитів і перицитів.

Протягом від 8 до 24 годин після введення L-аргініну в дозі 4 г/кг у ПЗ фенестровані гемокапіляри панкреатичних острівців та соматичні гемокапіляри панкреатичних ацинусів зберігали ознаки порушення кровообігу. Ендотелій цих мікросудин мав ознаки виразного гіпоксичного uszkodження. Були характерними деформація та деструкція стінки артеріол поряд із змінами мікросудин інсуло-ацинарної портальної системи, сладжування еритроцитів і тромбозу соматичних гемокапілярів. У різних досліджуваних ділянках ПЗ зустрічалися дрібні скупчення примітивних ендотеліальних клітин, проте повноцінних мікросудин із сформованим просвітом та ознаками трансендотеліального транспорту вони не утворювали.

У моделі з використанням L-аргініну в дозі 5 г/кг наприкінці 1-ї доби експерименту спостерігалось зростання різких деструктивних змін мікроциркуляції за рахунок дифузного блокування трансендотеліального транспорту і збільшення частки мікросудин з ознаками тромбозу. Новоутворення ендотеліоцитів мало обмежений характер (рис. 5).



Рис. 5. Метод TEM. Стан мікросудин екзокринного відділу голівки ПЗ щура через 24 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 5 г/кг.  $\times 3000$ .

Впродовж 2-ї та 3-ї діб після ініціації ГП з використанням L-аргініну в дозі 3 г/кг ступінь ультраструктурних змін мікросудин суттєво зменшувалася. Зокрема, деформація та деструкція стінки артеріол не виявлялися. Патологічні зміни будови фенестрованих гемокапілярів панкреатичних острівців зустрічалися лише в поодиноких спостереженнях. Значно знижувались прояви гіпоксичного ушкодження ендотелію фенестрованих і соматичних гемокапілярів, а також мікросудин інсуло-ацинарної портальної системи. Повністю відновлювалась їхня внутрішньосудинна мікрогемодинаміка. Порушення структурно-функціонального стану венулярного відділу гемомікроциркуляції не виявлялися (рис. 6).

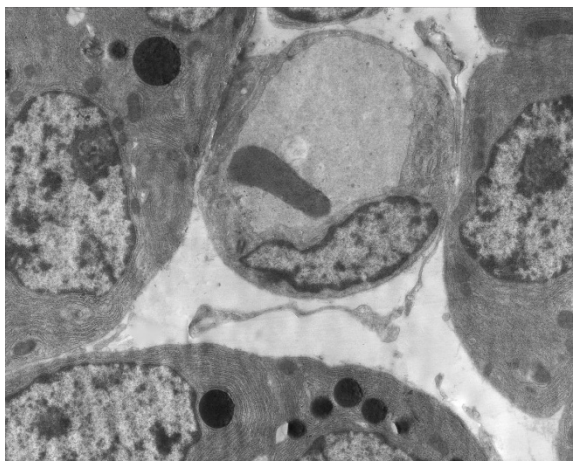


Рис. 6. Метод TEM. Соматичний гемокапіляр і ультраструктура ациноцитів голівки ПЗ щура через 48 годин після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг.  $\times 5000$ .

Через 48 і 72 години після введення L-аргініну в дозі 4 г/кг зберігалися стійкі порушення будови артеріол та мікросудин інсуло-ацинарної портальної системи. У структурі гемокапілярів зменшувались прояви внутрішньостінкового та навколосудинного набряку, гіпоксичних ушкоджень ендотелію, порушень трансендотеліального транспорту. Часткова компенсація глибокого ушкодження мікроциркуляції, що спостерігалася впродовж 1-ї доби після ініціації ГП, відбувалася за рахунок новоутворення примітивних гемокапілярів. У цей термін введення L-аргініну в дозі 4 г/кг обумовлювало розвиток деструктивних проявів у складі ациноцитів. Хроматин конденсувався в периферійній зоні ядра, ядерна мембрана була деформована, зморщена, тобто були ознаки початку апоптозу. У цитоплазмі спостерігалася збільшення цистерн, заповнених прозімогеном, формування вакуолей великих розмірів з осміофільним матеріалом середньої щільності. Число гранул зимогенів було значно зменшеним, в деяких клітинах визначався некроз. В інтерстиції ПЗ знаходилися поодинокі

нейтрофіли й еритроцити, ліпідні краплі і детрит. Переважав некроз клітин з великою кількістю макрофагів, сегментоядерних лейкоцитів і фібробластів (рис. 7).

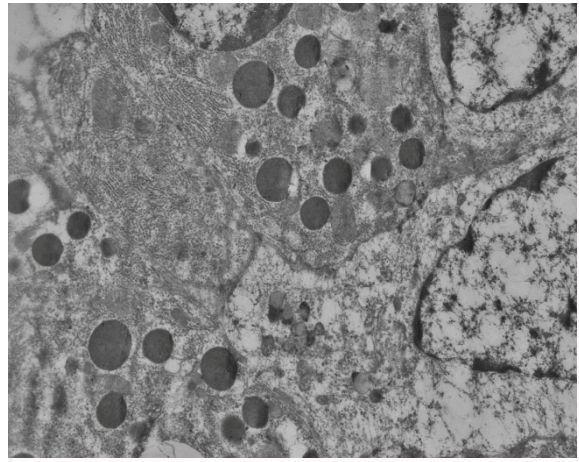


Рис. 7. Метод TEM. Екзокринний відділ хвоста ПЗ щура через 72 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 4 г/кг.  $\times 3000$ .

