Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

Ultrastrukturne karakteristike endotela ductus thoracicusa pod djelovanjem histamina: doktorska disertacija

Ostojić, Ljerka

1988

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/858

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

MEDICINSKI FAKULTET UNIVERZITETA U
BANJALUCI

Ljerka Ostojić

ULTRASTRUKTURNE KARAKTERISTIKE ENDOTELA DUCTUS THORACICUSA POD DJELOVANJEM HISTAMINA

Doktorska disertacija

Banjaluka, 1988.

OSTOJIĆ DR LJERKA

ULTRASTRUKTURNE KARAKTERISTIKE ENDOTELA DUCTUS THORACICUSA POD DJELOVANJEM HISTAMINA

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Banja Luka, 1988

Ovu priliku koristim da izrazim posebnu zahvalnost prof. dr Branku Pikuli koji me je usmjeravao u naučno-istraživačkom radu, pružio svesrdnu pomoć u toku rada i sigurno vodio ka njegovoj realizaciji.

Zahvaljujem se takodje brojnim kolegama, prijateljima i saradnicima, koji su mi pružili pomoć u rješavanju nekih tehničkih problema, a medju njima su: dr Drago Kubelka, Igor Kubelka, Sead Sadić, dr Marija Burgić, dr Mirjana Bukara, Ljiljana Amidžić, prof. dr Aleksandar Ilić i prof. dr Nadan Filipović.

Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Nebojši Popoviću na pomoći i stručnim sugestijama pri radu.

Neizmjerno se zahvaljujem dr Zdenku Ostojiću na povjerenju, podršci i pomoći koju mi je pružio u toku rada.

Eksperimentalni dio ovog rada uradjen je u Veterinarskom zavodu Banja Luka i Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Banja Luci.
Elektronsko-mikroskopska obrada uzoraka uradjena je u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Banja Luci.
Mentor rada je prof. dr Branko Pikula.

S A D R Ž A J

SINOPSIS 1

SYNOPSIS 3

1. UVOD 5

1.1. Ductus thoracicusa kunića 6

1.2. Porijeklo limfe u ductus thoracicusu i njen sastav 11

1.3. Mehanizam stvaranja limfe 14

1.4. Permeabilnost limfnih sudova 20

1.5. Pritisak i protok limfe u limfnim sudovima 21

1.6. Utjecaj histamina na permeabilnost zida krvnih i limfnih sudova 23

2. MATERIJAL I METODE 30

2.1. Eksperimentalni materijal i plan 30

2.2. Eksperimentalni tretman životinja 31

2.3. Obrada uzoraka za elektronsku mikroskopiju 33

3. REZULTATI 34

4. DISKUSIJA I ZAKLJUČCI 68

4.1. Diskusija 68

4.2. Zaključci 85

5. LITERATURA 86

SINOPSIS

U posljednjoj deceniji znatno je porastao broj istraživanja koja se bave morfološkim karakteristikama endotela limfnih sudova, kako u fiziološkim, tako i u raznim patološkim stanjima.

Na modelu eksperimentalnog šoka, u grupi od 36 kunića, primjenom elektronske mikroskopije, utvrdili smo značajne morfološke promjene endotela ductus thoracicusa u histaminskom šoku. Istraživanja su bila usmjerena na razrješavanje nekoliko problema vezanih za morfologiju endotela u akutnom histaminskom šoku, zatim u šoku koji je trajao pola sata, i napokon, u šoku koji je trajao jedan sat. Naravno, uzimani su i uzorci ductus thoracicusa kunića iz kontrolne grupe.

Povećana količina limfe, povećana koncentracija proteina u njoj, kao i prisustvo histamina, dovode do pojave velikog broja transportnih vakuola u endotelnim ćelijama ductus thoracicusa. Vakuole vrše transport materija od luminalne prema abluminalnoj strani endotelnih ćelija, što je suprotno smjeru transporta u limfnim kapilarima. Prisustvo velikog broja transportnih vakuola i njihov specifičan raspored morfološka su podloga za izmijenjeni smjer transporta kroz endotel ductus thoracicusa u histaminskom šoku.

Junkcije endotelnih ćelija tipa end-to-end, overlapping i interdigitating imaju promijenjene morfološke osobine u šoku. Uočava se prisustvo dilatacija u junkcijama, a one su znak pojačanog transporta kroz interćelijske spojeve. Takve junkcije su funkcionalno manje vrijedne i ne ostvaruju u potpunosti svoju fiziološku ulogu.

Na valvulama ductus thoracicusa uočene su sekundarne jednoćelijs-

ke valvule koje predstavljaju specifičan morfološki odgovor valvula na promijenjene uslove u ductus thoracicusu u histaminskom šoku.

Nadjene promjene na endotelu ductus thoracicusa morfološka su podloga za izmijenjenu funkcionalnu ulogu endotela ductus thoracicusa u histaminskom šoku.

SYNOPSIS

In the last decade the number of research studies involved with the morphological characteristics of the lymph vessels' endothel in physiological as well as in pathological states has significantly increased. On the experimental shock model, in the group of 36 rabbits we determined considerable morphological changes of the thoracic duct endothel in histamine shock by using electronic microscopy. The investigations were carried out in order to solve a few problems concerning the morphology of the endothelial lining in the acute histamine shock, the shock lasting half an houre and finally, the shock lasting one hour. Naturally, we took the samples of the rabbits' thoracic ducts in the control group.

The increased amount of lymph, accompained by the increased concentration of its proteins, together with the presence of histamine cause appearance of great number of the transporting vacuoles in the endothelial cells of the thoracic duct. The vacuoles transport substances from luminal to abluminal side of endothelial cells which is the opposite direction of transportation from the one in lymph capillaries. The presence of large number of the transporting vacuoles and their specific order is the morphological basis for the reversed direction of transportation through thoracic duct endothel in histamine shock.

The end-to-end, overlapping and interdigitating types of junctions of endothelial cells changed their morphological characteristics in histamine shock.

Dilatation in the junction was noted which was the sign of increased

transportation through interstitial junctions. Such junctions are less valuable and don't fulfil their physiological role completely. The secondary valves were seen on the valves of thoracic duct as a specific morphological reasponse to the altered conditions in thoracic duct in histamine shock.

The changes found in the endothel of thoracic duct are the morphological basis for the altered functional role of thoracic duct endothel in histamine shock.

UVOD

Arterije, vene i limfni sudovi, kao transportni sistemi, imaju podjednako značajnu ulogu. Dosadašnja znanja o limfnom sistemu bazirana su uglavnom na anatomskim i patoanatomskim istraživanjima, a te činjenice daju nedovoljno podataka o anatomskim aspektima koji su neophodni za interpretaciju značaja limfotoka u funkciji svakog tkiva i organa.

Frank i Kern (1968) sumirali su funkcije limfnog sistema u održavanju sadržaja i volumena ekstracelularnog prostora, transportu makromolekula iz intersticijalnog prostora, transportu makromolekula sintetiziranih u parenhimnim tkivima, kao i transport lipida i drugih supstanci iz crijeva do venskog sistema. Limfni sudovi reguliraju tkivni pritisak i održavaju volumen proteina plazme vraćajući te materije iz intersticija u cirkulaciju (Mayerson 1963, O'Morchoe 1985, Gnepp 1987). Značaj ove funkcije pokazuje činjenica da limfni sudovi u toku 24 sata vraćaju 40% ukupnog volumena proteina plazme kroz ductus thoracicus u vensku cirkulaciju.

Najnovija shvatanja o ulozi i važnosti limfnog sistema iznijela je Casley-Smithova (1985, 1987) ukazujući na općeprihvaćene poglede o strukturi i funkciji limfnog sistema, liječenju njegovih oštećenja, te njegovom značaju u imunologiji i neoplaziji, baziranim na najmodernijim naučnim metodama, medju kojima morfološka istraživanja gradje limfnih sudova zauzimaju značajno mjesto.

Prema savremenom konceptu limfni sudovi započinju tubama endotelnih ćelija i nastavljaju se u limfne kapilare (Daroczy 1983, Witte

1987). Spajanjem tih kapilara nastaju limfni sudovi većeg kalibra. U svom centripetalnom toku limfa preko ductus thoracicusa, ductus lymphaticus dextera, ductus cervicalisa i ductus subclaviusa prelazi u vensku cirkulaciju (Guyton 1981).

1.1. Ductus thoracicus kunića

Ductus thoracicus kunića nastaje iz spoja lumbalnih trunkusa i intestinalnog trunkusa, a započinje ampularnim proširenjem cysternae chyli, u visini od drugog lumbalnog do jedanaestog torakalnog kralješka. Glavni limfovod penje se ispred kralješnice i iza aorte, i prolazi dijafragmu skupa sa aortom. Na m. longus colli ulazi u dubinu, izmedju a. carotis communis sinistrae i a. subclaviae, savija se prema naprijed i ulijeva u angulus venosus. Prije svoga ulijevanja može da primi ostale limfovode, ili se i oni ulijevaju direktno u angulus venosus (Casley-Smith 1964).

Gradja stijenke ductus thoracicusa u osnovi je slična gradji stijenki limfnih ogranaka, a čine je tunica interna, tunica media i adventitia. Poredjenje gradje velikih limfnih sudova, a posebno ductus thoracicusa, sa gradjom vena ili arterija je uslovno, pošto on pokazuje značajne lokalne nepravilnosti obzirom na debljinu stijenke i unutrašnju organizaciju (Williams 1980).

Tunica interna sastoji se od endotela i jednog vrlo raznoliko sastavljenog subintimalnog sloja kojeg čine kolagene i elastične niti, kao i

glatke mišićne ćelije. Kolagene i elastične niti mogu izostati ili biti postavljene izmedju mišićnih ćelija kao struktura radijarno postavljenih vlakana. Lokalna, snažno gradjena muskulatura intime gradi u blizini kuspisa izbočenje prema endotelu. Općenito vrijedi da kaudalni dijelovi ductus thoracicusa posjeduju čvršću gradju stijenke nego kranijalni dijelovi, što govori o aktivnom transportu limfe putem vlastite motorike od distalnih prema proksimalnim dijelovima.

Glatke mišićne ćelije tunice medie obuhvaćene su u snopove ili slojeve, i pokazuju u unutrašnjem i vanjskom sloju uzdužni tok, dok su srednji slojevi poredjani cirkularno u formi više ili manje zategnute spirale. Izmedju mišićnih slojeva provlače se radijalno postavljena septa vezivnog tkiva. Adventicija je gradjena iz grubih kolagenih niti koje prelaze u fibrilarno vezivno i masno tkivo (Johnson 1969).

Na uporednim istraživanjima strukture ductus thoracicusa u ljudi, koza, goveda, svinja, pasa, mačaka i kunića, mogu se na osnovu mikroskopske strukture, naročito u gradji medie, razlikovati tri tipa karakteristična za pojedine vrste (Casley-Smith 1967).

Prvi tip posjeduje u mediji mišićne ćelije i kolagene niti (čovjek, koza), a drugi sadrži elastične niti postavljene u obliku mreže u muskulaturi (govedo, svinja). Za psa, mačku i kunića opisan je treći tip, siromašan muskulaturom koja uslovljava postojanje tanje stijenke ductus thoracicusa.

Inervacija ductus thoracicusa dolazi od n. vagusa i simpatikusa.

Niti ulaze u stijenku kao snopovi ili kao razgranate niti i sačinjavaju adventicijalni, perimuskularni, intramuskularni i subendotelijalni pleksus (Leak 1972).

Raniji morfološki opisi limfnog sistema nisu obuhvatali podatke o strukturi i sastavu periadventicijalnog vezivnog tkiva ductus thoracicusa. Glavni limfovod kunića okružen je labavim vezivnim tkivom koje je često infiltrirano velikim količinama adipocita. Periadventicijalno tkivo u neposrednom je kontaktu sa vanjskom površinom limfnog suda i ima nejasnu granicu prema adventiciji. Takodjer je utvrdjeno da kolagene niti adventicije ulaze u periadventicijalno vezivno tkivo (Leak 1987).

Detaljna histološka analiza (De Freitas 1984) otkrila je da je prostor koji okružuje ductus thoracicus ispunjen labavim vezivnim tkivom u kojem su prisutne relativno velike količine unilokularnih adipocita. Vanjska površina adventicije ima relativno malu koncentraciju kolagenih niti sa različitim smjerovima. Aortalna strana ductus thoracicusa po čitavoj dužini ima gusto vezivno tkivo sa kolagenim nitima orijentiranim prema aorti. U tom interadventicijalnom tkivu zastupljene su i minimalne količine elastičnih niti za razliku od masnog tkiva koje je obilno prisutno i ne posjeduje elastične niti.

Mikroskopski gledano, interadventicijalna kolagena struktura predstavljena je tankom membranom koja povezuje aortu i ductus thoracicus. Obilno masno tkivo predstalvjeno je lobularnim strukturama koje se relativno lako odstranjuju. Pri odstranjenju masnog tkiva dešavaju se lezije

ili destrukcije membrane.

Sa morfofunkcionalnog stanovništva, postojanje membrane unutar periadventicijalnog vezivnog tkiva, doprinosi zaključku da je izvršena mehanička fiksacija ductus thoracicusa za aortu. Povezanost ta dva suda dozvoljava da arterijske pulzacije utječu na strujanje limfe prema angulus venosus (Wagner 1981, 1983, 1984).

Najiscrpnija anatomska istraživanja limfnog sistema vršila je Casley-Smithova (1964, 1967, 1982, 1987). Ultrastukturalni izgled zida ductus thoracicusa pokazuje slijedeće karakteristike: endotelijalni obrub je tanak, bez fenestracija i bez kontinuirane bazalne membrane. Oštri sidrasti filamenti i kolagene fibrile spajaju endotelijalni zid sa intersticijumom. U zidu limfnog suda primijećene su glatke mišićne ćelije i fibroblasti. Limfni endotel ductus thoracicusa sličan je endotelu limfnih sudova većeg kalibra po sadržaju citoplazmatskih organela. Izmedju endotelnih ćelija ovih limfnih sudova postoje otvori širine do 10 mikrona, za razliku od limfnih kapilara u kojima se trenutno ne odvija transport.

Intercelularni kontakt endotelnih ćelija ductus thoracicusa može biti ostvaren na tri načina (O'Morchoe 1985):

- kraj na kraj (end-to-end) 5,3%
- sa preklapanjem (overlapping) 50,9%
- kontakt sa interdigitacijama (interdigitating) 43,4%

Rijetko su uočeni otvoreni spojevi izmedju endotelijalnih ćelija (0,4%).

Nadjeni su "intercelularni kontakti" izmedju migratornih limfocita i

endotelijalnih ćelija zida ductus thoracicusa (Campbell 1983). Pod velikim povećanjem intercelularni kontakti vide se kao pentalaminarne strukture koje odgovaraju spojevima u vidu džepova. Medjutim, lokalizacija tih kontakata pokazuje da su to regioni membranske adherencije nastale zbog kretanja limfocita kroz endotel. Dakle, nije jasno da li su opisani intercelularni kontakti komunikacioni spojevi ili mjesta membranske adherencije (Pinto da Silva 1982).

Ductus thoracicus posjeduje kuspise koji pomažu centralni protok limfe (Albertine 1982). Kuspisi su primarno bikuspidalni, a nadjeni su kuspisi sa jednim, tri i pet zalistaka. Kuspis je jednim krajem pričvršćen za zid limfnog suda, a drugi kraj je slobodan. Efikasnost kuspisa zavisi od čvrstine njegovog pripoja. Slobodni kraj kuspisa je nazubljen i polumjesečast, čime je omogućen protok velike količine limfe.

Ultrastrukturalno gledano, endotel koji pokriva kuspise nema fenestracije i leži na diskontinuiranoj bazalnoj membrani. Zastupljena su sva tri tipa kontakata izmedju endotelnih ćelija: end-to-end, overlapping i interdigitating, isto kao u endotelnih ćelija koje pokrivaju lumene limfnih sudova. Valvularne endotelne ćelije imaju mnogobrojne citoplazmatske vezikule i mikrofilamente. Ne postoji jasna granica izmedju endotelnih ćelija koje pripadaju kuspisima i onih koje su u interkuspidalnim segmentima zida ductus thoracicusa.

Oblik kuspisa u limfnim kapilarima i limfnim sudovima manjeg kalibra može biti različit (Daroczy 1984). Oblik kuspisa prilično varira i zavisi

u velikoj mjeri o vezama izmedju endotela i vezivnog tkiva. Na mjestima spajanja dva limfna kapilara ili dva limfna suda malog kalibra nalaze se bikuspidalni zalisci i nazivaju se vezujući kuspisi. Segmentalni kuspisi sastoje se od nabora vezivnog tkiva koji se pruža u lumen limfnog suda, a pokriveni su endotelnim ćelijama. Jednoćelijski kuspisi karakteristični su za limfne kapilare, a njihova endotelna ćelija prominira u lumen limfnog kapilara. Postoje još i žbunasti kuspisi sastavljeni od nabora vezivnog tkiva pokrivenog jednostrukim slojem endotelnih ćelija.

Gradja zida ductus thoracicusa u području cisterna chyli veoma je slična gradji zida ostalog dijela ductus thoracicusa (Magari 1987).

1.2. Porijeklo limfe u ductus thoracicusu i njen sastav

Obzirom da ductus thoracicus nastaje iz spoja lumbalnih limfnih trunkusa i intestinalnog limfnog trunkusa u nivou od drugog lumbalnog do jedanaestog torakalnog kralješka, porijeklo i sastav limfe u njemu su uslovljeni tom činjenicom. Početni dio ductus thoracicusa predstavljen je ampularnim proširenjem, cisterna chyli, smještenim ispred kralježnice i iza aorte (Casley-Smith 1967).

Sastav limfe u cisterna chyli odgovara sastavu intersticijalne tečnosti iz koje se drenira limfa sadržana u trunkus lumbalis. Sastav limfe u proksimalnim dijelovima ductus thoracicusa uslovljen je dotokom limfe iz različitih organa abdomena i toraksa (Wagner 1984).

Limfa iz crijeva sadrži otprilike pola količine proteina krvne plazme, enzimski sadržaj je manji, ali je koncentracija elektrolita ista. Većina steroida i vitamina rastvorljivih u mastima dolaze u cirkulaciju kroz crijevne limfne sudove, kao i masne kiseline sa dužim lancima. Mreže limfnih kapilara u crijevu nalaze se u mišićnom dijelu mukoze, u submukozi i serozi (Johnston 1984). Uočene su anastomoze izmedju limfnih mreža (Földi 1972). Limfni sudovi, nakon napuštanja zida crijeva, slijede prilično odredjenu segmentalnu šemu, i završavaju u cisterna chyli. Protok limfe u intestinalnom limfnom sudu zavisi od intestinalne motilacije, količine uzete tekućine i masti, jačine arterijskih pulzacija i respiratorne aktivnosti (O'Morchoe 1984).

Hepatička limfa stvara se difuzijom iz sinusoida, prikuplja se u Disse-ovim prostorima iz kojih se drenira limfnim sudovima u ductus thoracicus (Niiro 1985). Limfa nastala u jetri čini oko 30% volumena limfe u ductus thoracicusu. Limfni sudovi žučnog mjehura imaju zajedničku putanju sa limfnim sudovima jetre (Weiner 1970). Sadržaj hepatičke limfe sličan je sadržaju plazme. Količina proteina je 80% od onoga u plazmi, a nivo holesterola, fosfolipida i masnih kiselina je od 85% do 92% od nivoa u plazmi.