Через 48 і 72 години після введення L-аргініну в дозі 5 г/кг більшість клітин ацинарних і міжацинарних проток були значно змінені, перебували в стані набряку, вакуолізації. У складі поодиноких ациноцитів спостерігалася збереження мінімальної секреторної активності: визначався гранулярний ендоплазматичний ретикулум, невелика кількість гранул зимогенів різного ступеня зрілості, ядрце було зміщене до каріолеми (рис. 8). Зустрічалися окремі клітини панкреатичних острівців у стані некрозу. У всіх полях зору було видно незрілі волокна колагену, фібробласти.

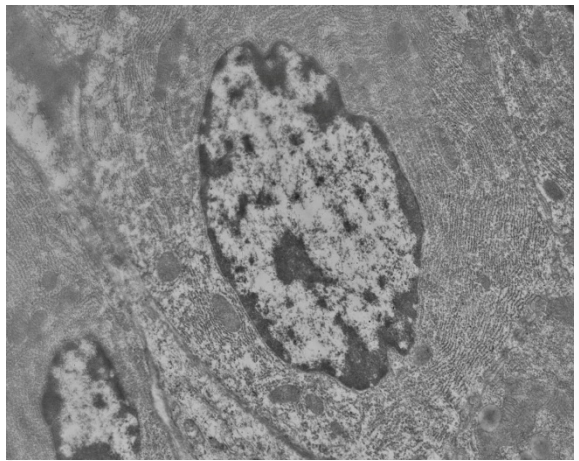


Рис. 8. Метод TEM. Ендокринний відділ голівки ПЗ щура через 72 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 5 г/кг.  $\times 3000$ .

Впродовж 2-ї та 3-ї діб після ініціації ГП з використанням L-аргініну в дозі 5 г/кг ступінь

патоморфологічних змін мікросудин різко зростає. Прогресування панкреатичної токсемії у цих тварин, що вижили, супроводжувалось блокуванням транскапілярного обміну, деструкцією ендотеліального вистелення артерійол, венул, інсуло-ацинарних портальних мікросудин, різних типів гемокапілярів. Реакція ендотеліоцитів на гіпоксичні та некробіотичні зміни паренхіматозних елементів майже не виявлялася. Новоутворення гемокапілярів не відбувалося, що поряд із тотальним тромбозом мікросудин вказувало на глибоку та незворотно деструкцію тканинних компонентів ПЗ.

При морфометричному дослідженні електронограм ПЗ з'ясувалося, що через 1 годину після ініціації ГП за допомогою L-аргініну в дозах 3 г/кг і 4 г/кг відносна щільність соматичних гемокапілярів екзокринного відділу голівки ПЗ не змінювалась суттєво у порівнянні з величиною контрольної групи тварин ( $15,2 \pm 0,9\%$ ), але після застосування 5 г/кг L-аргініну вже через 1 годину спостерігалось достовірне збільшення параметра на  $61,2\%$  ( $p < 0,05$ ) відносно контрольного значення.

Через 4 і 8 годин після введення L-аргініну в усіх досліджуваних дозах відносна щільність гемокапілярів соматичного типу у складі панкреатичних ацинусів ПЗ статистично значуще перевищувала величину контрольної групи, але подальша динаміка змін параметра залежала від дози чинника. Зокрема, після введення L-аргініну в дозі 3 г/кг через 24 години і в подальшому відносна щільність соматичних гемокапілярів активно зменшувалась і наближалась до контрольного значення.

Доза L-аргініну 4 г/кг обумовлювала більш істотне зростання досліджуваного параметра через 24 години після ініціації ГП з поступовим його зниженням протягом 2-ї та 3-ї діб експерименту, проте повного відновлення показника не відбувалося: через 72 години він перевищував контрольне значення на  $49,3\%$  ( $p < 0,05$ ). Після застосування 5 г/кг L-аргініну через 24 години після ініціації ГП у складі екзокринного відділу ПЗ спостерігалось максимальне підвищення відносної щільності гемокапілярів (у 2,7 рази у порівнянні з контролем;  $p < 0,05$ ). Через 48 і 72 години від початку дослідження суттєвої редукції змін параметра не відбувалося.

Кількісний ультраструктурний аналіз ПЗ показав, що через 1 годину після ініціації ГП за допомогою L-аргініну в дозі 3 г/кг відносна щільність фенестрованих гемокапілярів ендокринного відділу голівки ПЗ не змінювалась суттєво у порівнянні з величиною контрольної групи тварин ( $17,4 \pm 1,2\%$ ), проте після застосування 4 г/кг і 5 г/кг L-аргініну через 1 годину експерименту спостерігалось достовірне збільшення параметра відповідно на  $48,3\%$  і  $55,2\%$  ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контрольним значенням.