Limfni sudovi pankreasa anastomoziraju sa limfnim sudovima jetre, žučnog mjehura i duodenuma, što nije iznenadjujuće s obzirom na njihovo zajedničko embriološko porijeklo, i ulijevaju se u ductus thoracicus (Weiner 1970). Papp (1971) je dokazao da postoji povećanje sadržaja pankreatičnih enzima u limfi ductus thoracicusa proksimalno od ulijevanja truncus pancreaticusa.

Limfni kapilari koji počinju kao slijepe vreće oko alveolarnog ductusa pluća (Trapnell 1970) formiraju dva drenažna sistema: površni oko visceralne pleure i duboki oko bronha, arterija i vena. Pleuralni limfni sudovi zajedno sa onima iz zida toraksa dreniraju se u unutrašnje mamarne limfne sudove, stražnje medijastinalne limfne čvorove, a zatim u ductus thoracicus. Limfa iz donjih lobusa pluća drenira se u abdominalne limfne čvorove (Johnson 1981). Limfa iz gornjih lobusa pluća drenira se u ductus thoracicus, dok se većina plućne limfe, medjutim, drenira u ductus lymphaticus dexter i čini 53% njegovog ukupnog volumena (Nisimaru 1969). Sastav limfe iz pluća veoma malo utječe na sastav limfe ductus thoracicusa, obzirom na malu količinu.

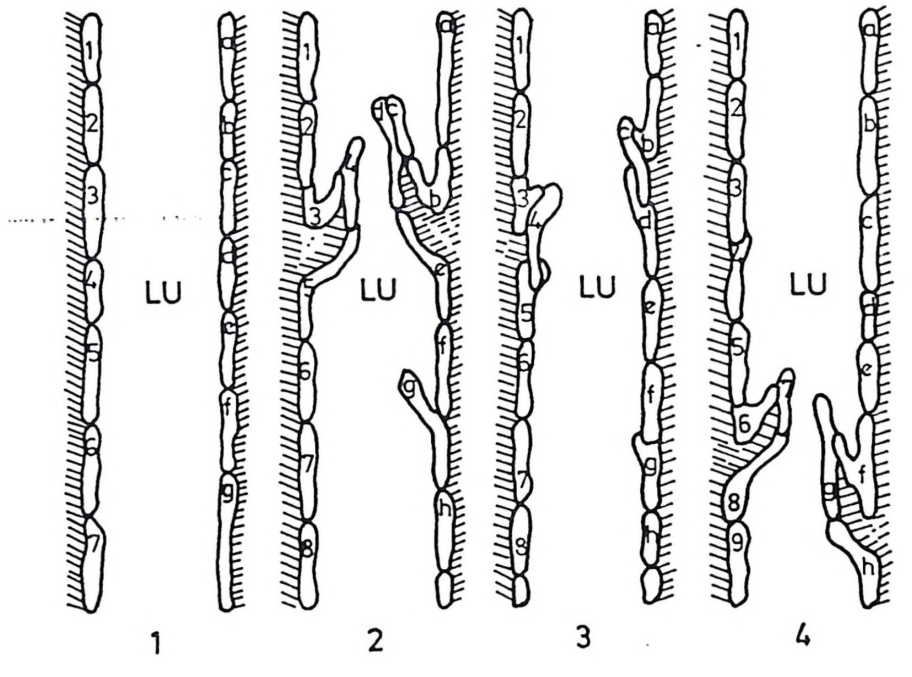
Limfa koja dolazi u ductus thoracicus iz bubrega, polnih organa i regija u okolini samog ductus thoracicusa ne mijenja bitno sastav limfe koja dolazi iz cisterne chyli. Promjene nastaju tek nakon ulijevanja crijevnog i hepatičnog trunkusa, jer je sastav limfe iz tih organa znatno drukčiji od sastava limfe iz ostalih regija koji je identičan sa sastavom plazme (Linde-na 1986).

Pošto ductus thoracicus drenira otprilike 80% ukupne količine limfe u tijelu (Guyton 1981), jasno je da će se i u patološkim uslovima sve promjene manifestirati na njegovoj gradji i funkciji, pa tako i u stanjima šoka (Zweifach 1957, Leak 1972, Albertine 1982, Casley-Smith 1985). Povećana ponuda limfe i njen promijenjeni sastav u stanjima povećanja permeabiliteta u krvnim sudovima (npr. šoku) trebalo bi da utječu na promjenu morfologije zida ductus thoracicusa, što će biti predmet našeg istraživanja i

kasnije će biti detaljnije objašnjeno.

1.3. Mehanizam stvaranja limfe

Limfa se stvara iz intersticijalne tekućine. Hidrostatski pritisak tkiva u mirnom stanju je negativan (-6mm Hg) i ne postoji gradijent hidrostatskog pritiska u odnosu na limfne kapilare, gdje intraluminalni pritisak ima vrijednost atmosferskog pritiska. Pritisak krvi u kapilarama obezbjedjuje strujanje tečnosti u intersticijum, čime se povećava hidrostatski pritisak tkiva i privremeno postaje veći od intraluminalnog limfnog



Šema 1.
Formiranje valvula u limfnim sudovima

pritiska. Tako razlika izmedju intersticijalnog hidrostatskog pritiska i intraluminalnog pritiska limfnog suda uslovljava prelazak tečnosti u limfne kapilare. Ova razlika pritiska uslovljava otvaranje intramuralnih kuspisa i tečnost ulazi u lumen limfne kapilare i dovodi do njihove dilatacije, odnosno do faze punjenja (Casley-Smith 1967). Povećanje intraluminalnog limfnog pritiska zatvara intramuralne kuspise i na taj način onemogućava povratak limfe u intersticijalnim prostor (Furchgott 1980).

Centripetalni protok limfe od jednog do drugog segmenta limfnog suda potpomognut je razlikama u hidrostatskom i osmotskom pritisku izmedju distalnih i proksimalnih limfnih segmenata, kao i kontrakcijama glatkih mišićnih ćelija prisutnih u zidu samog limfnog suda (Ohlsson 1973).

Limfni kapilari nemaju konstantan oblik i kapacitet, već se prilagodjavaju toku i količini limfe. Ovisno o količini intersticijalne tečnosti limfni kapilari se dilatiraju i mijenjaju oblik i odnos prema okolnom tkivu (O' Morchoe 1984).

Strukturalne osobine zida limfnog suda manjeg kalibra koje pomažu njegovu dilataciju su slijedeće:

- posebni spojevi izmedju nastavaka endotelnih ćelija (end-to-end, overlapping, interdigitating),
- siromašna, često oštećena ili nedostatna bazalna membrana,
- nedostatak pericita,
- kolagena elastična i sidrasta vlakna koja se direktno spajaju sa abluminalnom membranom endotelnih ćelija.

Za vrijeme dilatacije limfnog suda kod slabih spojeva izmedju nastavaka graničnih endotelnih ćelija, preklapajuće ćelije klize jedna po drugoj, interdigitacije i nabori tada nestaju (Daroczy 1984).

Za vrijeme slijedeće faze (faza pražnjenja), proksimalni limfni kuspisi se otvaraju, a distalni kuspisi se zatvaraju, dozvoljavajući izvjesnoj količini limfe regurgitaciju u intercelularni prostor kroz citoplazmatske pore. U lumenu limfnog suda zadržavaju se makromolekule i proteini, tako da se limfa koncentrira (Chand 1981, Nose 1984).

Sistem endocitotičnih vezikula karakteristična je komponenta endotelijalnih ćelija limfnih kapilara i limfnih sudova manjeg kalibra (Albertine 1982, Altura 1983, 1985). Uprkos morfološkoj jasnoći vezikularnog sistema puno je nepoznatog o njegovoj ulozi u molekularnom transportu. Eksperimentom je dokazano (O'Morchoe 1985) da su u krvnim sudovima vezikule endotelnih ćelija od primarne važnosti za masovni transport plazma proteina iz lumena u intersticijum. Vezikularni sistem je sastavljen od niza malih vezikula nastalih od kaveola koje se formiraju na strani lumena krvnog suda i protežu se sve do intersticijalne površine ćelije gdje se njihov sadržaj oslobadja. Glavni oslonac ovom gledištu je nemogućnost postojanja vezikula kao diskretnih citoplazmatskih entiteta, jer one egzistiraju formirajući niz medjusobno spojenih vezikula i kanala (O'Morchoe 1987).

Transportna uloga vezikularnog sistema limfnog endotela funcionira suprotno od onog u endotelu krvnih sudova, tj. od intersticijuma prema lumenu (O'Morchoe 1984). Analiza transporta kroz limfni endotel in

vivo tehnički je neizvodljiva, tako da se za proučavanja koriste limfni perfudirani segmenti. Kao "tracer" koristi se hromna peroksidaza (HRP) ili druge čestice odgovarajućih dimenzija (Paldino 1964, Szabó et al.1967, Johnston et al. 1984). Limfni sudovi se izoliraju, perfundiraju otopinom u koju je dodan "tracer", a potom posmatraju in vitro. Na taj način prikupljeni su dragocjeni podaci o transendotelijalnom kretanju. Važno je da se ultrastruktura endotela ne mijenja nakon 90-minutnog perfundiranja i da se ne može razlikovati kvantitativno i kvalitativno od kontrolnog limfnog endotela fiksiranog in vivo (Malcolm 1987).

Brzina kretanja HRP-a kroz endotel in vitro, pod statičkim uslovima, relativno je ista kod različitih limfnih segmenata. Skoro čitava količina HRP-a ograničena je na endocitotični vezikularni sistem, a samo mali dio na interendotelijalne regione. Oštećene ćelije imaju HRP raspoređen difuzno po citoplazmi. Na ovaj način izmjeren je dijametar endocitotičkih vezikula i iznosi oko 90 nm (O'Morchoe 1985). Zastupljenost vezikula u pojedinim dijelovima endotelne ćelije je slijedeća:

- slobodne vezikule unutar citoplazme 34%
- vezikule na luminalnoj površini 40,9%
- vezikule na albuminalnoj površini 22,5%
- vezikule na mjestima junkcije endotelnih ćelija 2,6%

Nema zadovoljavajućeg odgovora na pitanje da li je endocitotični vezikularni sistem limfnog endotela sistem realtivno diskretnih vezikula pokretnih kroz endotel, ili je to više ili manje kontinuirani kanalikularni sistem. Takodjer nije sasvim jasno da li je taj sistem prisutan u svim di-

jelovima endotelnih ćelija ili samo u pojedinim dijelovima ćelije.

Vezikularni transport kroz endotel zavisan je od temperature. Na $4^{o}C$ nivo proteinskog transporta bio je maksimalno reduciran, dok je pri temperaturi od $40^{o}C$ signifikantno porastao. Medjutim, temperatura ima veoma mali utjecaj na kretanje proteina pomoću necitoplazmatskih procesa, kao npr. difuzije (O'Morchoe 1984).

Endocitotične vezikule zastupljene su najviše u limfnim kapilarima i malim limfnim sudovima. Kako promjer limfnog suda postaje veći, tako se smanjuje broj vezikula, a samim tim i transport materijala u lumen limfnog suda (Casley-Smith 1985). Vezikule u zidu ductus thoracicusa, u normalnom stanju nisu uočene, što ukazuje na potpunu redukciju transporta materijala kroz endotelne ćelije.

Prema morfološkim studijama (Albertine 1980), kretanje makromolekula od intersticijuma do lumena limfnog suda odvija se skoro isključivo transendotelijalnim putem preko vezikula, a samo mali dio limfe drenira se preko otvorenih junkcija. Intercelularni kanali elektronsko-mikroskopski izgledaju jednako kao normalni intercelularni prostori, širine 15 do 20 nm, tako da izgledaju kao otvorene junkcije. Relativno prisustvo jednog od dva morfološka oblika (postojanje vezikula ili intercelularnih kanala) ukazuje na put kojim se pretežno transportuje tečnost iz intersticija u limfni sud. Prisustvo otvorenih junkcija doprinosi mišljenju da je stvaranje limfe primarno intercelularni fenomen. Ovaj način stvaranja limfe zastupljen je najviše u limfnim sudovima dijafragme i kože. Otvorene junkcije rijetko su

vidjene u renalnim i hepatičnim limfnim sudovima, što ukazuje da je intercelularni put stvaranja limfe tu manje zastupljen.

U pokušaju da uskladi ova dva mišljenja Casley-Smithova tvrdi da inicijalni limfni sudovi funkcioniraju na dva načina, zavisno od lokalnog tkivnog hidrostatskog pritiska. Autorica smatra da u kapsularnim organima, kao što su bubreg i jetra, gdje je tkivni hidrostatski pritisak znatno veći od atmosferskog, tečnost kontinuirano ulazi kroz intercelularne kanale pod gradijentom pritiska. U suprotnom, u regionima gdje je intersticijalni pritisak subatmosferski, ulazak tečnosti u limfni sud je spriječen, i zahtijeva šire prostore izmedju ćelija za prolaz.

Stoga, vezikularni sistem ima važnu ulogu u stvaranju limfe, posebno tamo gdje nisu prisutne otvorene junkcije. Prema najnovijim istraživanjima transendotelijalni transport putem vezikularnog sistema predstavlja glavni put stvaranja limfe (O'Morchoe 1985). Ovaj mehanizam ne zahtijeva prisustvo otvorenih endotelijalnih junkcija.

Obzirom da ne postoje podaci o prisutnosti transportnih vezikula u endotelnim ćelijama ductus thoracicusa u fiziološkim uslovima, kao ni u drugim limfnim sudovima većeg kalibra, u našem istraživanju jedan od zadataka je bio praćenje promjena u endotelnim ćelijama ductus thoracicusa u uslovima pojačanog protoka limfe uvjetovanog povećanjem prisustva tečnosti u intersticiju nakon djelovanja histamina.

1.4. Permeabilnost limfnih sudova

Pod permeabilnosti se podrazumijeva ulazak i izlazak materije u i iz limfnog suda. Dok velike i male molekule proteina mogu ulaziti u limfni sud, samo male partikule mogu izaći, što rezultira relativno visokom koncentracijom velikih molekula, kao što su proteini (Jdanov 1969, Leandoer 1970, Albelda 1980). Izgleda da postoje odredjena ograničenja u pogledu veličine partikula i njihovog prolaska kroz zid limfnog suda, ali tačni limiti nisu poznati. Partikule sa molekularnom težinom od 600 idu direktno u krv, a one izmedju 2.300 i 17.000 ostaju u limfnom sudu. Molekularna permeabilnost direktno zavisi od veličine endotelnih pora. Kroz male pore mogu proći molekule do 250.000, a kroz velike do 412.000 molekularne težine. Velike pore imaju prečnik do 650 $\mathring{A}$ (Mayerson 1961, Morishita 1986). Garlick i Renkin takodje su mjerili veličinu pora i ustanovili su da je prosječna vrijednost prečnika izmedju 40 $\mathring{A}$ i 45 $\mathring{A}$. Nadjeno je da je najveći dijametar pore bio 800 $\mathring{A}$. Premda je Grotte upotrebljavao terminologiju drukčiju od Garlicka, mjerenja su im bila veoma slična.

Otprilike pola proteina krvne plazme izlazi u intersticijalni prostor u toku 24 sata (Mayerson 1961), a većina se vrati u cirkulaciju putem limfnih sudova. Prolaz velikih partikula kroz kapilarni endotel može se odvijati kroz pore u endotelnoj membrani, pinocitozom ili citomempsijom. Hilomikroni prolaze kroz endotelnu ćeliju kao citoplazmatske vezikule.

Da bi objasnila razlike u regionalnoj permeabilnsoti Casley-Smithova

iznijela je postavku da je otvaranje i zatvaranje intercelularnih spojeva bio rezultat aktivnosti odredjenih zona. Tako razlikuje "mirne zone", mjesta gdje se ne odvija promet materija, i "aktivne zone", mjesta gdje je promet materija zastupljen.

Mayerson je dao objašnjenje za regionalne razlike u permeabilnosti limfnog zida na osnovu razlika u promjeru pora. U vratu, gdje je permeabilnost limfnog suda niska 95% pora su malog promjera, a samo 5% velikog promjera. U jetri, gdje je permeabilnost visoka 67% pora su velikog promjera.

Witte smatra da je permeabilnost zida limfnog suda u neposrednoj vezi sa koncentracijom proteina u krvi.

Najprihvatljivije je da su sva tri objašnjenja relevantna i da doprinose potpunijem razumijevanju funkcionisanja limfnog sistema.

1.5. Pritisak i protok limfe u limfnim sudovima

Pritisak u intersticijalnom tkivu najteže je izmjeriti,i zbog tehničkih problema mišljenja se razlikuju. McMaster smatra da je pritisak u intersticijalnom tkivu uvijek 0,5 do 1,5 cm stuba vode veći nego pritisak limfe u obližnjem limfnom sudu. To bi moglo objasniti pritok u limfne sudove na hidrostatskoj osnovi.

Guyton je usavršio mjerenja intersticijalnog pritiska i našao da je on uvijek negativan, što bi zahtijevalo mehanizam aktivnog transporta, možda parcijalno ovisnog o razlikama u onkotskom pritisku izmedju limfe i intersticijalnog fluida.

Postoje takodje prilične razlike u mjerenjima pritiska u limfnim sudovima. Chien (1982) je našao da je pritisak limfe u ekstremitetima bio niži nego pritisak u ductus thoracicusu, što bi impliciralo da je protok limfe suprotan gradijentu pritiska. Ovo se djelimično može objasniti povećanjem pritiska prilikom kretanja ekstremiteta. Blocker je opisao male promjene pritiska u limfnom sudu za vrijeme duboke inspiracije i forsirane ekspiracije.

Uporedo egzistiraju dvije teorije o protoku limfe. Klasični mehanizam zasniva se na propulzivnoj sili koja nastaje iz strukture izvan samih limfnih sudova. Kontrakcija okolnih mišića, pasivna masaža i pulzacije susjednih arterija neke su od tih sila. Miller je eksperimentom utvrdio da je masaža povećala pritisak u limfnim sudovima od normalnih 5 mm Hg do 250 mm Hg. Protok limfe u jednom pravcu osiguravaju kuspisi limfnih sudova.

Normalne peristaltičke kontrakcije limfnog suda imaju frekvenciju u rasponu od jedne do 30 u minuti. Peristaltika je prisutna i kada je životinja u anesteziji (Hall 1969), što osigurava kontinuirani protok limfe.

Povećanje venskog pritiska praćeno je povećanjem limfatičkog priti-

ska i protoka limfe do vrijednosti koja je dva puta veća od normalne (Miller 1982). Földi (1972) je eksperimentom pokazao da se protok limfe ductus thoracicusa smanjio ako se venski pritisak povećavao, sve do zaustavljanja protoka limfe na spoju ductus thoracicusa i angulus venosusa.

Opstrukcija malih vena rezultira povećanom količinom intersticijalne tekućine, što ima za posljedicu povećani lokalni protok limfe. Takodje je primijećeno prisustvo vensko-limfnih šantova (Chavez 1968). Ovakvi šantovi prisutni su i kod limfne opstrukcije. Volumen limfe koji prolazi kroz limfno-venske šantove može se izračunati i iznosi 1% od ukupne količine limfe (Dodd 1970).

1.6. Utjecaj histamina na permeabilnost zida krvnih i limfnih sudova

Bez obzira o kojoj se vrsti šoka radi, odnosno koji je uzrok šoka, patofiziološka zbivanja se odvijaju odredjenim redosljedom, jer je osnovna karakteristika svakog šoka disproporcija u raspodjeli minutnog volumena reagira na taj način da u cilju održavanja ravnoteže dolazi do lučenja kateholamina i podražaja alfa receptora, te povlačenja tečnosti iz intersticija da bi se nadoknadio manjak minutnog volumena. Ovakva reakcija ima za posljedicu kontrakcije arteriola na periferiji, te još intenzivnije oštećenje kapilarne perfuzije (Takada 1971). Medjutim, kapilarna perfuzija nije uslovljena samo gradijentom pritiska i stanjem sfinktera ko-

koji su regulirani podražajem alfa receptora, nego je uslovljava i stanje viskoziteta krvi koje uz usporavanje cirkulacije može preći u potpunu stazu (Kamei 1969). Prisutna tkivna acidoza uzrokuje otvaranje prekapilarnih sfinktera i ponovnu cirkulaciju u kapilarama, dok postkapilarni sfinkteri ostaju zatvoreni. Uz postojeću stazu ovo stanje može dovesti do potpune blokade krvotoka u tom području, pri čemu povećani pritisak u kapilarama rezultira pojačanim izlaskom tečnosti u intersticij. Ovo za šok specifično stanje mikrocirkulacije s lokalnom hemokoncentracijom i intenziviranjem povećanog viskoziteta krvi dovodi do daljih komplikacija u kapilarnom području krvotoka (Johnson 1969). Svi ovi poremećaji (acidoza, povećanje viskoziteta krvi, staza, hipoksija) idealan su preduslov za aktiviranje koagulacije krvi koja još više pogoršava stanje kapilarne perfuzije.

Smanjenje kapilarne perfuzije dalje se komplicira ograničavanjem vitalne funkcije terminalnog krvotoka koja se sastoji u dovodjenju kiseonika, te drenaži metabolita (Brigham 1975), pri čemu, usljed oštećenja transkapilarnih gradijenata za metabolite i jone, dolazi do njihovog nakupljanja u intersticijumu i intracelularnom prostoru. Dugotrajna hipoksija uz acidozu dovodi do oštećenja lisosomalne membrane i izlaska hidrolitičkih i proteolitičkih enzima koji mogu dovesti do ireverzibilnih oštećenja mitohondrija.

Istraživanja Nikulina (1964) u eksperimentalnom histaminskom šoku pokazuju da se trombociti vrlo brzo aglomeriraju i degranuliraju, te se nalaze i kao cirkulirajući trombocitni mikrotrombi. Liberacija histamina iz

trombocita djeluje na endotel i bazalne membrane krvnih sudova iz kojih se oslobadjaju kolagene tvari, a one takodje uzrokuju aglutinaciju i degranulaciju trombocita. Oštećenje zida krvnih sudova dovodi do enormnog porasta intersticijalne tekućine, a samim tim i do intenzivnijeg prelaska u limfne sudove. Takva limfa sadrži i povećanu količinu histamina koja daje odredjene posljedice na morfologiju endotela zida limfnih sudova, što je jedan od ciljeva ovoga rada.

Morris (1966) je pomoću elektronskog mikroskopa utvrdio da histamin i neki drugi biogeni amini dovode do kontrakcije endotelnih ćelija pri čemu nastaju intercelularne pukotine, koje su djelimično odgovorne za povećanje permeabiliteta kapilarnih sudova, Kontrakcija se pripisuje mikrotubularnom sistemu i filamentima u citoplazmi endotelnih ćelija koji sadrže dosta actomiozina (Cameron 1974).

Oslobadjanje histamina iz različitih celularnih elemenata u kojima je deponovan u formi spojeva s proteinima i polisaharidima može se postići pomoću mnogobrojnih fizičkih i hemijskih faktora. Ovaj vezani histamin može se nalaziti u stabilnim i labilnim vezama. Supstance koje svojim djelovanjem dovode do oslobadjanja histamina, histamin-liberatori, mogu biti površinski aktivne supstance (tween 20), mono i diabazične supstance (supstanca 48/80), visokopolimerizirani spojevi i masti (dextran, polymyxin) i aktivatori proteolize (trypsin).

Veoma je teško odrediti tačno mjesto histamina u redosljedu zbivanja u šoku, pa to pitanje i danas pobudujuje radoznalost brojnih istraživača.

U ovom radu obraćena je pažnja na promjenu permeabilnosti zida limfnih sudova kao posljedicu djelovanja histamina.

Majno i Palade objasnili su poremećaje permeabilnosti krvnih sudova u toku upale i povećanu permeabilnsot pripisali djelovanju histamina. Pomoću elektronskog mikroskopa uspjeli su registrovati oštećenje endotela i bazalnih membrana i prolazak čestica živinog sulfida kroz otvorene junkcije koje se nalaze na spojevima endotelnih ćelija. Na taj način objašnjene su brojne reperkusije tih zbivanja na povećanje sadržaja tečnosti u intersticiju i prelazak metabolita s degradacionim produktima u limfotok (Casley-Smith 1967). Mjerenjem sadržaja suhe supstance i tečnosti u endotelnim ćelijama u histaminskom šoku, dokazano je da je poremećaj permeabiliteta praćen intezivnom hidratacijom citoplazme endotelnih ćelija (Nikulin 1964).

Kroz svoj osnovni zadatak da kontinuirano drenira intersticijum i proteine krvne plazme preko limfnih sudova vraća u krvotok, limfotok je uključen u vrlo važan dio aparata odgovornog za promet materija u tkivu (Wenzel 1972). Količina intersticijalne tečnosti koja se drenira preko limfotoka u fiziološkim uslovima je mala (oko 600 ml kod kunića za 24 sata), tako da uvijek postoji znatna rezerva kapaciteta limfotoka da primi povećanu količinu limfe u stanjima povećanog prelaska tečnosti u intersticijum (Leak 1972).

Količina stvorene intersticijalne tečnosti, a samim tim i količina limfe, uslovljeni su stanjem permeabiliteta u mikrocirkulatornom području.

Iako su brojna pitanja kapilarnog permeabiliteta bila eksperimentalno obradjivana od početka ovog vijeka, s najvećim intenzitetom u šestoj deceniji (Szabó i Magyar 1957), tek je početkom sedme decenije riješen niz spornih pitanja.

Praktično je još jednom potvrdjeno da je moguće brojne pretpostavke o načinu transporta materija riješiti morfološkim metodama, a ovaj put to je bilo pomoću elektronskog mikroskopa. Sporna pitanja koja su riješena odnose se na transport tečnosti, mikro i makromolekula, dijelova ćelija i cijelih ćelija, te različitih makromolekularnih supstanci injiciranih u krvotok, kroz endotelne ćelije, njihove pore, junkcije, te bazalne membrane. U radovima Casley-Smithove detaljno su obradjeni problemi transendotelijalnog i intercelularnog transporta materija u krvnim i limfnim kapilarama, te energetske potrebe ćelija u obavljanju tog transporta. Velike molekule i sitni korpuskularni elementi transportuju se kroz endotelne ćelije u vezikularnim formacijama, pri čemu je za stvaranje vezikula, njihov transport i medjusobno spajanje u tzv. "symphyosome" potrebna termodinamska energija. Ćelija za ovaj transport ne posjedjuje nikakav regulatorni mehanizam, nego se vezikule, pojedinačne ili udružene, kreću usljed razlike u koncentraciji po principu difuzije, samo što je materijal zatvoren u veće jedinice. Pri transportu kroz endotelne ćelije, te otvorene junkcije, važnu ulogu igraju veličina čestica, razlika u koncentraciji (krv-tkivo, tkivo-limfa), te kratanje čestica (Braunovo kretanje).

Bazalna membrana izgleda da ne igra bitnu ulogu u procesu prolas-

ka materije iz krvi u intersticij, bez obzira na veličinu čestica. Svakako da je njen utjecaj pri prelasku materije iz intersticija u limfne kapilare praktično potpuno isključen, jer limfne kapilare nemaju bazalne membrane, ili su one samo djelimično prisutne i veoma tanke (Casley-Smith 1972).

Materije koje dospiju u intersticijum dijelom ponovo bivaju vraćene u krvotok, a dijelom prelaze u limfotok, dok proteini, mikro i makro čestice koje su uspješno prešle kroz zid krvnih kapilara skoro isključivo dalje bivaju transportovani preko limfnih sudova.

Otvaranje junkcije, koje imaju presudnu ulogu u uklanjanju degradacionih produkata iz intersticija, a posebno dijelova raspadnutih ćelija i sličnih partikula koje se stvaraju u šoku, uslovljeno je različitim faktorima. Posebno mjesto u tom procesu pripada histaminu.

Szabó i Magyar (1957) našli su da histamin kod pasa, u histaminskom šoku, u prvih 30 minuta povećava protok limfe za oko 6 puta, te da se nakon 2 sata protok smanjuje, ali je ipak dvostruko veći nego kontrolne vrijednosti. Pored povećanja količine limfe povećava se i sadržaj proteina u njoj. Isti autori pokazali su značaj limfe u održavanju volumena plazme u histaminskom šoku. Drenirali su limfu iz ductus thoracicusa kod pasa u prva 2 sata nakon pravljenja fistule i utvrdili da se volumen plazme smanjio za 11,9%, a zatim su kod druge grupe životinja istom metodologijom izazivanja histaminskog šoka ustanovili da se volumen plazme u istom vremenskom periodu smanjio za 25,8%. To nesumnjivo ukazuje da

pojačani protok limfe bogate proteinima ima za cilj što brže prebacivanje nakupljene tečnosti iz intersticijuma u krvotok, te da se u tim stanjima koriste velike rezerve u propusnoj moći limfotoka, koje su inače u uslovima normalne funkcije neiskorištene (Leak 1972).

Iz krvotoka u intersticijum, u stanju šoka, prelaze pored velike količine bjelančevina i druge materije, pa je njihov nivo u limfi povećan. Uočen je znatan porast nivoa laktat dehidrogenaze, kisele fosfataze i beta glukuronidaze u limfi ductus thoracicusa.

Promijenjen sadržaj limfe u ductus thoracicusu u stanju histaminskog šoka svakako će ostaviti posljedice na morfološke osobine endotela limfnog suda.

MATERIJAL I METODE

2.1. Eksperimentalni materijal i plan

Eksperimentom je obuhvaćeno 36 sivih kunića oba pola, životne dobi od 5 do 6 mjeseci i težine 2 do 2,5 kg. Sivi kunići su rezistentniji na histamin-liberaciju od bijelih, tako da je mogućnost pravilnog doziranja histamin-liberatora i kontrola dubine šoka znatno veća. Životna dob izmedju 5 i 6 mjeseci je važan preduslov, jer tada limforetikularni sistem dostiže potpunu zrelost. Involutivne promjene počinju sa 12 mjeseci i nakon 3,5 godine reducira se na 1/2.

Kunići su podijeljeni u grupe prema slijedećoj šemi:

Kontrola	6	
Akutni smrtni histaminski šok	10	
Žrtvovani pola sata nakon početka histaminskog šoka	10	36 KUNIĆA
Žrtvovani jedan sat nakon početka histaminskog šoka	10	

Za izazivanje šoka upotrebljavan je histamin-liberator Polymyxin-B-sulphat.

2.2. Eksperimentalni tretman životinja

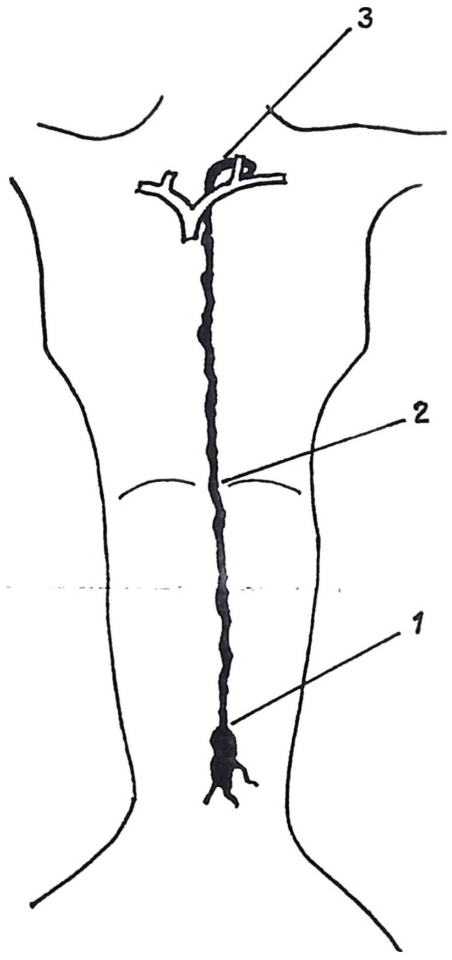
Histamin-liberator (HL) Polymyxin-B-sulphat rastvori se u fiziološkoj otopini (50 mg Polymyxin-B-sulphata u 5 ccm fiziološke otopine) i injicira se u marginalnu venu u količini od 7 do 10 mg/kg tjelesne težine. Prije injiciranja životinja se dovede u fiziološki položaj (položena na trbuh, ispruženih ekstremiteta i umotana u plahtu), pri čemu je minimal no iritirana. Kontrolna grupa životinja dobija fiziološku otopinu u količini od 2 ccm/životinji.

Ako se želi izazvati akutni smrtni histaminski šok, kompletna količina HL-a odjednom se injicira, a ako se želi da životinja preživi šok injiciranje se vrši postepeno. Takvo injiciranje omogućuje korištenje infuzionog sistema za nedonoščad, gdje se igla sa tankim kateterom uvuče u marginalnu venu, te se vrši postepeno apliciranje HL-a.

Nakon injiciranja odredjene količine HL-a, životinja se prati i kada nastupe prvi znaci histaminskog šoka (ubrzano disanje sa grčevima trbušne muskulature, tromost pokreta i zauzimanje tzv. položaja defekcije), počinje se sa mjerenjem vremena i životinje se žrtvuju prema naprijed navedenoj šemi.

Bilo da su životinje uginule u akutnom smrtnom histaminskom šoku ili da su žrtvovane, vrlo brzo se pristupa otvaranju abdomena i uzimanju uzoraka (sl. 1). Uzimaju se dijelovi ductus thoracicusa iz tri područja:

- početni dio ductus thoracicusa, u neposrednoj blizini cisterna chyli,
- srednji dio ductus thoracicusa, neposredno ispod dijafragme,
- završni dio ductus thoracicusa, na mjestu gdje se ulijeva u angulus venosus.



Šema 2. Cisterna chyli (1), diaphragma (2), angulus venosus (3)

Dijelovi ductus thoracicusa se polože na staklenu ploču, koja je sa donje strane hladjena ledom, a zatim se brzo uzimaju isječci za elektronsku mikroskopiju i stavljaju u 6%-tnu puferovanu otopinu glutaraldehida.

2.3. Obrada uzoraka za elektronsku mikroskopiju

Komadići tkiva ductus thoracicusa se fiksiraju u puferovanoj otopini glutaraldehida 2 sata, a zatim u puferovanoj (pH 7,2) 1%-tnoj otopini osmiumtetraoxida (OsO_4) 1,5 do 2 sata.

Dehidracija tkiva vrši se u nizu acetona, a kontrastiranje u toku dehidratacije fosfovolframskom kiselinom i uranil-acetatom kod druge izmjene 70%-tnog acetona. Komadići tkiva uklapaju se u poliestersku smolu DURCUPAN ACM, firme Fluka.

Rezovi se pripremaju na LKB-ultramikrotomu, te nakon ponovnog kontrastiranja uranil-acetatom i olovnim citratom mikroskopiraju i snimaju u elektronskom mikroskopu OPTON 9.

REZULTATI

3. REZULTATI

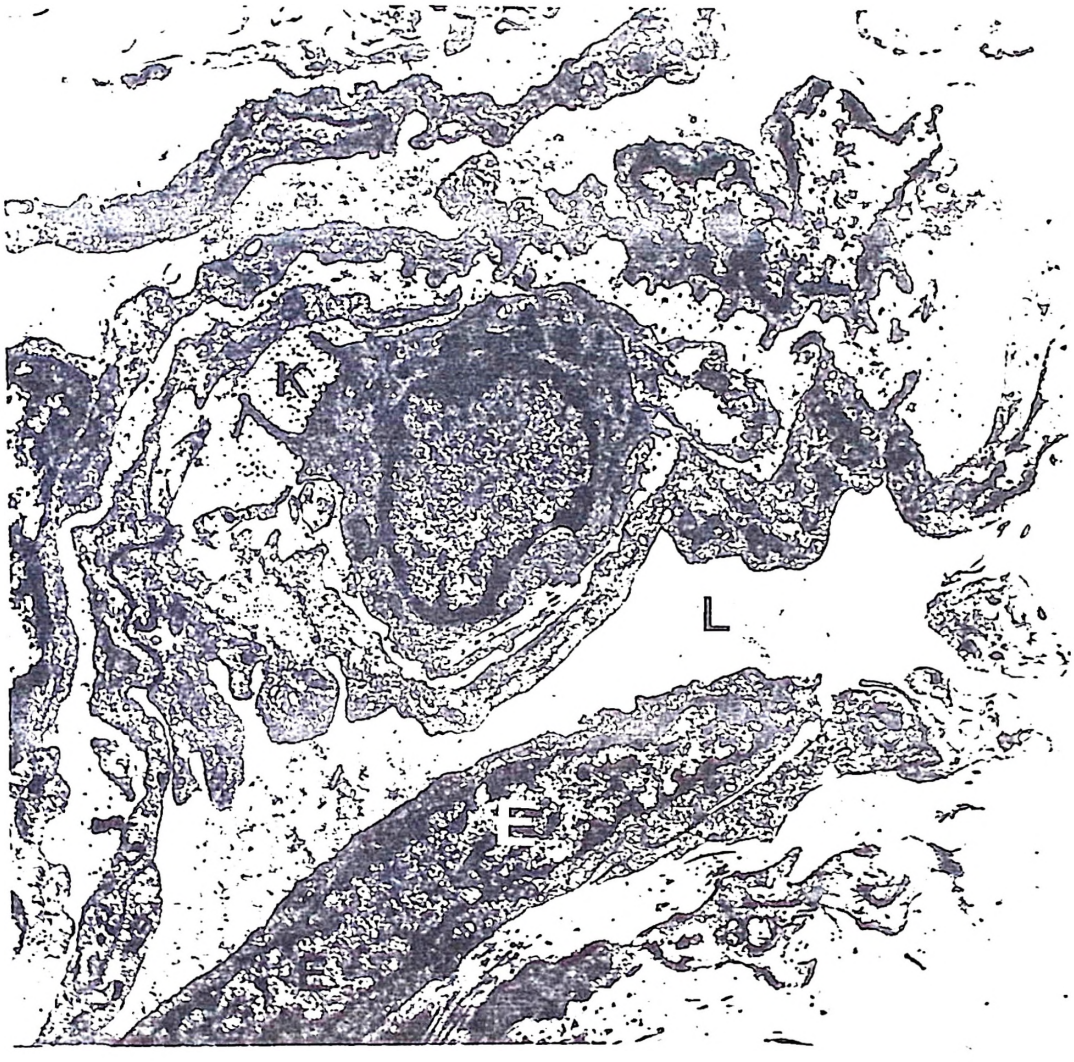
Ductus thoracicus životinja iz kontrolne grupe pokazuje tipičnu ultrastrukturnu gradju. Na poprečnom presjeku kroz ductus thoracicus uočava se široki lumen i tri sloja od kojih je gradjen zid ductusa. Intima je predstavljena jednostavnim slojem endotelnih ćelija. One medjusobno mogu biti povezane jednim od tri tipa veza medju endotelnim ćelijama: end-to-end, overlapping ili interdigitating. Zastupljenost pojedinih veza u skladu je sa iznijetim podacima u literaturi. Jedra endotelnih ćelija lagano prominiraju u lumen. Izduženog su oblika i obavijeni jedarnom membranom koja je sa unutrašnje strane obložena uskim slojem heterohromatina.