Через 4 і 8 годин після введення L-аргініну в усіх досліджуваних дозах відносна щільність гемокапілярів фенестрованого типу у складі панкреатичних острівців ПЗ статистично значуще перевищувала величину контрольної групи, але подальша динаміка змін параметра залежала від дози чинника. Зокрема, після введення L-аргініну в дозі 3 г/кг через 24 години і в подальшому відносна щільність соматичних гемокапілярів активно зменшувалась і наближалась до контрольного значення.

Доза L-аргініну 4 г/кг обумовлювала більш істотне зростання досліджуваного параметра через 24 години після ініціації ГП (у 2,3 рази;  $p < 0,05$ ) з помірним його зниженням протягом 2-ї та 3-ї діб експерименту, проте повного відновлення показника не відбувалося: через 72 години він перевищував контрольне значення на  $83,9\%$  ( $p < 0,05$ ). Після застосування 5 г/кг L-аргініну через 24 години після ініціації ГП у складі ендокринного відділу ПЗ спостерігалось максимальне підвищення відносної щільності фенестрованих гемокапілярів (у 2,5 рази у порівнянні з контролем;  $p < 0,05$ ) і залишалось таким через 48 і 72 години від початку дослідження.

Морфометричний аналіз показав, що через 1 і 4 години після ініціації ГП за допомогою L-аргініну в дозах 3 г/кг і 4 г/кг чисельна щільність гемокапілярів голівки ПЗ не змінювалась суттєво у порівнянні з величиною контрольної групи тварин ( $532 \pm 44 \text{ мм}^2$ ), проте після застосування 5 г/кг L-аргініну через 1 годину експерименту спостерігалось достовірне зменшення параметра на  $21,3\%$  ( $p < 0,05$ ), через 4 години – на  $28,6\%$  ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контрольним значенням.

Протягом першої доби дослідження чисельна щільність гемокапілярів у групі тварин, що отримали інтраперитонеальну ін'єкцію L-аргініну в дозі 3 г/кг, суттєво не змінювалась і залишалась на рівні контрольних величин. Навпроти, після введення L-аргініну в дозах 4 г/кг і 5 г/кг спостерігалось активне зменшення чисельної щільності гемокапілярів. Зокрема, через 24 години після ініціації ГП досліджуваний параметр поступався контролю на  $33,3\%$  ( $p < 0,05$ ) і  $66,2\%$  ( $p < 0,05$ ) відповідно. На наступних етапах експерименту після введення 4 г/кг L-аргініну спостерігалась стабілізація рівня показника на низкому рівні. Введення L-аргініну в дозі 5 г/кг обумовлювало подальше зниження чисельної щільності гемокапілярів ПЗ. Зокрема, через 72 години від початку ГП даний параметр поступався значенню контрольної групи на  $77,4\%$  ( $p < 0,05$ ).

При морфометричному вивченні площі попереочної перетину соматичних гемокапілярів екзокринного відділу голівки ПЗ через 1 годину після ініціації ГП за допомогою L-аргініну в усіх досліджуваних дозах спостерігалось помірне зростання параметра у порівнянні з контрольним

значенням ( $19,8 \pm 1,6$  мкм<sup>2</sup>): в дозі 3 г/кг – на 28,8 % ( $p < 0,05$ ); 4 г/кг – на 31,3 % ( $p < 0,05$ ); 5 г/кг – на 28,9 % ( $p < 0,05$ ).

Через 4 і 8 годин після введення L-аргініну в усіх досліджуваних дозах площа поперечного перетину гемокапілярів соматичного типу у складі панкреатичних ацинусів ПЗ також статистично значуще перевищувала величину контрольної групи, але подальша динаміка змін параметра залежала від дози чинника. Зокрема, після введення L-аргініну в дозі 3 г/кг через 24 години і в подальшому величина параметра активно зменшувалась і через 72 години експерименту наближалась до контрольного значення.

Доза L-аргініну 4 г/кг обумовлювала більш істотне зростання досліджуваного параметра через 24 години після ініціації ГП з поступовим його зниженням протягом 2-ї та 3-ї діб експерименту, проте повного відновлення показника не відбувалося: через 72 години він перевищував контрольне значення на 81,8 % ( $p < 0,05$ ). Після застосування 5 г/кг L-аргініну через 24 і 48 годин після ініціації ГП у складі екзокринного відділу ПЗ спостерігалось максимальне підвищення площі поперечного перетину гемокапілярів соматичного типу (у 2,3 рази у порівнянні з контролем;  $p < 0,05$ ). Через 72 години від початку дослідження суттєвої редукції змін параметра не відбувалося.

Кількісний ультраструктурний аналіз ПЗ показав, що через 1 годину після ініціації ГП за допомогою L-аргініну в усіх досліджуваних дозах площа поперечного перетину фенестрованих гемокапілярів ендокринного відділу голівки ПЗ не змінювалась суттєво у порівнянні з величиною контрольної групи тварин ( $67,3 \pm 4,8$  мкм<sup>2</sup>).

Через 4 і 8 годин після введення L-аргініну в усіх досліджуваних дозах площа поперечного перетину фенестрованих гемокапілярів у складі панкреатичних острівців ПЗ статистично значуще перевищувала величину контрольної групи, але подальша динаміка змін параметра залежала від дози чинника. Зокрема, після введення L-аргініну в дозі 3 г/кг максимальне зростання параметра спостерігалось через 12 годин експерименту (на 35,2 %;  $p < 0,05$ ) і після цього показник поступово зменшувався до контрольного рівня. Доза L-аргініну 4 г/кг обумовлювала більш істотне зростання досліджуваного параметра через 24 години після ініціації ГП (у 1,8 рази;  $p < 0,05$ ) з помірним його зниженням протягом 2-ї та 3-ї діб експерименту, проте повного відновлення показника не відбувалося: через 72 години він перевищував контрольне значення на 67,9 % ( $p < 0,05$ ). Після введення 5 г/кг L-аргініну через 24 години після ініціації ГП у складі ендокринного відділу ПЗ спостерігалось максимальне дворазове підвищення площі поперечного перетину фенестрованих гемокапілярів у порівнянні з контролем і залишалось на такому рівні через 48 і 72

години від початку дослідження.

За допомогою ТЕМ встановлено, що печінка тварин контрольної групи після інтраперитонеального введення фізіологічного розчину характеризувалася нормопластичним варіантом будови. Ядра гепатоцитів переважно овальної форми, з дрібнозернистим хроматином, нерівномірно розподіленим в каріоплазмі, компактним ядерцем, що займав об'єм або центральне, або ексцентричне положення в ядрі (рис. 9).

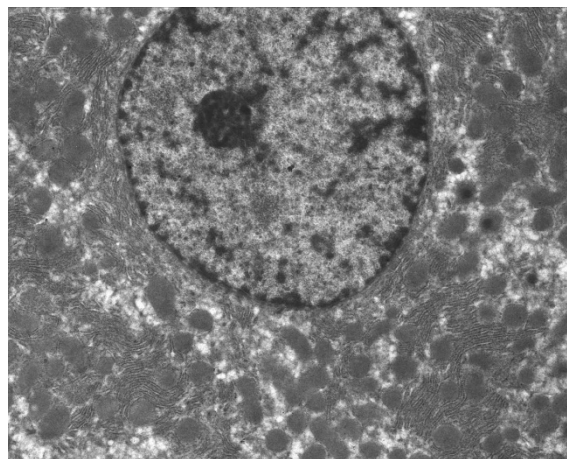


Рис. 9. Метод ТЕМ. Ультраструктура гепатоцитів щура контрольної групи.  $\times 3000$ .

У цитоплазмі гепатоцитів реєструвалося помірно число мітохондрій, які мали переважно овальну форму, матрикс середньої електронної щільності і нечисленні кристи. Гранулярна ендоплазматична сітка була помірно розвиненою, з цистернами якої асоціювалися численні рибосоми. Між цистернами виявлялися вільні рибосоми і полісоми, а також аморфний вміст помірної електронної щільності. Виявлялися поодинокі первинні лізосоми та дрібні ліпідні включення. Жовчні капіляри мали типову будову.

При ультраструктурному дослідженні печінки через 1 і 4 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг ультраструктура гепатоцитів не відрізнялася від такої в контрольній групі тварин (рис. 10), проте після ініціації ГП з використанням доз 4 г/кг і 5 г/кг визначалася осередкова дезорганізація ультраструктур в цитоплазмі гепатоцитів (рис. 11).

Після ініціації ГП за допомогою введення L-аргініну в дозах 4 г/кг і 5 г/кг наприкінці першої доби експерименту в частині гепатоцитів відзначалася різного ступеня дезорганізація і деструкція ультраструктур, спостерігалися ознаки внутрішньоядерного та цитоплазматического набряку з деструкцією органел. У мітохондріях спостерігався внутрішньомітохондріальний набряк з руйнуванням крист і утворенням вакуолей (12, 13).

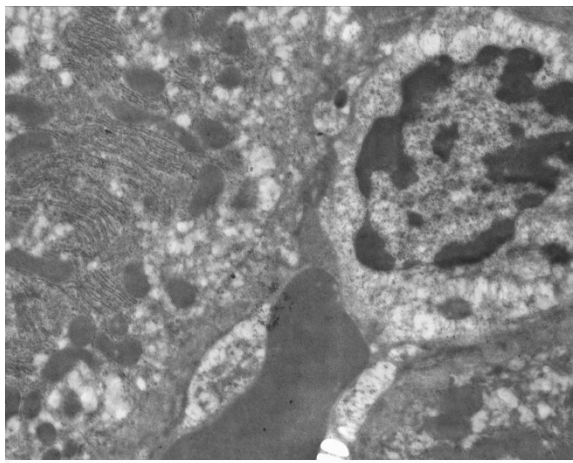


Рис. 4.10. Метод TEM. Ультраструктурні зміни гепатоцитів через 4 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг.  $\times 6000$ .