U citoplazmi endotelnih ćelija prisutne su organele. Ribozomi se pojavljuju u grupama ili rozetama, a endoplazmatski retikulum predstavljen je relativno kratkim i rijetkim cisternama. Mitohondriji su obično sferičnog oblika. Golgi aparat zauzima uglavnom perinuklearne pozicije i sastoji se od polumjesečastih lamelarnih struktura sa periferno udruženim vezikulama. Takodje se zapaža umjerena količina citoplazmatskih filamenata.

U subendotelnom sloju vidi se diskontinuirana bazalna lamina. Perifernije se nalaze elastična i kolagena vlakna presječena u različitim smjerovima. Takodje se zapažaju i glatke mišićne ćelije koje se pružaju paralelno sa endotelnim ćelijama. Te ćelije imaju elongirano jedro, a citoplazma je nešto uža i specifično gradjena.

Vanjski sloj zida ductus thoracicusa gradjen je od vezivnih tkivnih elemenata, fibroblasta, uz dodatak nervnih snopova i vasa vasorum.

Gradja ductus thoracicusa kontrolne grupe životinja donekle se razlikuje zavisno od mjesta uzimanja uzorka. Dijelova ductus thoracicusa iz distalnijih dijelova posjeduju deblji središnji sloj sa uzdužno i poprečno presječenim mišićnim ćelijama, dok proksimalniji dijelovi ductus thoracicusa imaju samo uzdužno poredane mišićne ćelije u tom sloju.

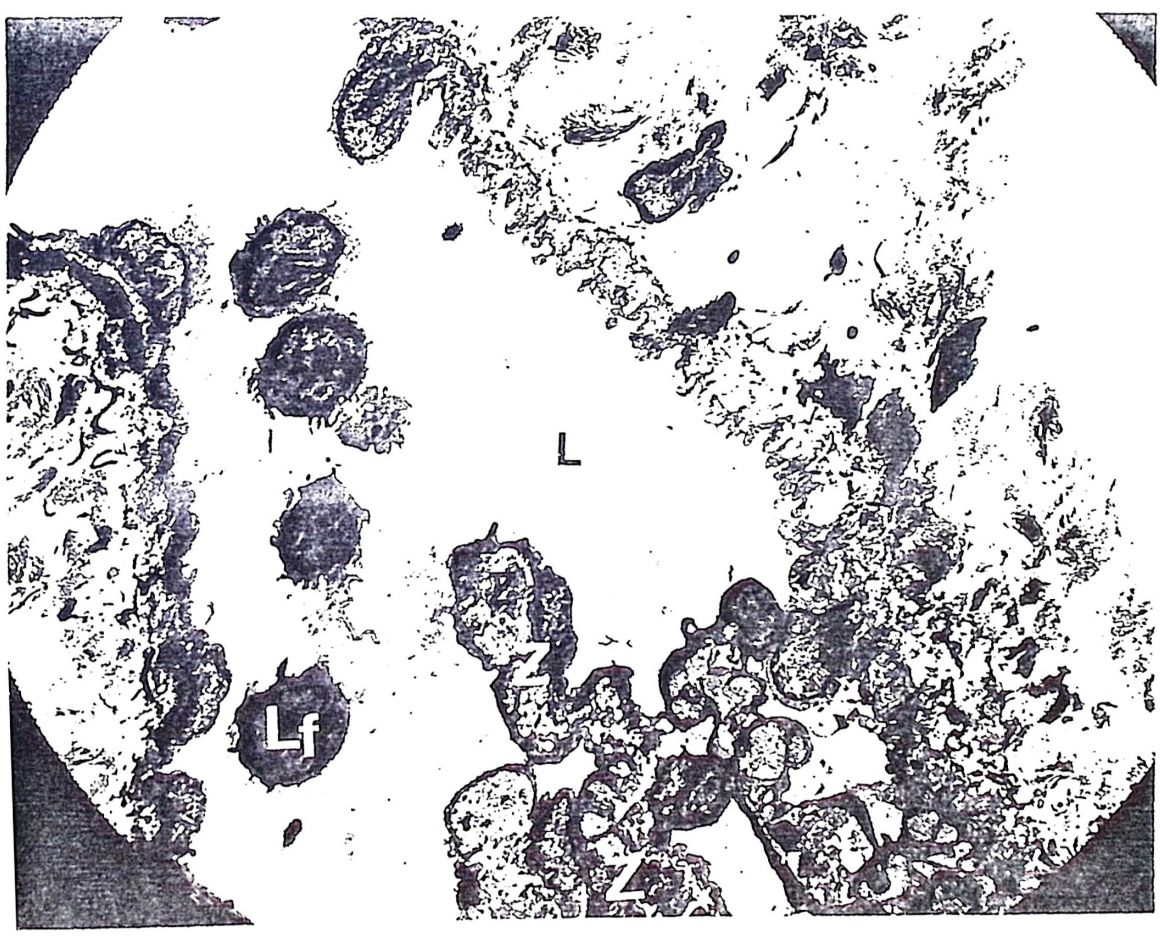


Slika 1. Lumen (L), endotelna ćelija (E), kolagena vlakna (K), junkcija (J). Kontrolna grupa, 19 600 x

Valvule ductus thoracicus obložene su endotelom koji po ultra-

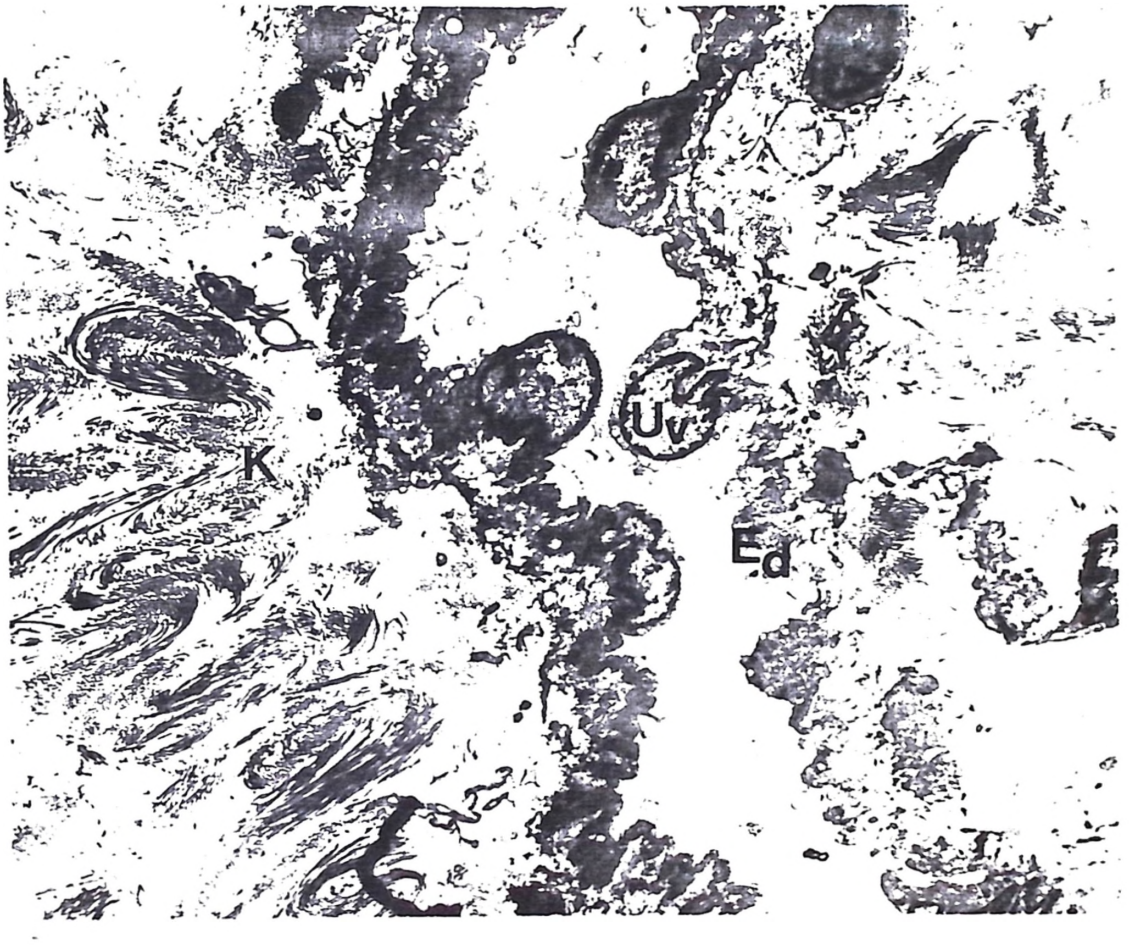
strukturnim karakteristikama potpuno odgovara endotelu ostalog dijela ductus thoracicusa. Valvule predstavljaju duplikaturu zida ductus thoracicusa.

Ultrastukturni izgled ductus thoracicusa uzetog od životinja u akutnom histaminskom šoku veoma je karakterističan po mnogim morfološkim detaljima. Na manjem uvećanju poprečnog presjeka kroz ductus thoracicus vidljiv je njegov lumen kao i čitava debljina zida. Lumen je djelimično ispunjen rijetkim sadržajem uz prisustvo limfocita.



Slika 2. Lumen ductus thoracicusa (L) ispunjen limfocitima (Lf). Bikuspidalna valvula (Z). Akutni smrtni šok, 7 600 x

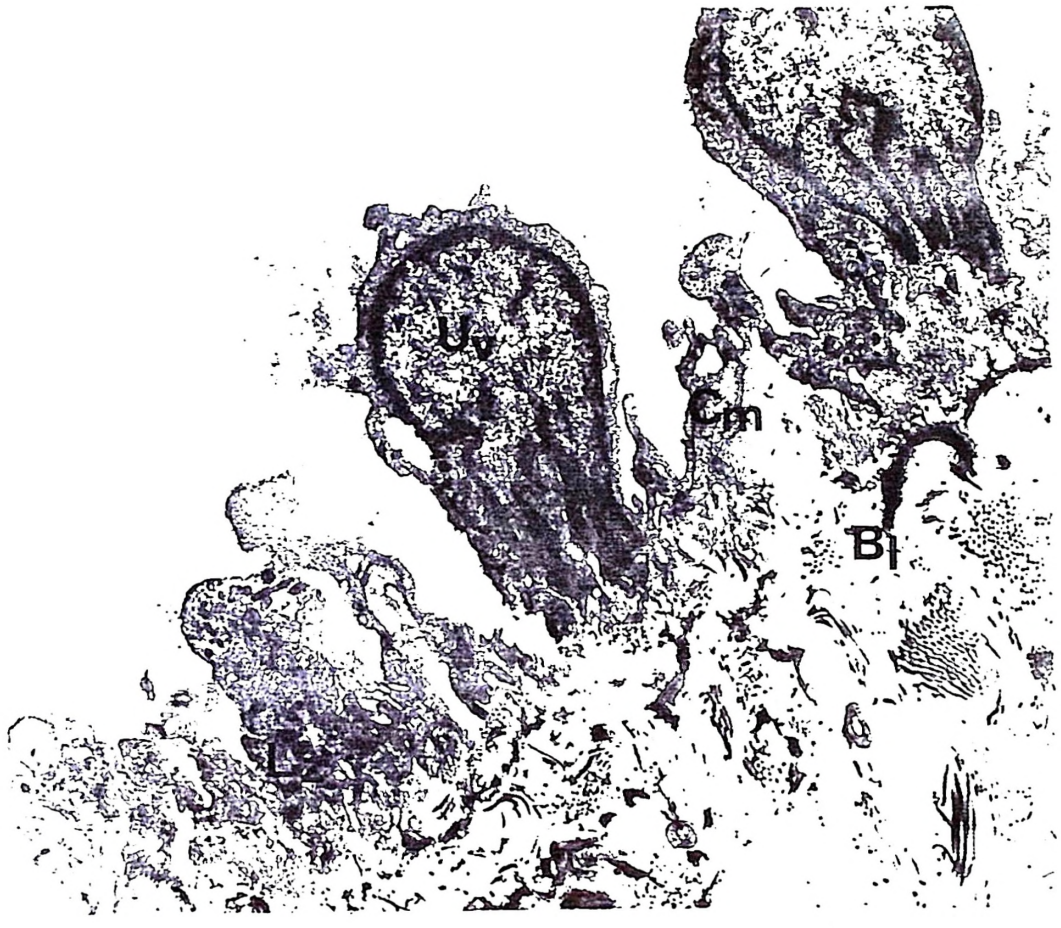
Endotelni sloj je kontrahiran, a citoplazma endotelnih ćelija naborana tako da se na površini formiraju izbočenja koja izgledaju kao mnogobrojni nepravilni mikrovili. Endotelne ćelije su izmijenjenog oblika, naborane membrane sa izbočenjima citoplazme nejednake dužine koja se pružaju prema lumenu.



Slika 3. Unicelularne valvule (Uv), kontrahirani endotel (Ed), kolagena vlakna (K). Akutni smrtni šok, 7 600 x

Isto tako, resičasta produženja citoplazme, gusto zbijena, okrenuta su i prema subendotelnom sloju. Citoplazmatska produženja različite su dužine, debljine, kao i oblika. Na pojedinim mjestima vide se prekidi u kon-

tinuitetu endotela. U elektronski gustoj citoplazmi prisutna su pojedinačna lizozomalna granula, nejednake veličine i nepravilnog rasporeda. Takodje su mjestimično prisutne pojedinačne male vakuole nepravilnog oblika i bez sadržaja. Bazalni dio ćelijske membrane endotelnih ćelija naboran je i daje izgled gušćeg kontinuiranog sloja.



Slika 4. Diskontinuirana bazalna lamina (Bl), citoplazmatski mikrovili (Cm), lizozomi (Lz), unicelularna valvula (Uv). Akutni smrtni šok, 19 600 x

Jedra endotelnih ćelija nepravilno su rasporedjena i prominiraju zajedno sa citoplazmom prema lumenu ductus thoracicusa. Mnoga jedra pokazuju

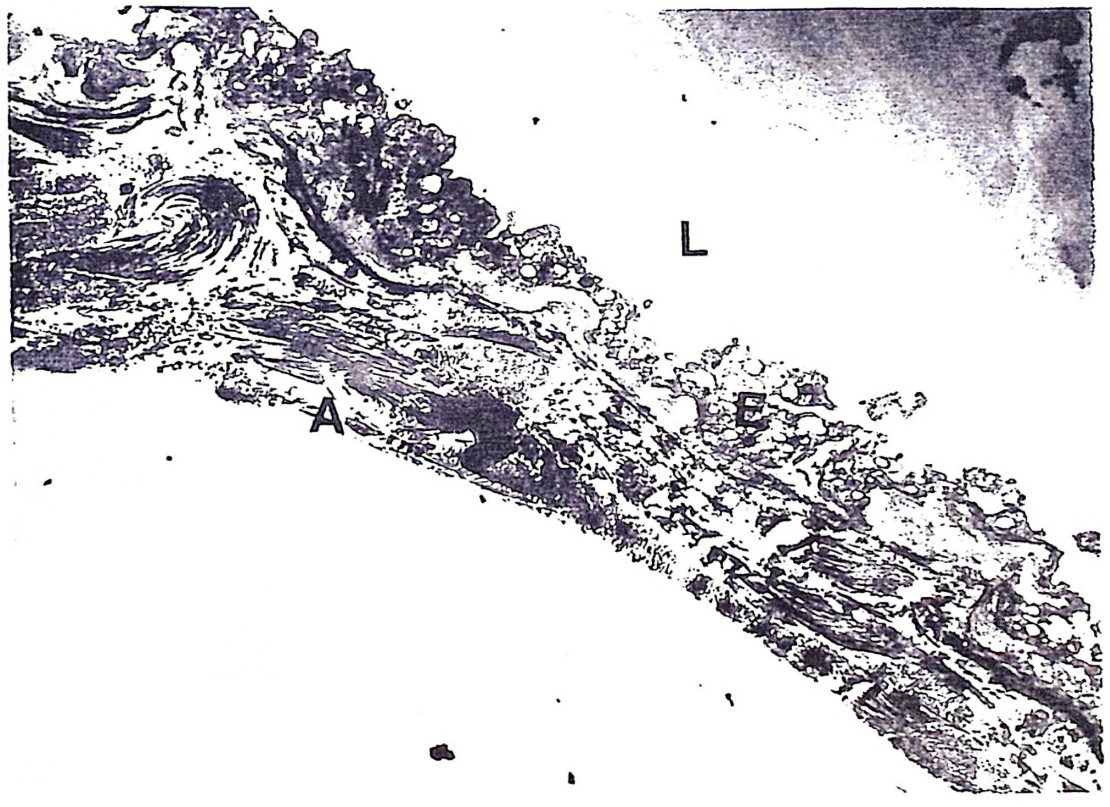
bipolarnost, kao i brojne usjeke jedarne membrane. Jedra endotelnih ćelija postavljena su okomito na stijenku ductus thoracicusa. Na taj način izdužena endotelna ćelija sa veoma kontrahiranim dijelom kojim je pričvršćena uz subendotelijalni sloj predstavlja novostvorenu jednoćelijsku valvulu ductus throacicusa. Heterohromatin je rasporedjen uglavnom uz jedarnu membranu, a manji dio se nalazi u vidu grudvica u unutrašnjosti jedra.



Slika 5. Elastična lamina (El), kolagena vlakna (K), bazalna lamina (Bl), heterohromatin (H). Akutni smrtni šok, 19 600 x

Ispod endotela vidi se elektronooptička gusta traka koja po lokalizaciji i gradji odgovara lamini elastici arteriola. Izmedju ova dva sloja prisutan je jedan rastresiti sloj u kojem se uočava diskontinuirana bazalna lamina.

U dubljim slojevima zida ductus thoracicusa dominiraju snopovi kolagenih i elastičnih vlakana. U dijelovima zida koji su bliži lumenu većina vlakana poprečno su presječena. U perifernijim dijelovima zida ductus thoracicusa uzdužno presječena kolagena vlakna su u snopovima i naborima. Kolagena i elastična vlakna popunjavaju cijeli prostor od endotelnog sloja do periferije, s tim što su presječena u različitim pravcima.



Slika 6. Adventicijalna strana ductus thoracicusa (A), lumen (L), endotel (E). Akutni smrtni šok, 7 600 x

Ductus throacicus u akutnom histaminskom šoku posjeduje veoma izražene valvule. U lumen prominira duplikatura endotela izmedju koje je prisutno mnoštvo kolagenih i elastičnih vlakana. Endotelne ćelije na valvulama izuzetno snažno su kontrahirane, a citoplazmatski nastavci različitog oblika i veličine čine granicu prema lumenu ductusu thoracicusa.



Slika 7. Bikuspidalna valvula (Bv), bipartitno jedro (N) - sekundarna jednoćelijska valvula. Akutni smrtni šok, 7 600 x

Citoplazmatski nastavci ulaze duboko izmedju kolagenih vlakana.

Na pojedinim mjestima citoplazma endotelnih ćelija kao da je odljubljena od subedndotelnog sloja. Jedra endotelnih ćelija uglavnom su bipartitna i svojom dužom osovinom prominiraju u lumen. Uz jedarnu membranu rasporedjen je heterohromatin, a ima ga razbacanog po cijelom jedru u obliku grudvica.

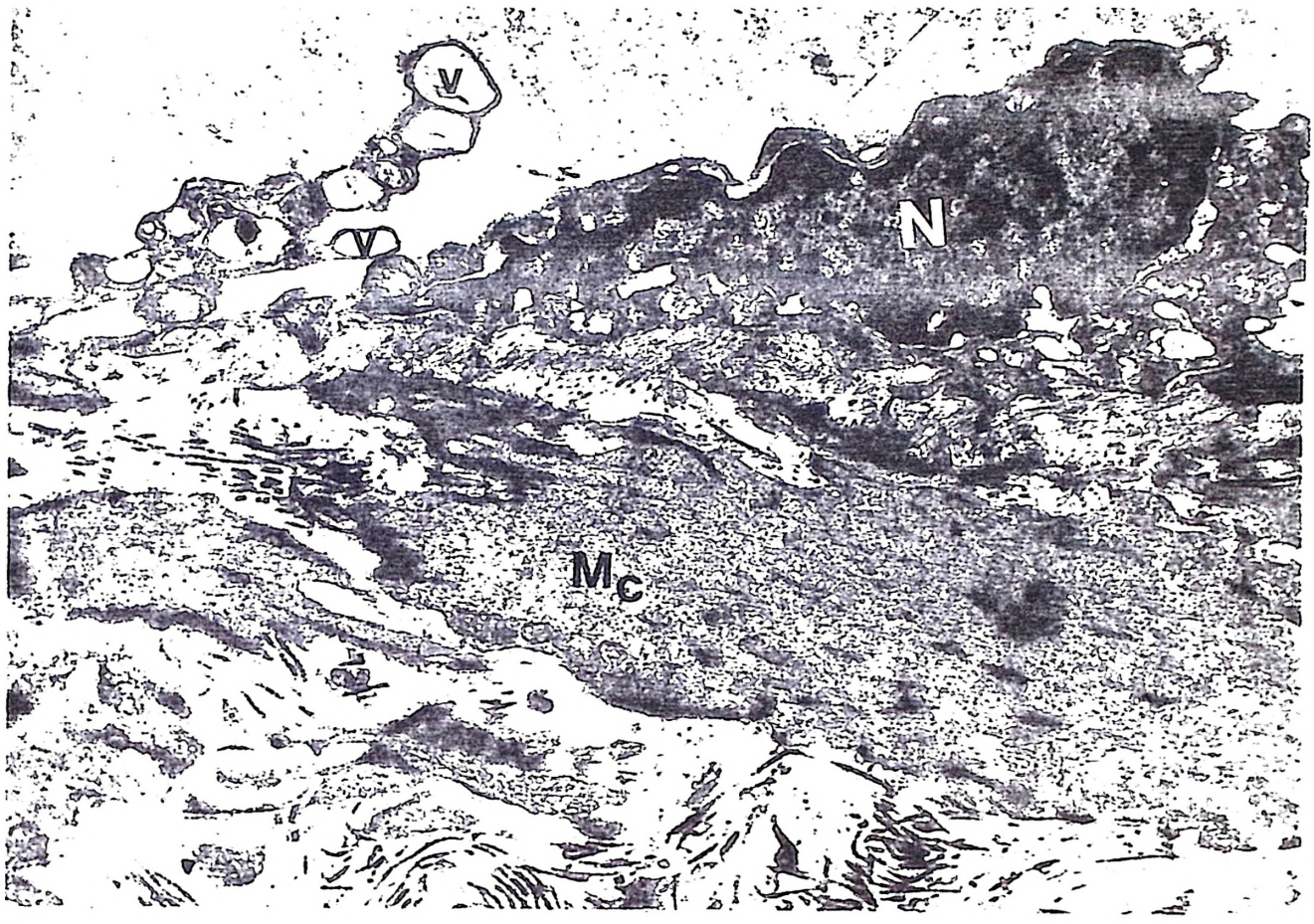
Kroz središnji dio valvule protežu se bogati snopovi poprečno presječenih kolagenih vlakana, dok su na periferiji valvule vlakna presječena uglavnom koso i uzdužno. Na samoj bazi valvule nalazi se nakupina kontrahiranih jedara endotelnih ćelija u obliku vijenca.

Citoplazma endotelnih ćelija ductus throacicusa u akutnom histaminskom šoku pokazuje veoma izraženu vakuolizaciju.



Slika 8. Vakuole endotelnog sloja ductus thoracicusa (V), kolagena vlakna (K). Akutni smrtni šok, 9 500 x

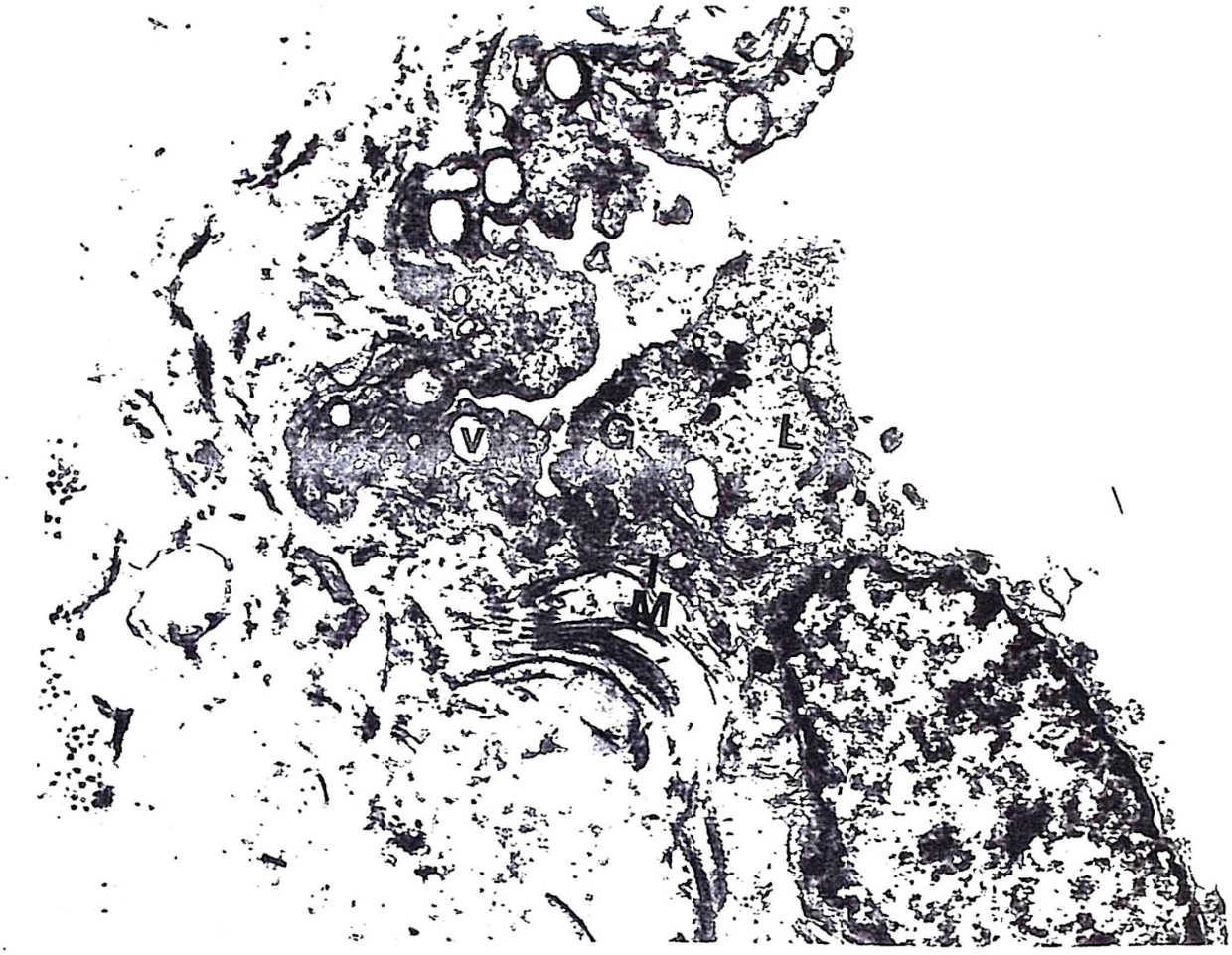
Na cijelom prostoru citoplazme prisutne su gusto poredane vakuole uglavnom okruglog i ovalnog oblika. Većina ih je bez sadržaja, dok su neke ispunjene rijetkim sadržajem. Uočene su krupnije prazne vakuole i to na perifernim citoplazmatskim nastavcima.



Slika 9. Vakuole u citoplazmi endotelne ćelije (V), mišićna ćelija (Mc), jedro endotelne ćelije (N). Akutni smrtni šok, 9 500 x

U citoplazmi endotelnih ćelija prisutne su i lizozomalne granule, sitnije i u manjem broju od vakuola. Na luminalnoj strani endotelne ćelije vide se vakuole poredane u nizu. Citoplazma endotelnih ćelija bogata je mitohondrijama i Golgi kompleksima. U neposrednoj blizini Golgi kompleksa

vidljive su velike vakuole nepravilnog oblika.

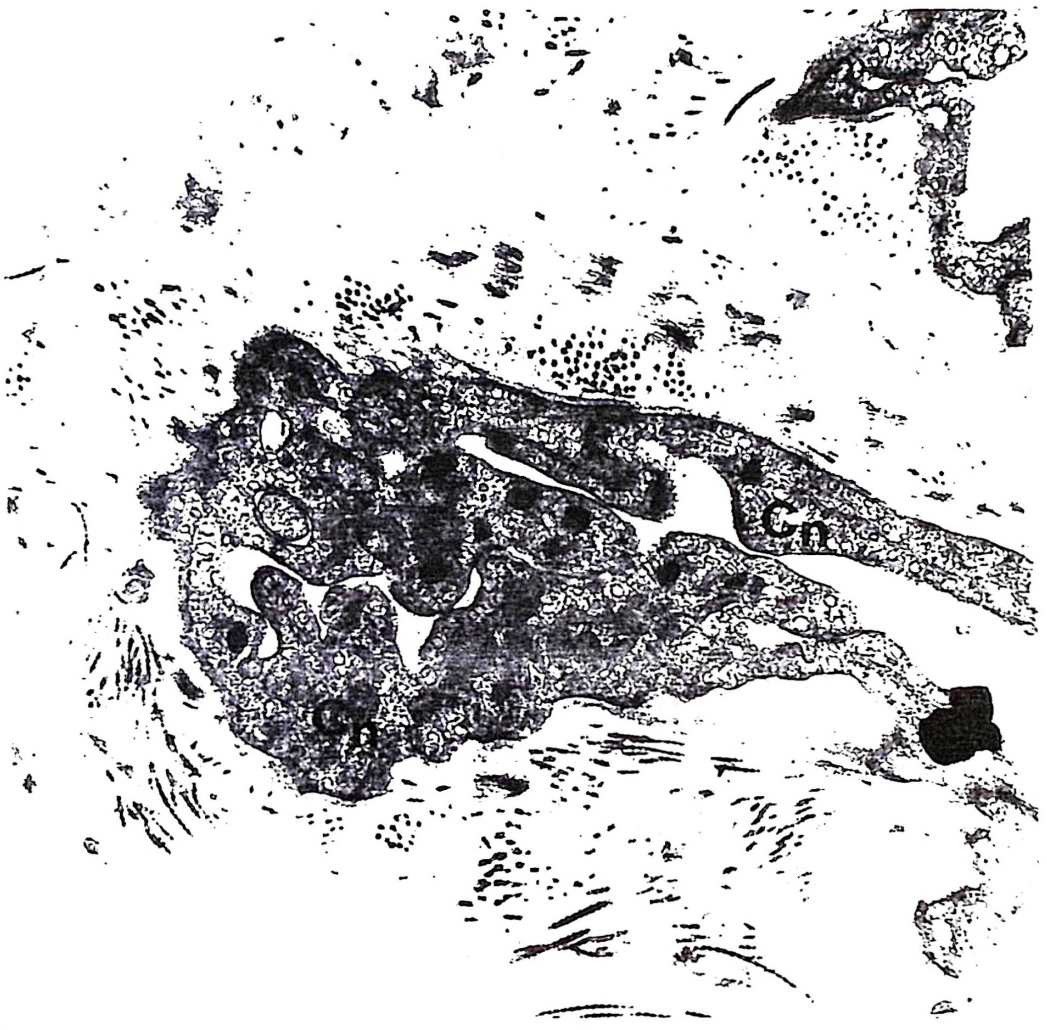


Slika 10. Golgi kompleks (G), lizozomi (L), mitohondrije (M), vakuole (V). Akutni smrtni šok, 19 600 x

U lumenu ductus thoracicusa uz sami njegovendotel uočljivi su fragmenti citoplazme u kojima su prisutne prazne vakuole, kao i same vakuole sa uskim citoplazmatskim obrubom.

Ductus thoracicus kunića koji je bio pola sata u histaminskom šoku odlikuje se izmijenjenim ultrastrukturnim morfološkim detaljima.

U nivou intercelularnih spojeva endotelnih ćelija tipa interdigitacija uočavaju se slijedeći morfološki oblici. Citoplazmatski nastavci dviju endotelnih ćelija dolaze u kontakt tako da su dva produžetka sa jedne strane u dodiru sa tri produžetka druge strane.



Slika 11. Citoplasmatski nastavci endotelne ćelije (Cn) u interdigitacijskom spoju 30 minuta nakon šoka, 19 600 x

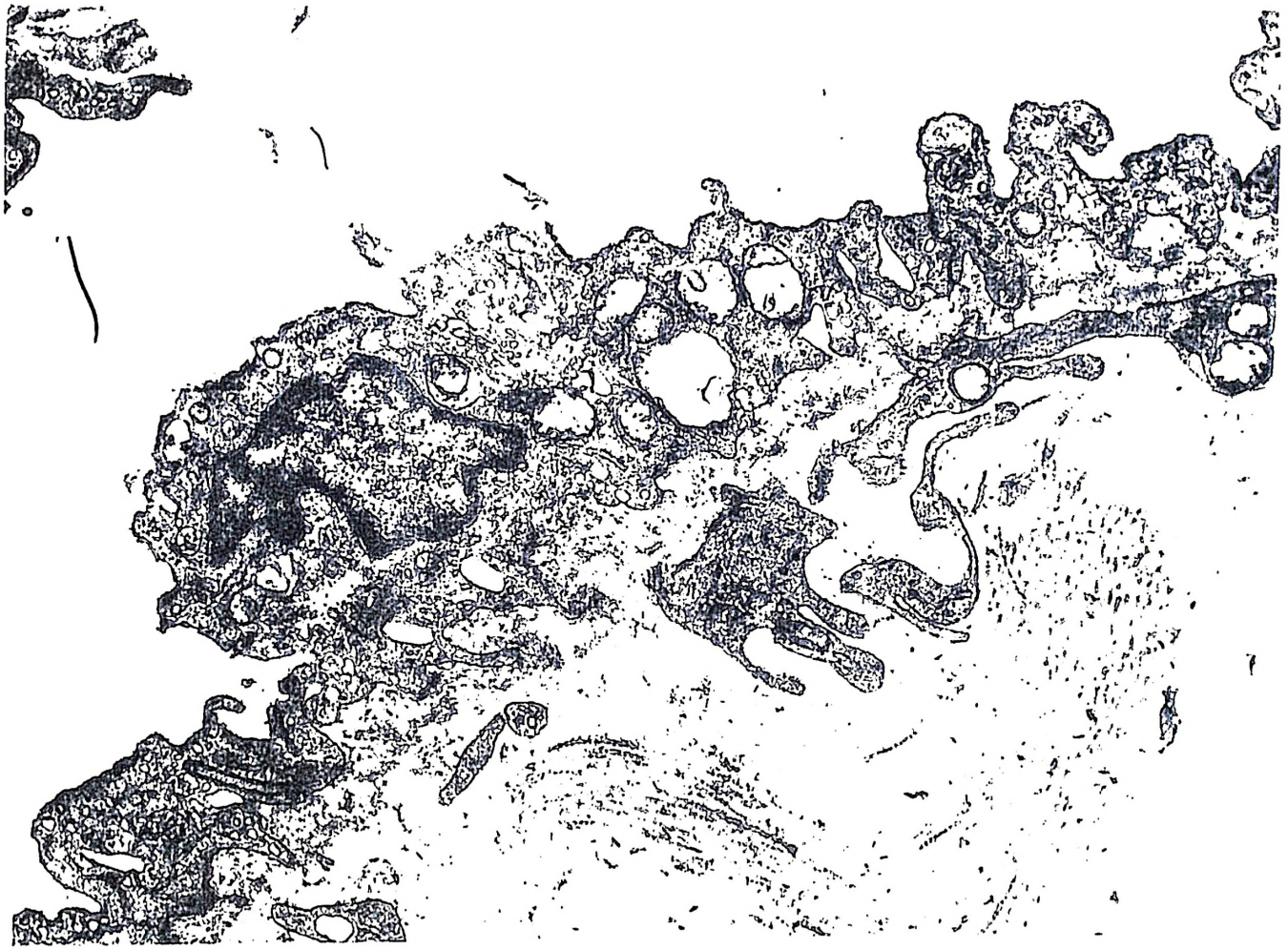
Mjesto spajanja dva nastavka mjestimično je dilatirano, tako da se stva-

raju proširenja koja su nejednake dužine i širine, a posjeduju i usjeke koji ulaze duboko u citoplazmatski nastavak. Mjesto spajanja dvije endotelne ćelije tipom veze interdigitacija poprima bizaran izgled. Interdigitacioni nastavci citoplazme izuvijani su i isprepleteni jedan sa drugim uz postojanje pojedinačnih proširenja. Citoplazmatski nastavci su naborani i prema subendotelnom sloju. U okolini interdigitacionog spoja dviju endotelnih ćelija nalazi se mnoštvo kolagenih i elastičnih vlakana. Vlakna su u manjim snopovima poprečno presječena, a izmedju njih se provlače uzdužno presječena vlakna.

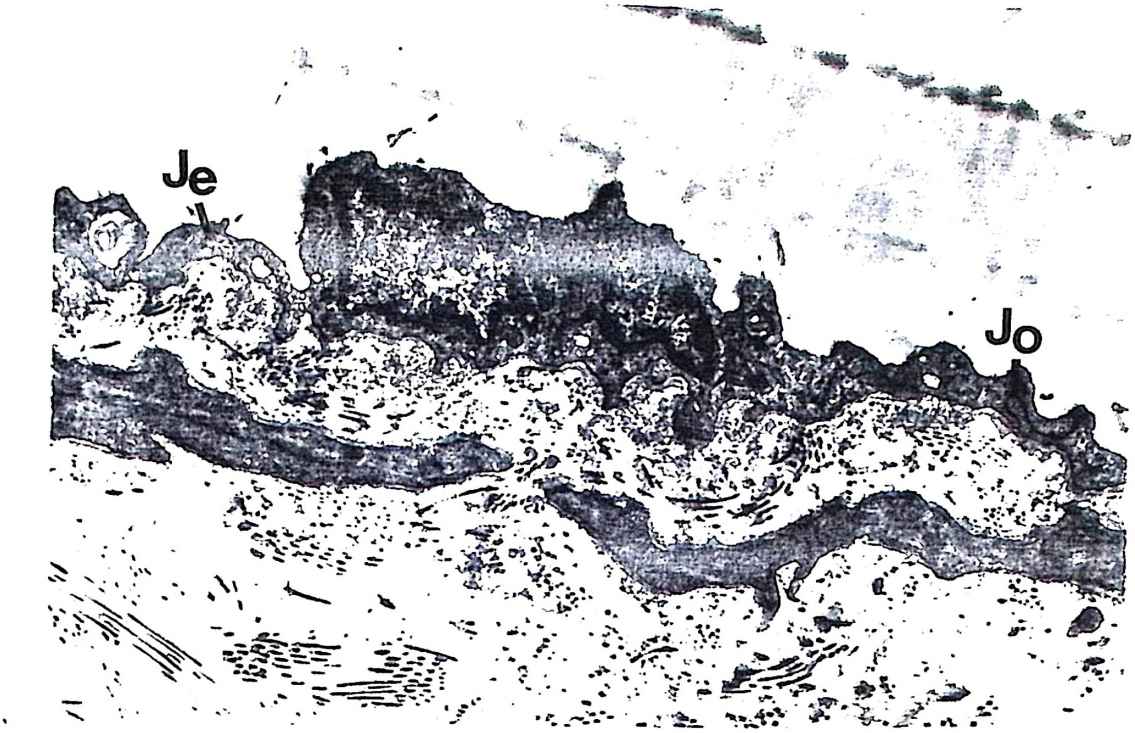
U vezama endotelnih ćelija tipa end-to-end nisu uočene promjene morfološke strukture.