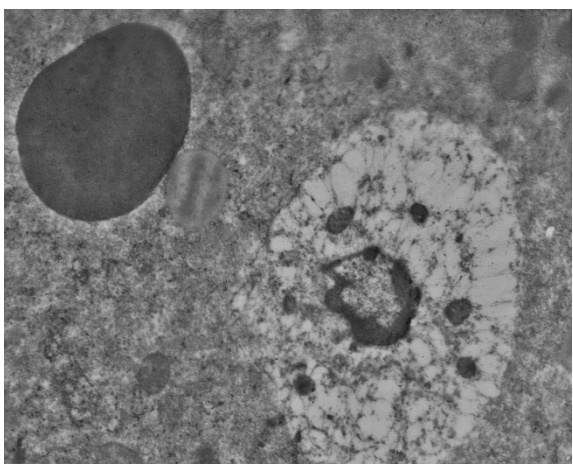


Рис. 11. Метод TEM. Ультраструктурні зміни гепатоцитів щура через 4 години інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 5 г/кг.  $\times 5000$ .

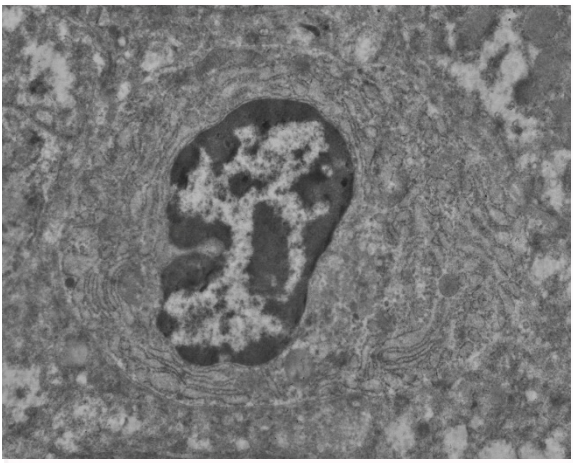


Рис. 12. Метод TEM. Ультраструктурні зміни гепатоцитів через 12 годин після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 4 г/кг.  $\times 5000$ .

У цитоплазмі було виражено звуження каналців гранулярної ендоплазматичної сітки з

дегрануляцією мембран, виявлялася практично повна відсутність гранул глікогену. Плазмолема більшості клітин була пухкою та фрагментованою. Майже у всіх клітинах печінки ступінь розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки був дуже високим. У значній кількості клітин одночасно з вакуолізацією гранулярної сітки спостерігалася гіпертрофія агранулярного ретикулума, у зоні локалізації якого були присутні окремі гранули глікогену. Загальна кількість глікогену у цитоплазмі таких гепатоцитів суттєво знижувалася.

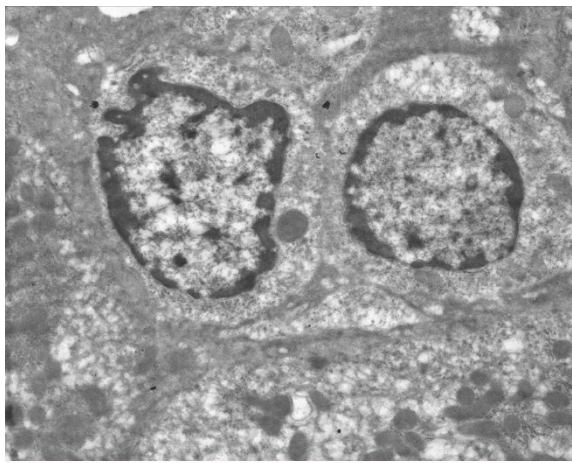


Рис. 13. Метод TEM. Ультраструктурні зміни гепатоцитів через 24 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 5 г/кг.  $\times 5000$ .

Через 48 і 72 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг відбувалося часткове відновлення ультраструктури гепатоцитів. У цитоплазмі більшості клітин спостерігалися великі ядра з хроматином в диспергованому стані та 1-2 ядерця, що розташовувались у каріоплазмі переважно поблизу каріолеми. В ядерній оболонці виявлялися добре виражені ядерні пори. По всій цитоплазмі розташовувались мітохондрії, які відрізнялися неоднорідністю змін. При цьому переважали органели з нормальною структурою. Зустрічалися також дрібні новоутворені мітохондрії. Тут же і, особливо, в навколядерних ділянках відзначалися скупчення гранул глікогену в формі розеток, а також елементи гранулярного ендоплазматичного ретикулума, між якими знаходилися скупчення полісом. У порівнянні з попереднім терміном експерименту в меншій кількості зустрічалися також гепатоцити з ознаками деструктивних змін. Тут також більш виражено проявлялися ознаки внутрішньоклітинних відновлювальних процесів (рис. 14).