U vezama endotelnih ćelija tipa overlapping morfološke promjene rezultat su kontrakcije čitavog endotelnog sloja. Na taj način dva preklapajuća citoplazmatska nastavka postaju naborana. Kada se jedan nastavak nabora više od drugog dolazi do stvaranja šupljina na mjestu savijanja citoplazmatskog nastavka. Te dilatacije u interćelijskom kontaktu mogu biti izmedju dva dijela istog citoplazmatskog nastavka, kao i izmedju citoplazmatskih nastavaka dviju susjednih endotelnih ćelija. Na taj način se u jednom overlapping spoju pojavljuje dilatacija.

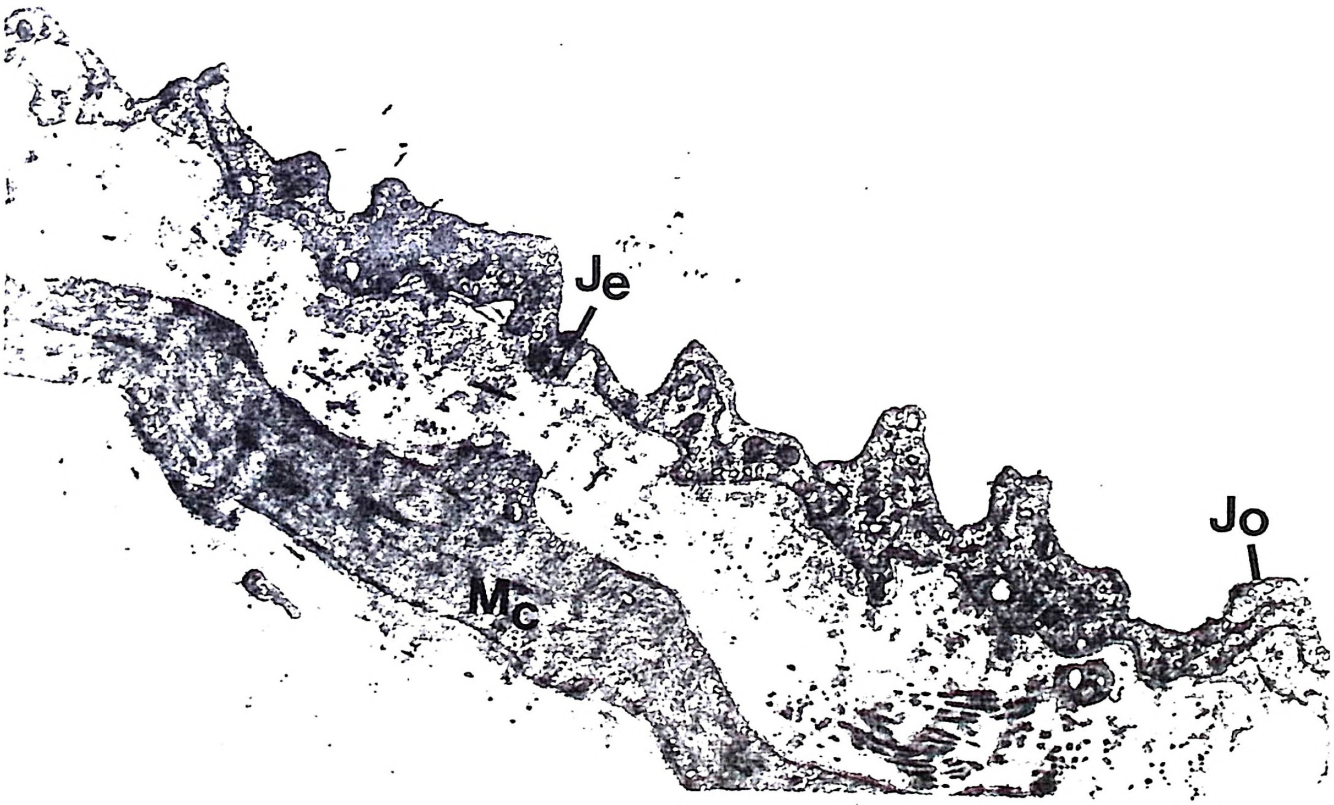
Ako se oba citoplazmatska nastavka susjednih endotelnih ćelija isto kontrahiraju ne dolazi do morfoloških promjena u overlapping sloju.



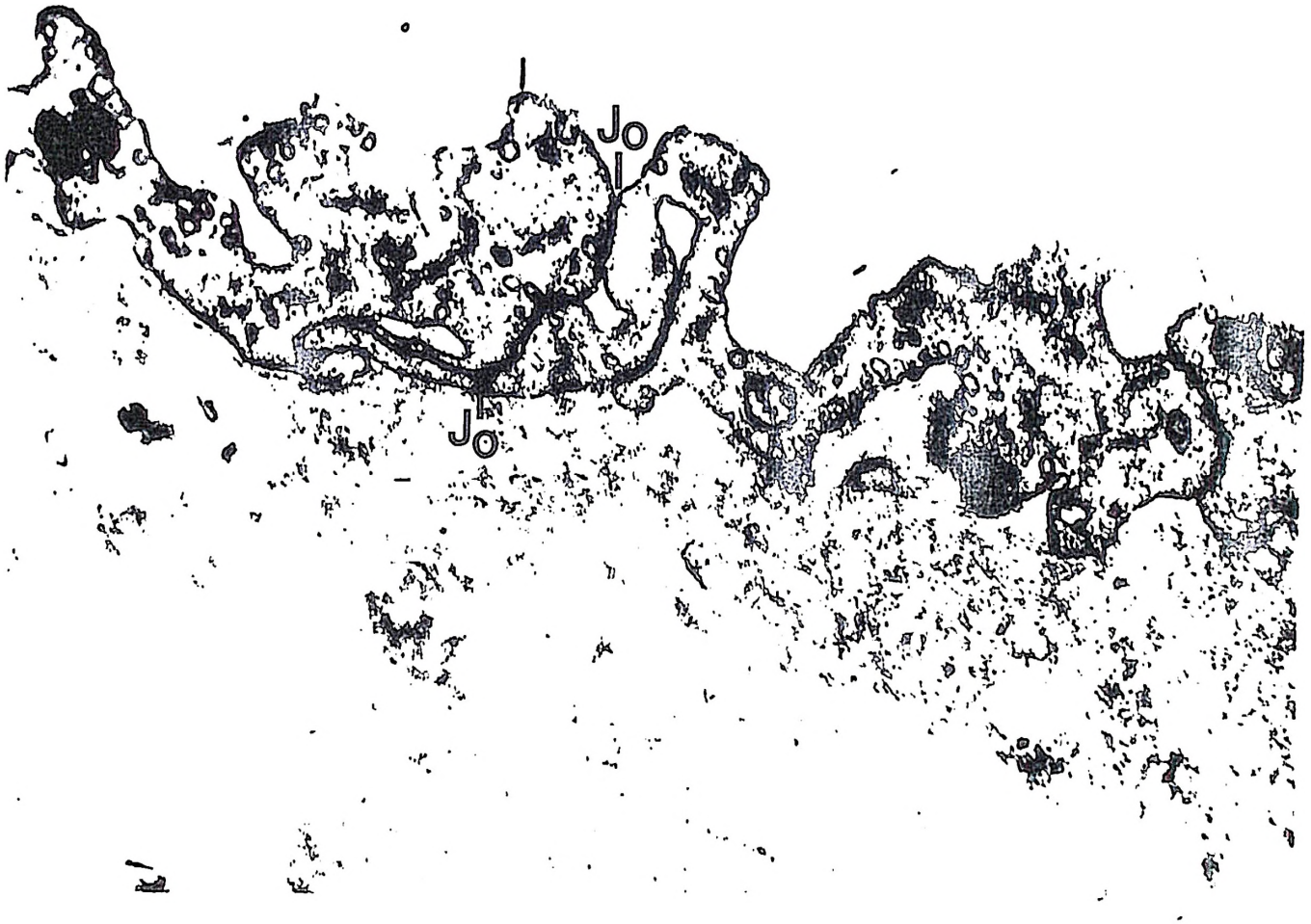
Slika 12. Tipičan izgled endotela ductus thoracicusa u histaminskom šoku od 30 minuta. 9 500 x



Slika 13. Junkcija end-to-end (Je), junkcija overlapping (Jo), 30 minuta nakon šoka, 9 500 x



Slika 14. Junkcija end-to-end (Je), junkcija overlapping (jo), mišićna ćelija (Mc), 30 minuta nakon šoka, 9 500 x

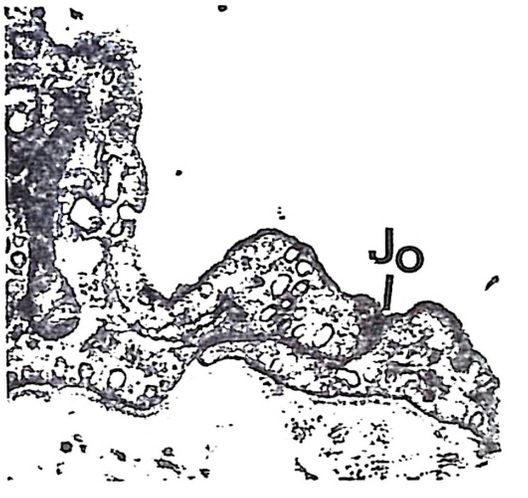


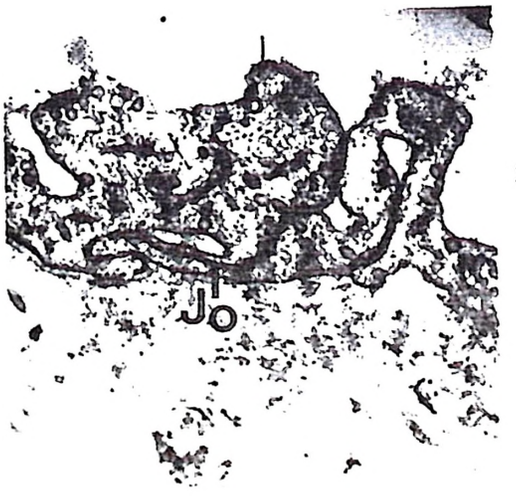
Slika 15. Overlapping junkcija kod kontrahiranog endotela (Jo), 30 minuta nakon šoka, 9 500 x



Slika 16. Junkcija end-to-end (Je)
30 minuta nakon šoka, 9 500 x

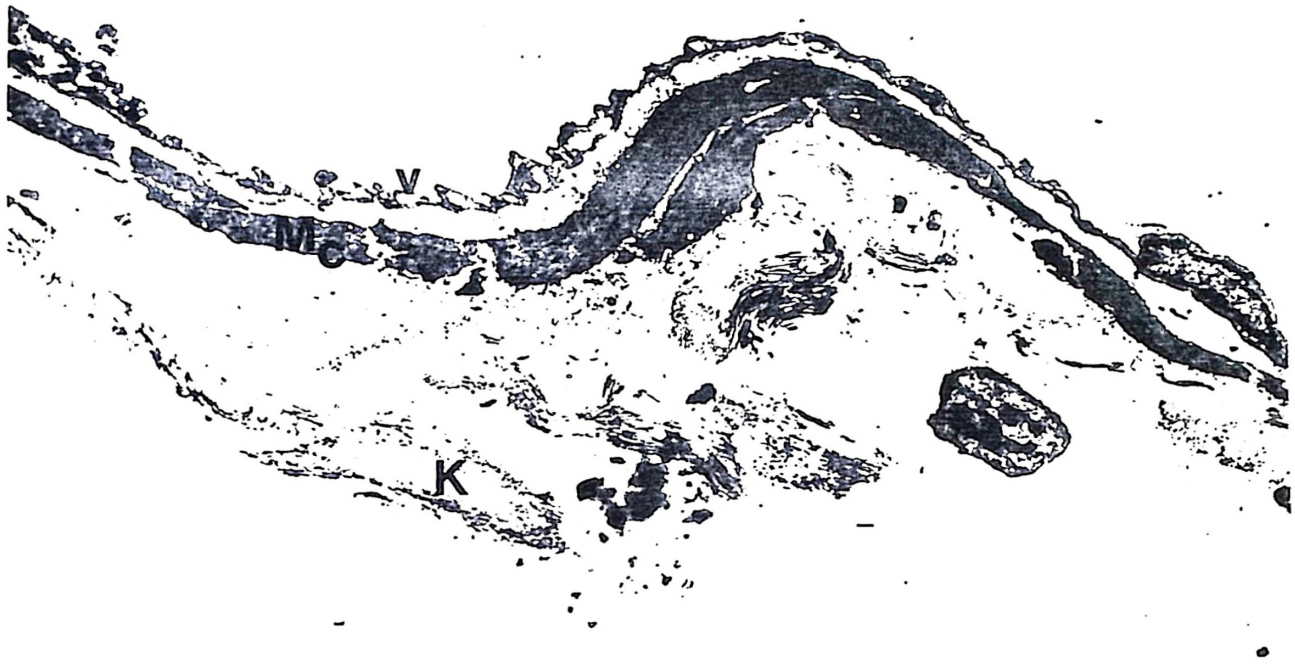
Slika 17. Junkcija overlapping (Jo)
30 minuta nakon šoka, 9 500 x





Slika 18. Junkcija overlapping pri kontrakciji endotela (Jo)
30 minuta nakon šoka, 9 500 x

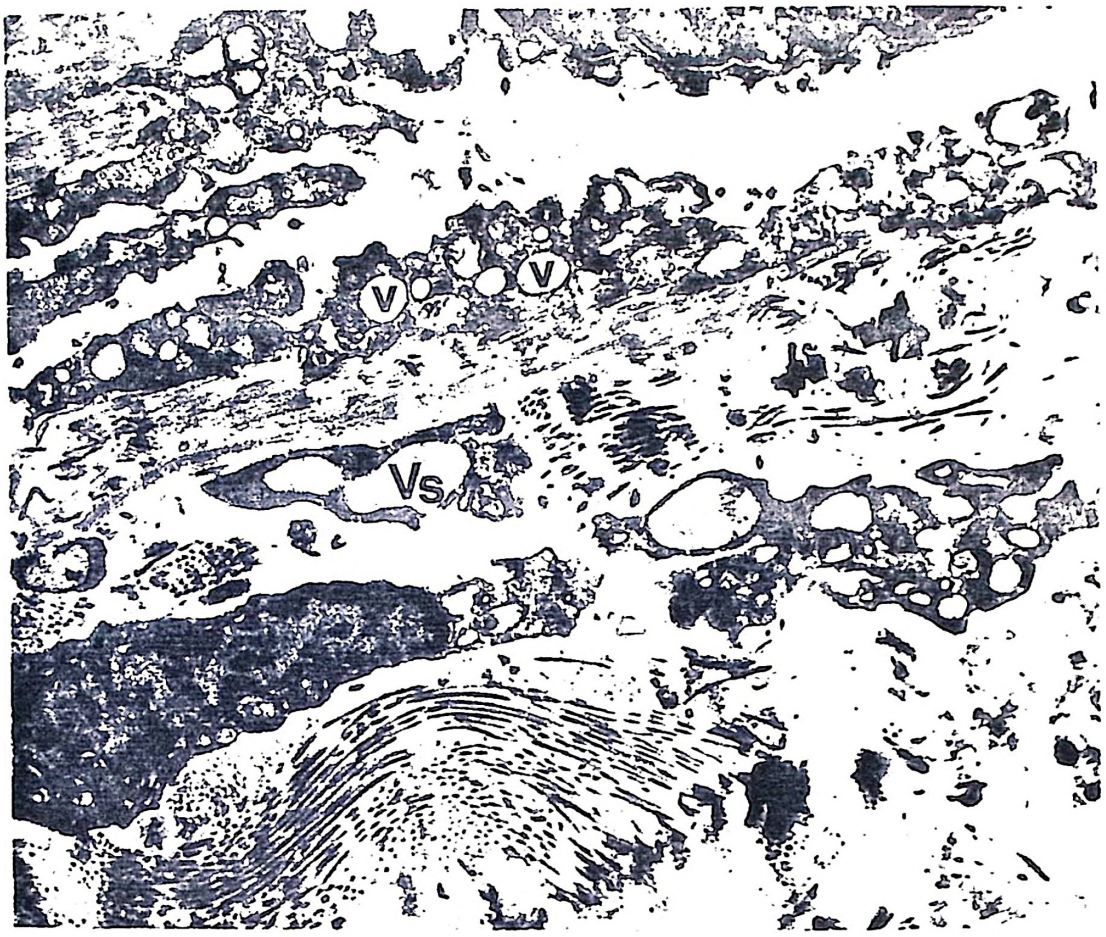
Najuočljivija ultrastukturna morfološka promjena zida ductus thoracicusa kunića koji je proveo pola sata u histaminskom šoku je vakuolizacija citoplazme. Na manjem uvećanju poprečnog presjeka ductus thoracicusa vakuole u citoplazmi endotelnih ćelija čine vijenac koji se proteže čitavom dužinom endotelne ćelije.



Slika 19. Vakuolizirana citoplazma (V), mišićna ćelija (Mc), kolageno vlakno (K) 30 minuta nakon šoka, 7 600 x

Na većem uvećanju vide se vezikule koje su uglavnom ovalnog ili nepravilnog oblika. Većina vezikula je bez sadržaja,a neke su ispunjene rijetkim sadržajem. Vide se i vezikule koje su otvorene u lumen ductus thoracicusa. Uočavaju se krupne vezikule nastale spajanjem dvije ili više pojedinačnih vezikula, sa lučnom jednosturkom konturiranom membranom.

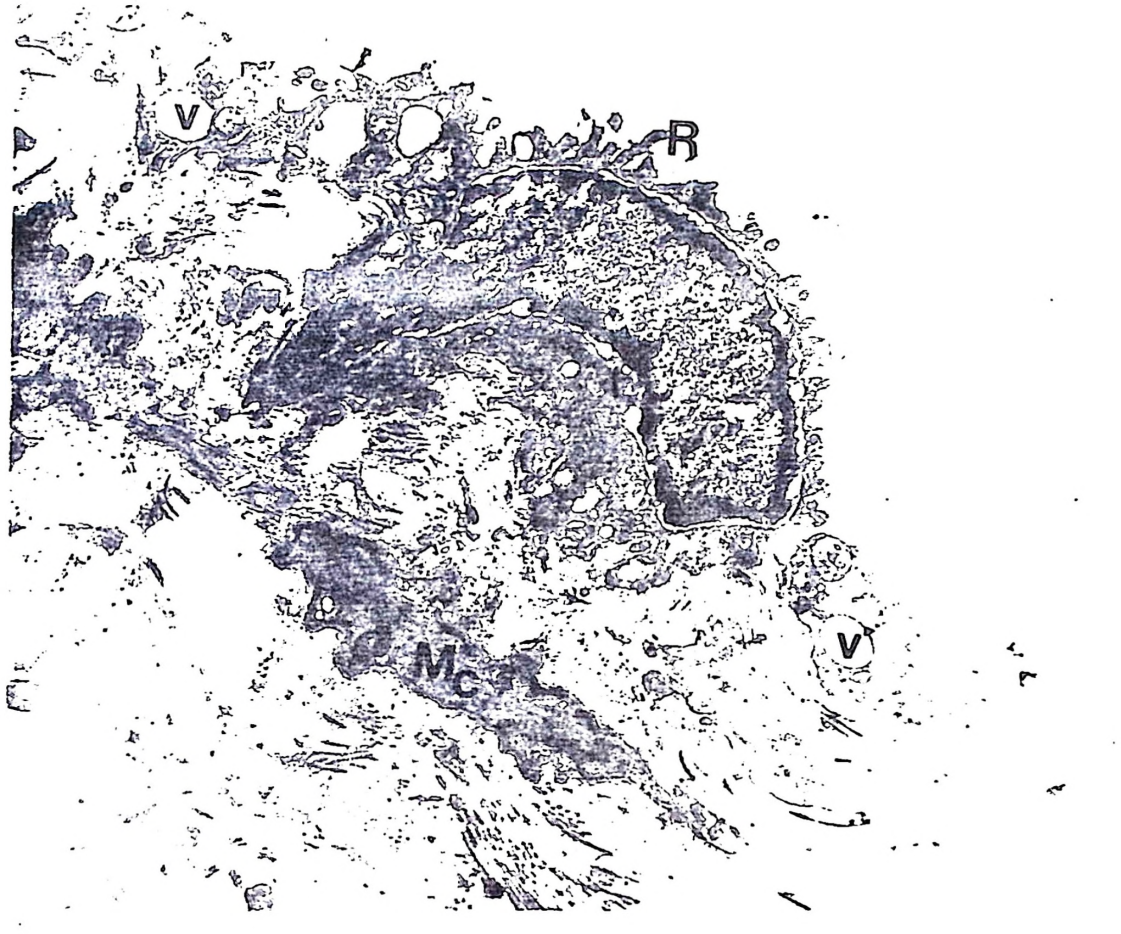
Vezikule su rasporedjene po čitavoj citoplazmi endotelnih ćelija.



Slika 20. Vezikule endotelnog sloja zida ductus thoracisusa (V), vezikule subendotelnog sloja zida ductus thoracicusa (Vs) 30 minuta nakon šoka, 9 500 x

Izrazita kontrakcija endotela stvara produžetke citoplazme koji se resičasto pružaju prema lumenu ductus thoracicusa. Pojedini fragmenti citoplazme zapažaju se u samom lumenu ductus thoracicusa. Endotelni resičasti produžeci ulaze duboko i u subendotelni sloj. Ispod endotela vidljiv je bjelančevinasti materijal kao znak prisustva diskontinuirane bazalne lamine.

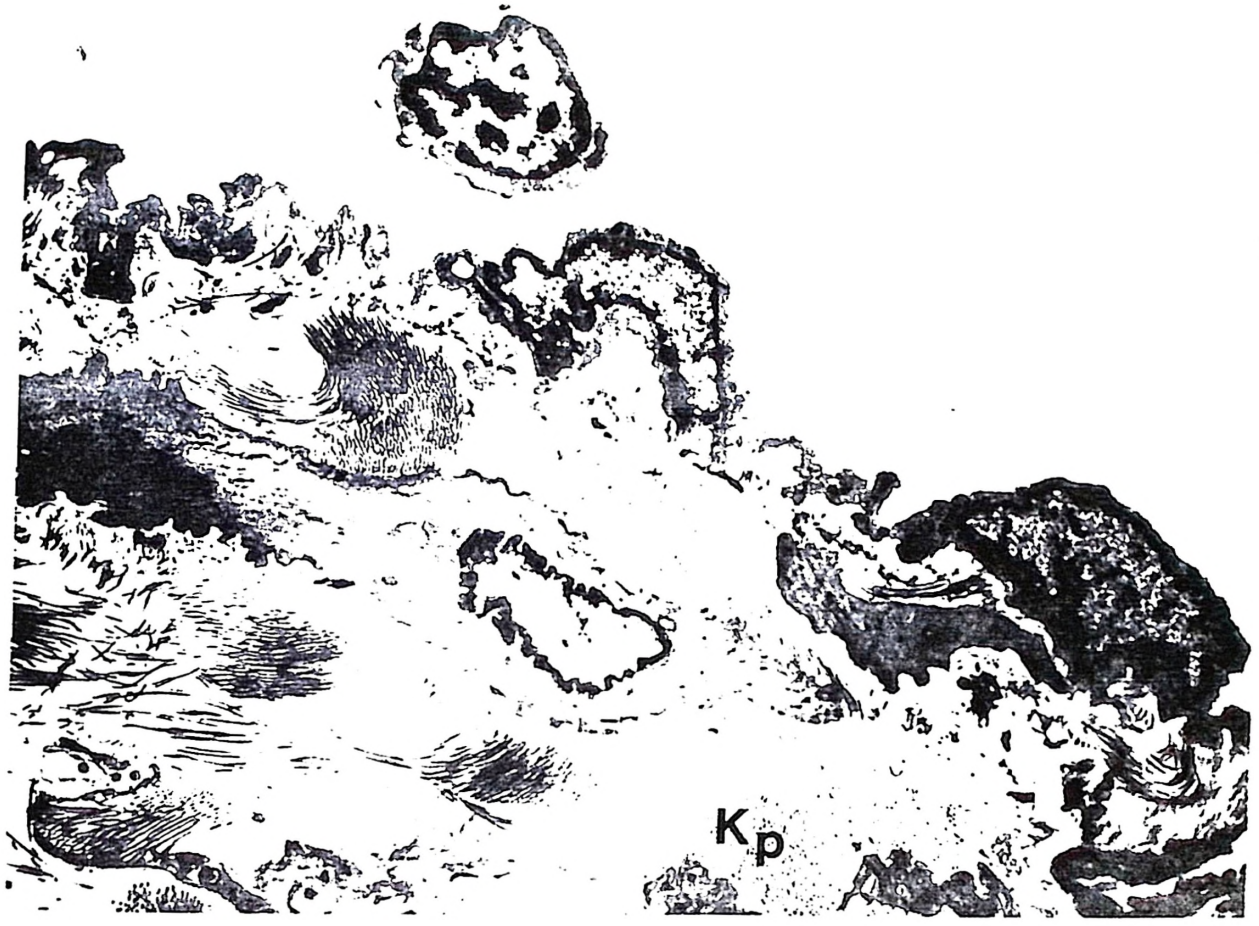
U subendotelnom sloju zapažaju se glatke mišićne ćelije. One posjeduju naboranu ćelijsku membranu, a ta naboranost po intenzitetu slična je naboranosti endotelnih ćelija.



Slika 21. Resičasti produžeci citoplazme endotelne ćelije (R), mišićna ćelija (Mc), vakuole (V). 30 minuta nakon šoka, 9 500 x

Ispod bazalne lamine su gusto poredana poprečno presječena kolagena vlakna. Zauzimaju ravnomjerno široki prostor paralelan sa endotelnim slojem. Periferno od ovoga sloja kolagena vlakna presječena su

koso i uzdužno, bez pravilnosti u smislu zastupljenosti i smjera.

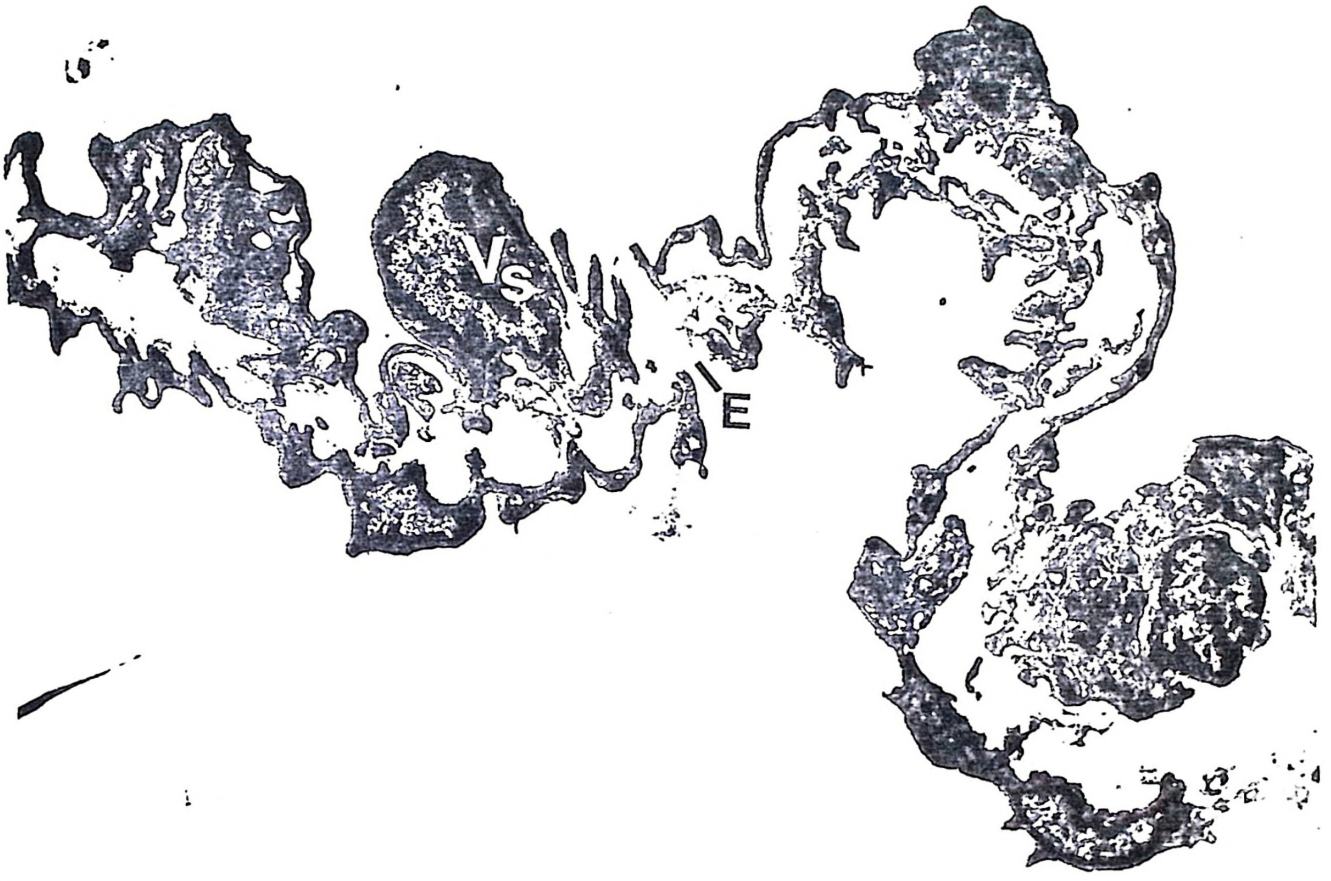


Slika 22. Poprečno presječena kolagena vlakna (Kp),
uzdužno presječena kolagena vlakna (Ku)
30 minuta nakon šoka, 7 600 x

Tunika intima kao cjelina pokazuje nabore različite veličine u koje ulazi endotel i subendotelni sloj. Ovi nabori prominiraju u lumen ductus thoracicusa i predstavljaju njegove valvule.

Valvule ductus thoracicusa u subakutnom histaminskom šoku

imaju specifične ultrastukturne detalje koji odudaraju od valvula kontrolne skupine.



Slika 23. Jednoćelijska sekundarna valvula (Vs), diskontinuirani endotel valvule ductus thoracicusa (E) 30 minuta nakon šoka, 7 600 x

Središnji dio valvule gradjen je od nakupina uzdužno i koso presječenih kolagenih i elastičnih vlakana. Prema periferiji kolagena vlakna su u velikim snopovima i poprečno su presječena. Ti snopovi kolagenih vlakana čine izbočenja valvule prema lumenu ductus thoracisusa. Endotelni sloj koji obavija valvule u neposrednom je kontaktu sa tim poprečno presječnim kolagenim vlaknima i slijedi izbočenja koja ona formiraju.

Endotelni sloj je takodje kontrahiran i citoplazmatski nastavci endotelnih ćelija ulaze izmedju kolagenih vlakana. Ti nastavci su različitog oblika i dužine sa batičastim završecima.



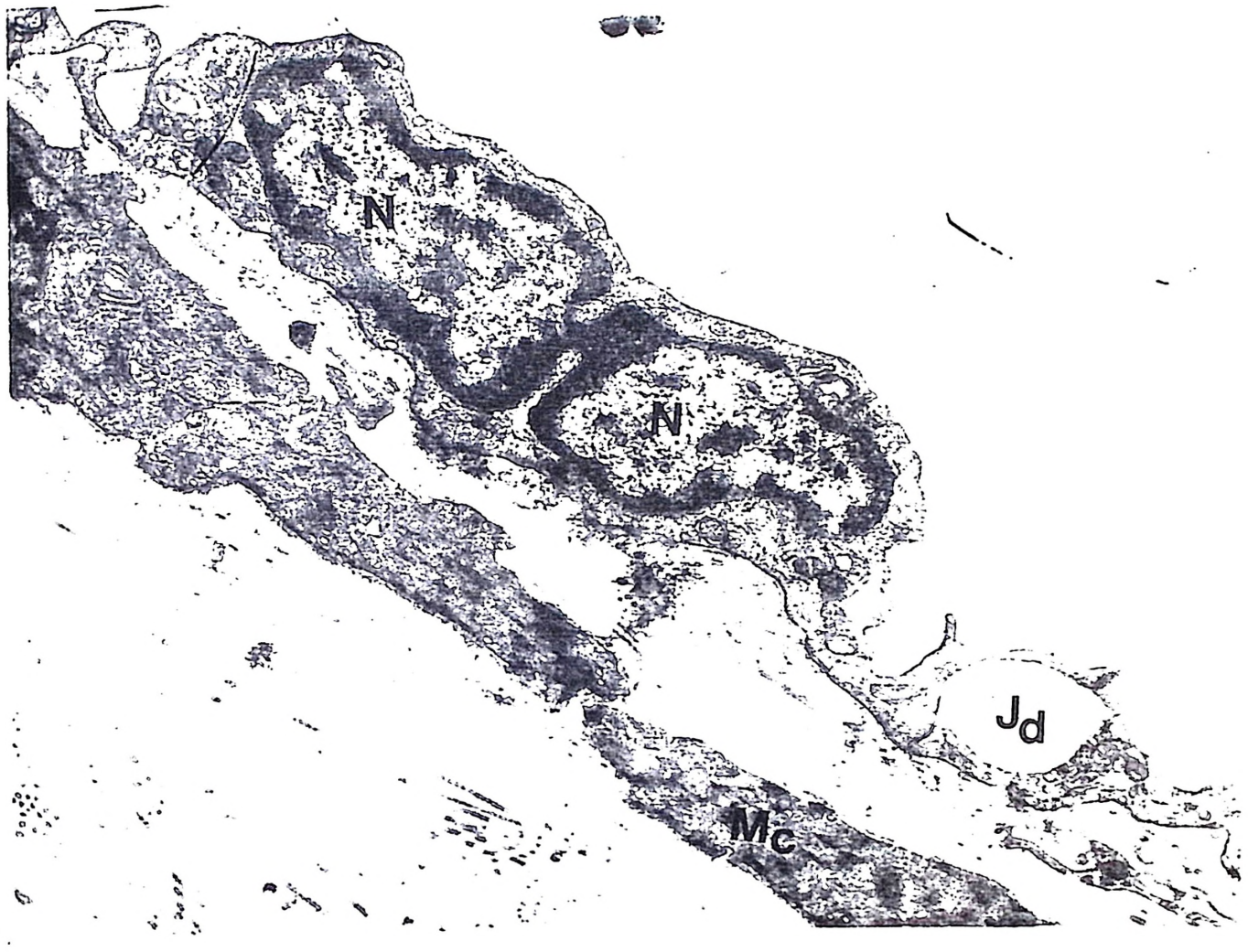
Slika 24. Elongirano jedro endotelne ćelije na bazi valvule (Ne), kontrahirano jedro endotelne ćelije na vrhu valvule (Nk).
30 minuta nakon šoka, 7 600 x

Jedra endotelnih ćelija na valvulama izmijenjenog su oblika, izrazito kontrahirana i prominiraju u lumen ductus throacicusa sa tankim obrubom citoplazme. Jedra su uglavnom skvrčena sa nepravilnim rasporedom heterohromatina.



Slika 25. Jedra dviju kontrahiranih endotelnih ćelija u neposrednom kontaktu (N), rezičasti produžeci citoplazme okrenuti prema endotelnom sloju (R) 30 minuta nakon šoka, 19 600 x

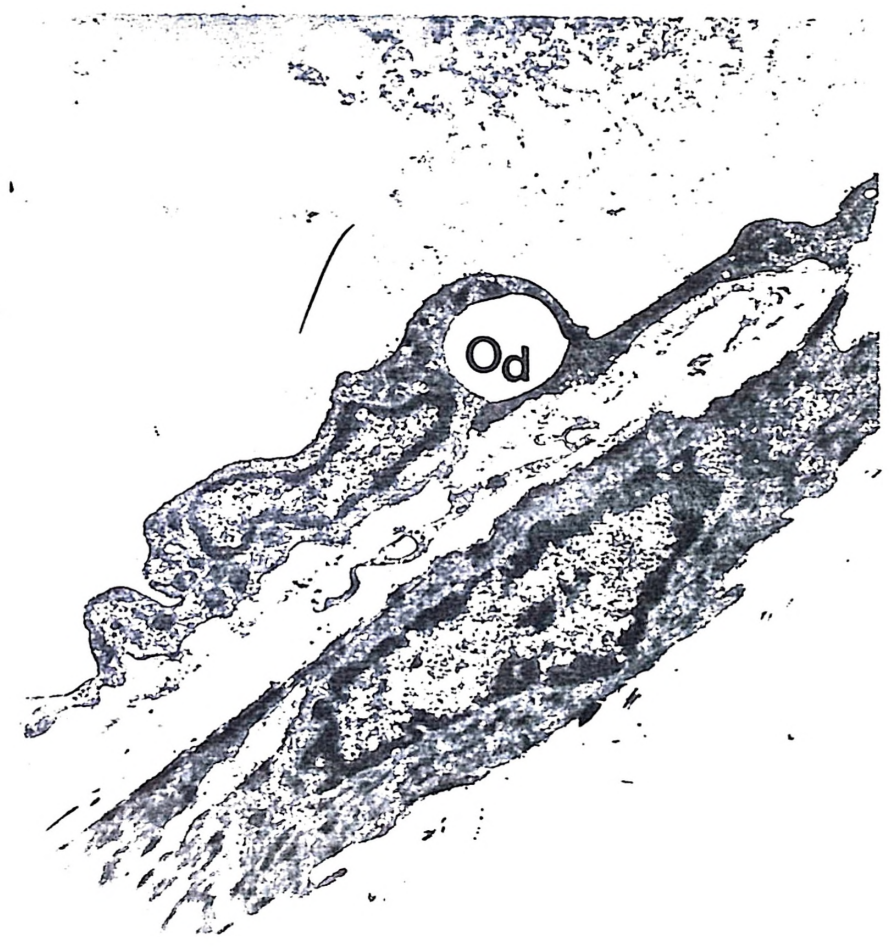
Ductus throacicus kunića koji su bili u protrahiranom histaminskom šoku (jedan sat) takodje pokazuje izmijenjen ultrastukturni izgled u nekim morfološkim detaljima. Veze izmedju endotelnih ćelija tipa end-to-end znatno se razlikuju od onih u kontrolnoj grupi.