Після введення L-аргініну в дозах 4 г/кг і 5 г/кг проведені дослідження виявили ряд альтеративних змін у гепатоцитах, що охоплювали не лише ультраструктуру цитоплазми клітин, але і ядра, і плазматичної мембрани. У даних дозах



наприкінці досліджуваного терміна L-аргінін справляв виражений вплив на мітохондрії і гранули глікогену в гепатоцитах. Це свідчило про порушення енергетичних процесів в клітинах печінки. Паралельно з цим процесом зменшення кількості і зміни структурних особливостей гранул глікогену вказували на вплив ГП на вуглеводний обмін в печінці (рис. 15).

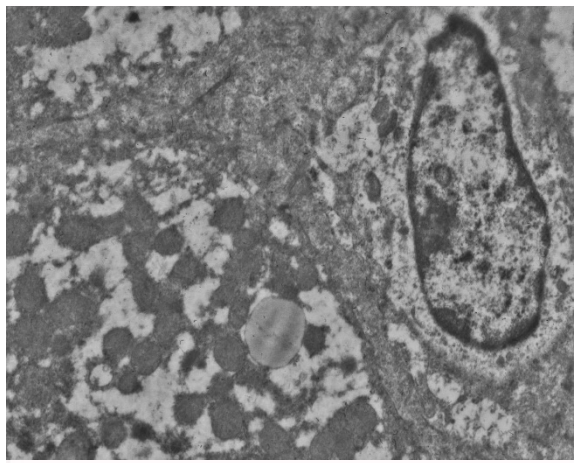


Рис. 14. Метод TEM. Ультраструктурні зміни гепатоцитів щура через 72 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 3 г/кг.  $\times 4000$ .

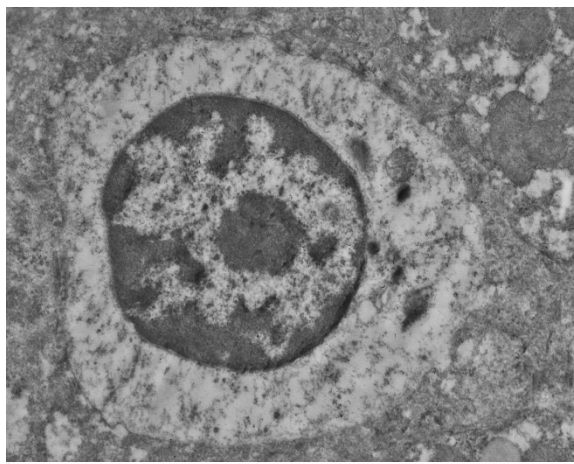


Рис. 15. Метод TEM. Ультраструктурні зміни гепатоцитів щура через 72 години після інтраперитонеального введення L-аргініну в дозі 5 г/кг.  $\times 6000$ .

Зокрема, через три доби після ініціації ГП спостерігалася груба деградація внутрішньоклітинних структур у тій частині гепатоцитів, які продовжували функціонувати. В деяких гепатоцитах, у великих клітинах, зберігалася ядро з дещо провітленою або, навпаки, з ущільненою каріоплазмою, яка містила 2-3 ядерця. У цих клітинах спостерігався виражений поліморфізм альтеративних змін в цитоплазмі: від внутрішньоцитоплазматичних вогнищ або тотального набряку цитоплазми до гомогенізації мітохондрій і деградації елементів зернистої ендоплазматичної

сітки. Навколо органел дифузно розташовувались щільні дрібні поодинокі або згруповані осміофільні гранули глікогену.

Через 72 години після введення L-аргініну в дозах 4 г/кг і 5 г/кг було характерним суттєве зменшення кількості рибосом, зв'язаних з мембранами ендоплазматичного ретикулула, а також числа вільно розташованих у цитоплазмі гепатоцитів рибосом й полісом. Пластинчастий комплекс Гольджі був редукованим і мав вигляд невеликої кількості паралельно орієнтованих гладких мембран, оточених крупними електроннопрозорими вакуолями. Поряд з ними були присутні дрібні первинні лізосоми з електроннощільним матриксом. Також характерною була наявність великої кількості аутофагосом, заповнених деструктивно зміненими фрагментами мембран та органел гепатоцитів у тих тварин, що вижили.

#### Підсумок

Проведені електронномікроскопічні дослідження на моделях з інтраперитонеальним введенням різних доз L-аргініну виявили комплекс ранніх ультраструктурних змін мікросудин у вигляді деформації та деградації стінки артеріол, ушкодження фенестрованого ендотелію гемокapілярів панкреатичних острівців і судин інсулоацинарної портальної системи, сладжування еритроцитів і тромбозу соматичних гемокapілярів, дилатації та спустошення дренажної ланки ГМЦР. Нормалізація внутрішньоклітинної структури ациноцитів, інсулоцитів та клітин стінки мікросудин ПЗ після введення L-аргініну в дозі 3 г/кг відбувалася через 24 години від початку моделювання ГП. Використання L-аргініну в дозі 4 г/кг призводило до низки незворотніх ультраструктурних змін екзокринних і ендокринних клітин з порушенням їх секреторного циклу, що частково компенсувалося збереженням функціонально активних клітин за рахунок перебудов ГМЦР через новоутворення примітивних гемокapілярів соматичного типу. Моделювання ГП із застосуванням L-аргініну в дозі 5 г/кг супроводжувалося високою летальністю тварин (80 %) впродовж трьох діб від початку експерименту за рахунок блокування транскapілярного обміну, глибокої деградації мітохондрій та ультраструктур білкового синтезу ациноцитів, прогресуючого тромбозу мікросудин.

Ультраструктурні ушкодження ГМЦР печінки починали виявлятися за 4 години від початку індукції ГП. Упродовж перших 12 годин експерименту відбувалася активація трансендотеліального транспорту в ендотелії синусоїдних гемокapілярів і портальних мікросудин. Від 12 до 24 годин розвитку ГП ендотеліоцити синусоїдів набували ознак циркуляторної гіпоксії і внутрішньоклітинної дезорганізації органел. Протягом наступних двох діб розвивався каскад змін, який залежав від дози L-аргініну. В максимальних

дозах L-аргінін (5 г/кг) викликав деструкцію мікросудин печінки з прогресуванням крововиливів, сладжуванням еритроцитів і агрегатоутворенням тромбоцитів, що обумовлювало блокування мікроциркуляції та розвиток некротичних змін паренхіми печінки.

#### Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження моделі гострого панкреатиту спрямовані на з'ясування ультраструктурних основ розвитку даного виду патології.

#### Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

#### Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Нормальний та аномальний морфогенез компонентів серцево-судинної системи людини й експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0118U005592).

### Літературні джерела References

1. Petzel M, Hoffman L. Nutrition Implications for Long Term Survivors of Pancreatic Cancer Surgery. *Nutrition in Clinical Practice*. 2017;32(5):588-98.
2. Schulz H, Schulz E. Akute pankreatitis – atologie, pathologische anatomie und pathogenese. *Zschr In Med*. 1990;117(8):467-75.
3. Takeyama Y, Hori Y, Takase K. Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery*. 2015;127(1):55-64.
4. Jilesen AP, Eijck CH, Hof KH. Postoperative complications, in-hospital mortality and 5-year survival after surgical resection for patients with a pancreatic neuroendocrine tumor: a systematic review. *World J Surg*. 2016;40:729–48.
5. Zinenko DYU, Tverdokhlib IV. [Ultrastructural changes in hemomicrocirculation and pancreatic parenchyma in the development of experimental acute pancreatitis in rats]. *World of Medicine and Biology*. 2017;13(3):114-9. Ukrainian.
6. Zinenko DYU, Tverdokhlib IV. [Hepatic microcirculation and its role in development of pathological changes of the liver in experimental acute pancreatitis]. *Morphologia*. 2019;13(2):18-26. Ukrainian.
7. Beregoenko IM, Zinenko DYU, Tverdokhlib IV. [Microcirculation and pathomorphological changes of pancreas in development of an experimental acute pancreatitis in rats]. *Bulletin of problems biology and medicine*. 2016;2(128):331-5. Ukrainian.
8. Tverdokhle IV, Beregoenko IM, Zinenko DYU. [Violation of hepatic microcirculation in the development of pathological changes in the liver when modeling acute pancreatitis in rats]. *Eruditio Juvenium*. 2013;4:34-43. Russian.
9. Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows arch*. 1997;373:97-117.
10. Cosen-Binker LI, Binker MG, Negri G, Tiscornia O. Experimental model of acute pancreatitis in Wistar rat: glucocorticoid treatment profile. *Dig. dis. sci*. 2017;48:1453-64.
11. Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J. nutr*. 1984;114:467-71.
12. Jin C, Li JC. Create the mouse model of severe acute pancreatitis induced by caerulein plus lipopolysaccharide and study on its pathogenesis. *Shiyan. shengwu. xuebao*. 2003;36:91-8.
13. Yang R, Uchiyama T, Alber TM. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit. care. med*. 2004;32:1453-9.
14. Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Buhr HG. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? *Int J Colorectal Dis*. 2015;15:127-35.
15. Kubisch CH, Sans MD, Arumugam T. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:238-45.
16. Mironov AA, Komissarchik YuYa, Mironov VA. *Metody elektronnoy mikroskopii v biologii i meditsine: Metodicheskoe rukovodstvo*. [Electron microscopy methods in biology and medicine : Methodological Guide]. St. Petersburg: Science; 1994. 400 p. Russian.
17. Tverdokhlib IV, Petruk NS, Ivanchenko MV, Silkina JuV, Khripkov IS, Pertseva NO, Shevchenko KM, Goodlett TO, Malkov II, Berehovenko IM, Zinenko DYU, Galaida NO, Varin VV, inventors; State Institution «Dnipropetrovsk medical academy of the Health Ministry of Ukraine». Method of determining the coordinates of ultrastructures in transmission electron microscopy of biological objects. Ukrainian patent UA 83611. 2013 Sep 25. Int. Cl. G01N 1/28. Ukrainian.
18. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa, New Jersey : Humana Press Inc. 2007. 608 p.
19. Lakin GF. *Biometriya [Biometrics: 4th ed.]*. Moskva : Vysshaya shkola, 1990. 352 p. Russian.

**Твердохліб І.В., Зіненко Д.Ю. Ультраструктура гемомікроциркуляторного русла та паренхіматозно-стромальних елементів підшлункової залози та печінки в моделі гострого панкреатиту з використанням різних доз L-аргініну.**

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** Розвиток гострого панкреатиту не обмежується ізольованим ушкодженням підшлункової залози. Після створення моделей гострого панкреатиту за допомогою різних речовин, що підсилюють секрецію залози, чинять токсичну або місцеву активуючу дію, дослідники показали їх дозозалежний ефект. Питання про реакції системи печінкової мікроциркуляції під час розвитку гострого панкреатиту, а також про їх патогенетичне значення у розвитку патоморфологічних змін підшлункової залози та печінки у переважній більшості аспектів залишається відкритим. **Мета** дослідження – визначити роль печінкової мікроциркуляції в розвитку ультраструктурних змін паренхіматозно-стромальних елементів ПЗ і печінки під час розвитку експериментального гострого панкреатиту з використанням різних доз L-аргініну. **Методи.** Використано різні варіанти моделі гострого панкреатиту з інтраперитонеальним введенням L-аргініну в дозах 3 г/кг, 4 г/кг і 5 г/кг. Морфологічне дослідження печінки і підшлункової залози проводили через 1, 4, 8, 12, 24, 48 й 72 години після ініціації запалення. **Результати.** В експериментальній моделі гострого панкреатиту відбувається суттєва реакція з боку печінкової мікроциркуляції, яка залежить від характеру патоморфологічних змін у складі підшлункової залози. Така реакція має фазовий характер, що включає: 1) активацію печінкової циркуляції, в першу чергу портального компоненту, на фоні ензимної токсемії з боку підшлункової залози; 2) розвиток запальних, дистрофічних, деструктивних і некротичних змін у печінковій паренхімі поряд з мікроциркуляторними порушеннями; 3) відновно-адаптаційні або декомпенсаційні процеси у системі мікроциркуляції печінки і печінковій паренхімі в залежності від ступеня панкреатогенної токсемії. **Підсумок.** Протягом 72 годин експерименту при малих і середніх дозах L-аргініну на тлі редукції гострого панкреатиту відбувається поступове відновлення структури мікросудин і нормалізація мікроциркуляції печінки. В максимальних дозах L-аргінін (5%-ний розчин) обумовлює деструкцію мікросудин печінки з прогресуванням крововиливів, сладжування еритроцитів і агрегатоутворення тромбоцитів.

**Ключові слова:** модель гострого панкреатиту, щури, підшлункова залоза, печінка, мікроциркуляція, ультраструктура.

**Твердохлеб И.В., Зиненко Д.Ю. Ультраструктура гемомикроциркуляторного русла и паренхиматозно-стромальных элементов поджелудочной железы и печени в модели острого панкреатита с использованием различных доз L-аргинина.**

**РЕФЕРАТ. Актуальность.** Развитие острого панкреатита не ограничивается изолированным повреждением поджелудочной железы. После создания моделей острого панкреатита с помощью различных веществ, усиливающих секрецию железы, оказывающих токсическое или местное активирующее действие, исследователи показали их дозозависимый эффект. Вопрос о реакции системы печеночной микроциркуляции при развитии острого панкреатита, а также об их патогенетическом значении в развитии патоморфологических изменений поджелудочной железы и печени в большинстве аспектов остается открытым. **Цель** исследования – определить роль печеночной микроциркуляции в развитии ультраструктурных изменений паренхиматозно-стромальных элементов поджелудочной железы и печени при развитии экспериментального острого панкреатита с использованием различных доз L-аргинина. **Методы.** Использованы разные варианты модели острого панкреатита с интраперитонеальным введением L-аргинина в дозах 3 г/кг, 4 г/кг и 5 г/кг. Морфологическое исследование печени и поджелудочной железы проводили через 1, 4, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после инициации воспаления. **Результаты.** В экспериментальной модели острого панкреатита происходит существенная реакция со стороны печеночной микроциркуляции, которая зависит от характера патоморфологических изменений в составе поджелудочной железы. Такая реакция имеет фазовый характер, включающий: 1) активацию печеночной циркуляции, в первую очередь портального компонента, на фоне энзимной токсемии со стороны поджелудочной железы; 2) развитие воспалительных, дистрофических, деструктивных и некротических изменений в печеночной паренхиме наряду с микроциркуляторными нарушениями; 3) восстановительно-адаптационные или декомпенсационные процессы в системе микроциркуляции печени и печеночной паренхиме в зависимости от степени панкреатогенной токсемии. **Заключение.** В течение 72 часов эксперимента при малых и средних дозах L-аргинина на фоне редукции острого панкреатита происходит постепенное восстановление структуры микрососудов и нормализация микроциркуляции печени. В максимальных дозах L-аргинин обуславливает деструкцию микрососудов печени с прогрессирующим кровоизлиянием, сладжирование эритроцитов и агрегатообразование тромбоцитов.

**Ключевые слова:** модель острого панкреатита, крысы, поджелудочная железа, печень, микроциркуляция, ультраструктура.