Slika 26. Junkcije end-to-end sa dilatacijom (Jd), bipartitno jedro endotelne ćelije (N), mišićna ećelija (Mc), 60 minuta nakon 9 500 x

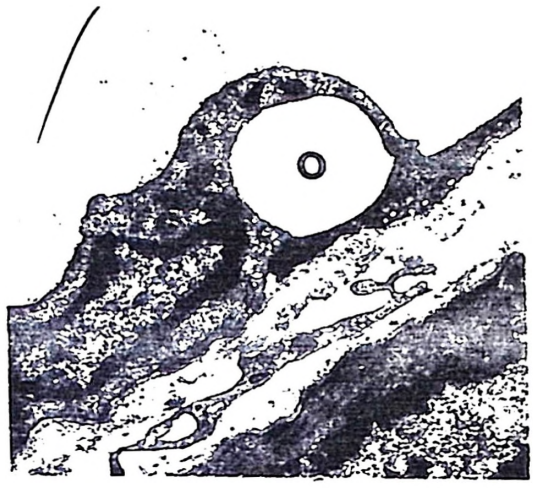
Citoplazmatski nastavci dvije susjedne endotelne ćelije su u kontaktu svojim spljoštenim završecima. Po cijeloj širini spoja uočava se velika di-

latacija tako da su ćelije medjusobno spojene samo uskim krajnjim dijelovima citoplazmatskih nastavaka. Dilataciona šupljina je uglavnom ovalnog oblika sa glatkim rubovima i bez sadržaja. Ovako proširena veza izmedju dvije endotelne ćelije prominira prema lumenu ductus throacicusa. Kod overlapping tipa veze izmedju endotelnih ćelija dešavaju se slične morfološke promjene. Citoplazmatski nastavak jedne endotlne ćelije preklapa se sa citoplazmatskim nastavkom druge endotelne ćelije, ali se neposredno dodiruje samo svojim početkom i krajem.



Slika 27. Junkcija overlapping sa dilatacijom (Od)
60 minuta nakon šoka, 9 500 x

U srednjem dijelu nastavka postoji dilatacija koja ima okrugli ili ovalni oblik. Rubovi citoplazmatske membrane koji okružuju dilataciju su glatki, a dilataciona šupljina je bez sadržaja.

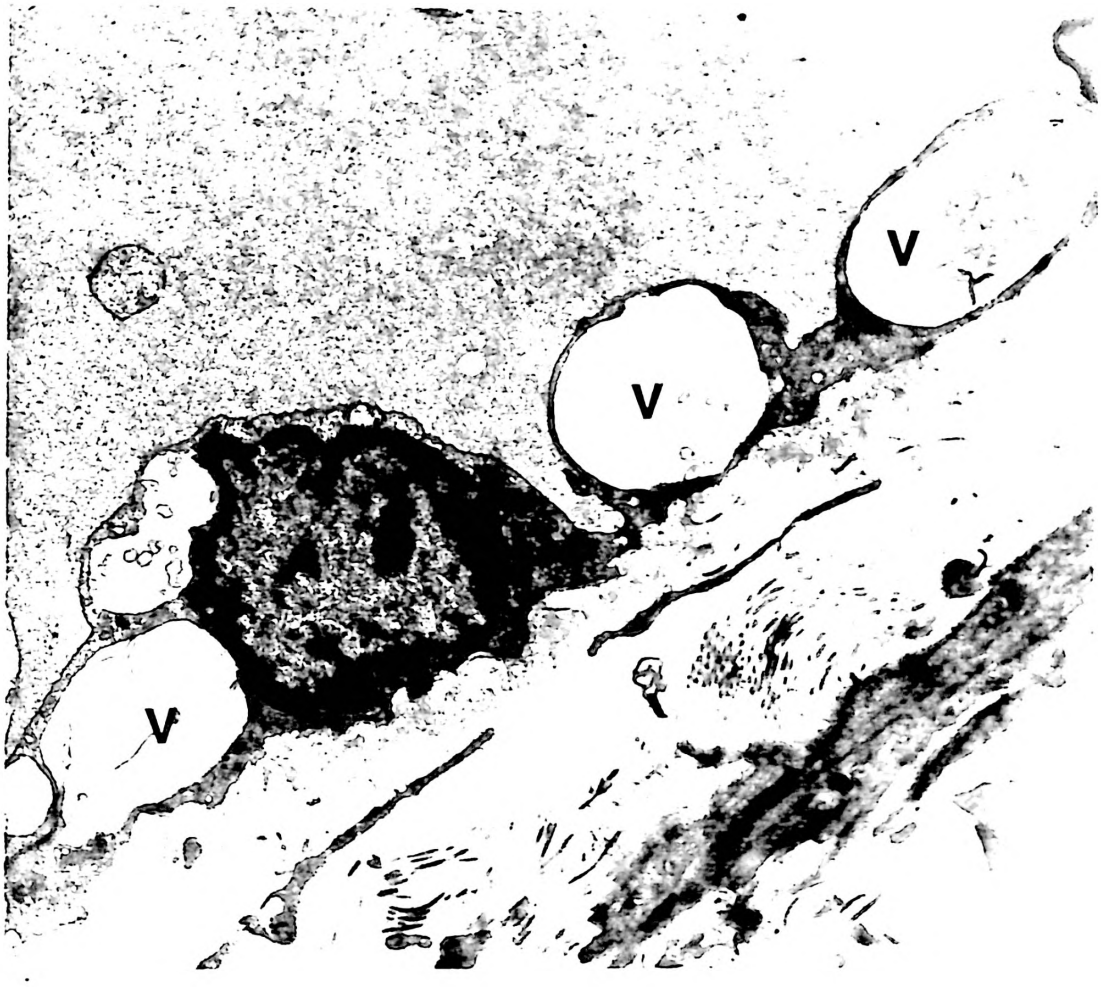


Slika 28. Okrugla dilatacija overlapping junkcije (o)
60 minuta nakon šoka, 9 500 x



Slika 29. Ovalna dilatacija end-to-end junkcije (e)
60 minuta nakon šoka, 9 500 x

Citoplazma endotelnih ćelija veoma je bogata krupnim vakuolama. One su u većini slučajeva ovalnog i okruglog oblika. U srednjim dijelovima ispunjene su amorfnim rijetkim sadržajem, a preostali dio vakuola je prazan.

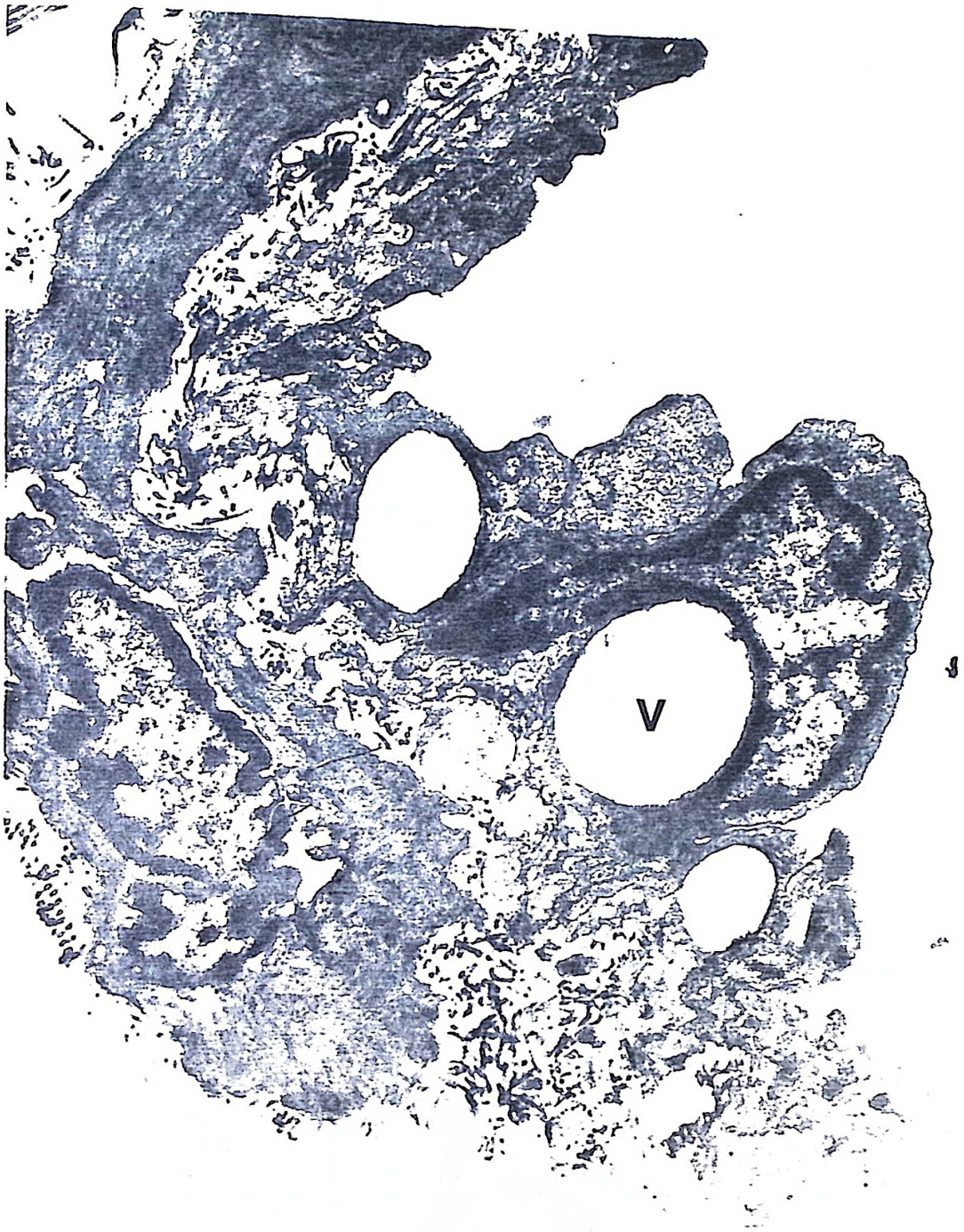


Slika 30. Krupne transportne vakuole endotela ductus throacicusa u protrahiranom histaminskom šoku (V), 9 500 x

Vakuole prominiraju prema lumenu ductus thoracicusa, a obložene su jednostruko konturiranom membranom. Smještene su uglavnom neposredno uz jedro, a nalaze se i u udaljenim dijelovima citoplazme.

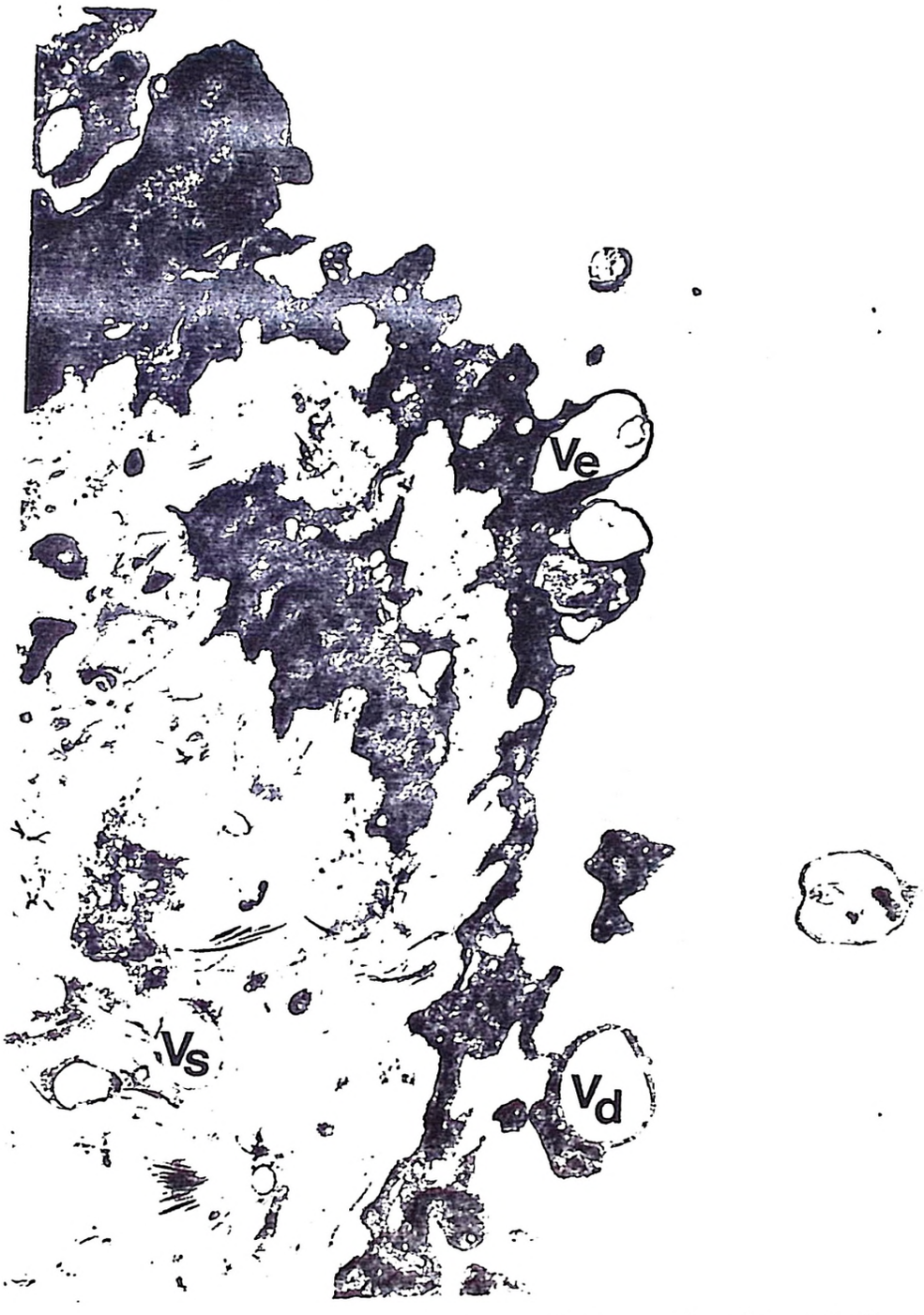
Takodje su vidljive i velike vakuole sa rijetkim sadržajem smještene izmedju jedra i subendotelijalnog sloja, tako da jedro obavija vakuolu

u tri četvrtine njenog obima. Na taj način jedro endotelne ćelije prominira u lumen ductus thoracicusa.



Slika 31. Specifičan položaj transportne vakuole izmedju jedra i subendotelijalnog sloja (V) 60 minuta nakon šoka 9 500 x

Osim krupnih vakuola u citoplazmi se vide i sitne vakuole, nepravilnog oblika i sa rijetkim sadržajem. Nepravilno su rasporedjene i nalaze se razbacane po cijeloj površini citoplazme endotelnih ćelija. Takodje se zapažaju lizozomalna granula.



Slika 32. Vakuole smještene u endotelu (Ve), vakuole smještene u subendotelu (Vs), vakuole u lumenu ductus thoracicusa (Vd) 60 minuta nakon šoka, 9 500 x

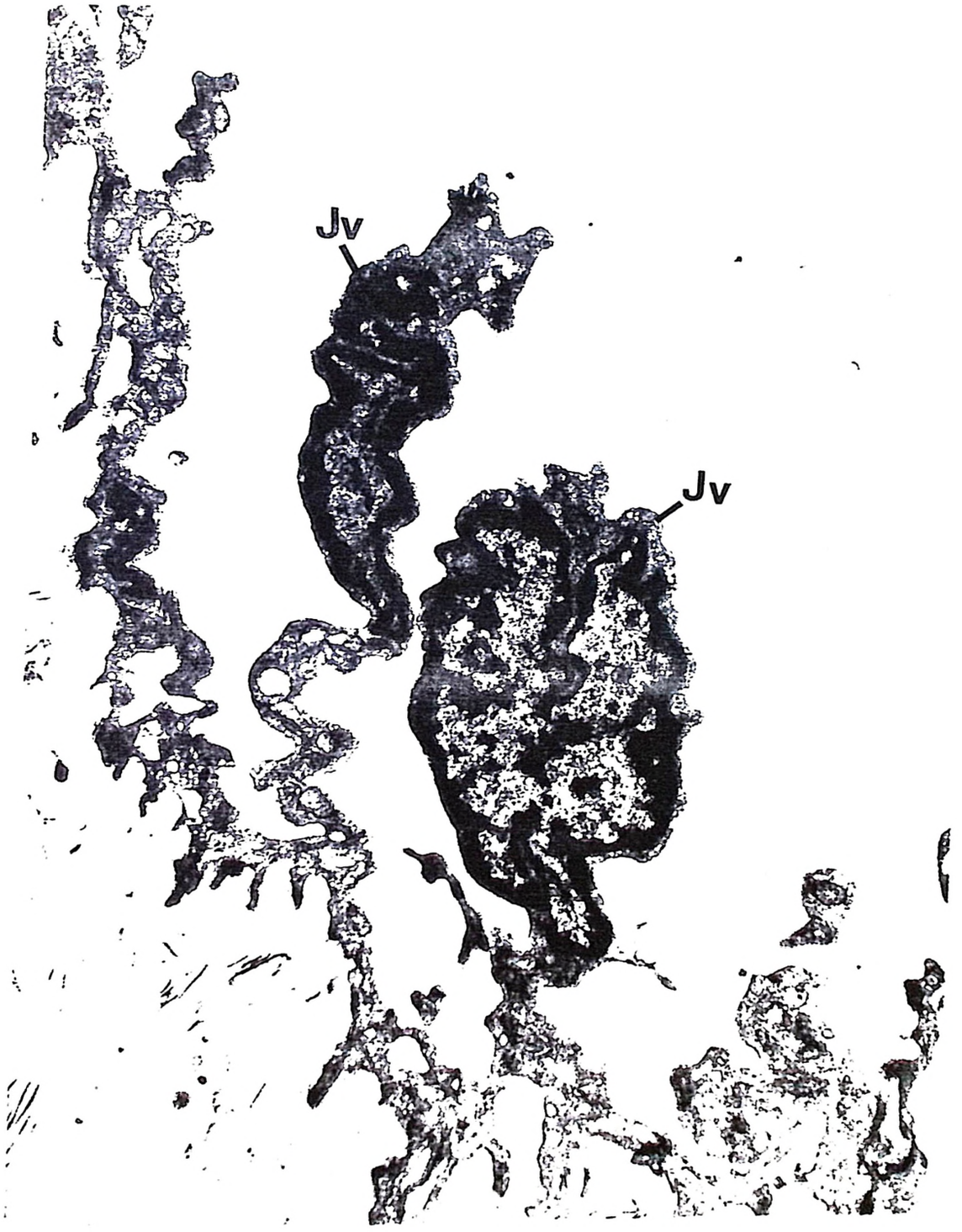
Endotelni sloj ductus thoracicusa izrazito je kontrahiran. Citoplazmatski dio endotelne ćelije veoma je uzak i naboran, tako da se pojedinim mjestima odljubljuje od subendotelnog sloja.



Slika 33. Kontrahirani uski sloj citoplazme (C), vakuola smještena između jedra i subendotelnog sloja (V), 60 minuta nakon šoka, 9 500 x

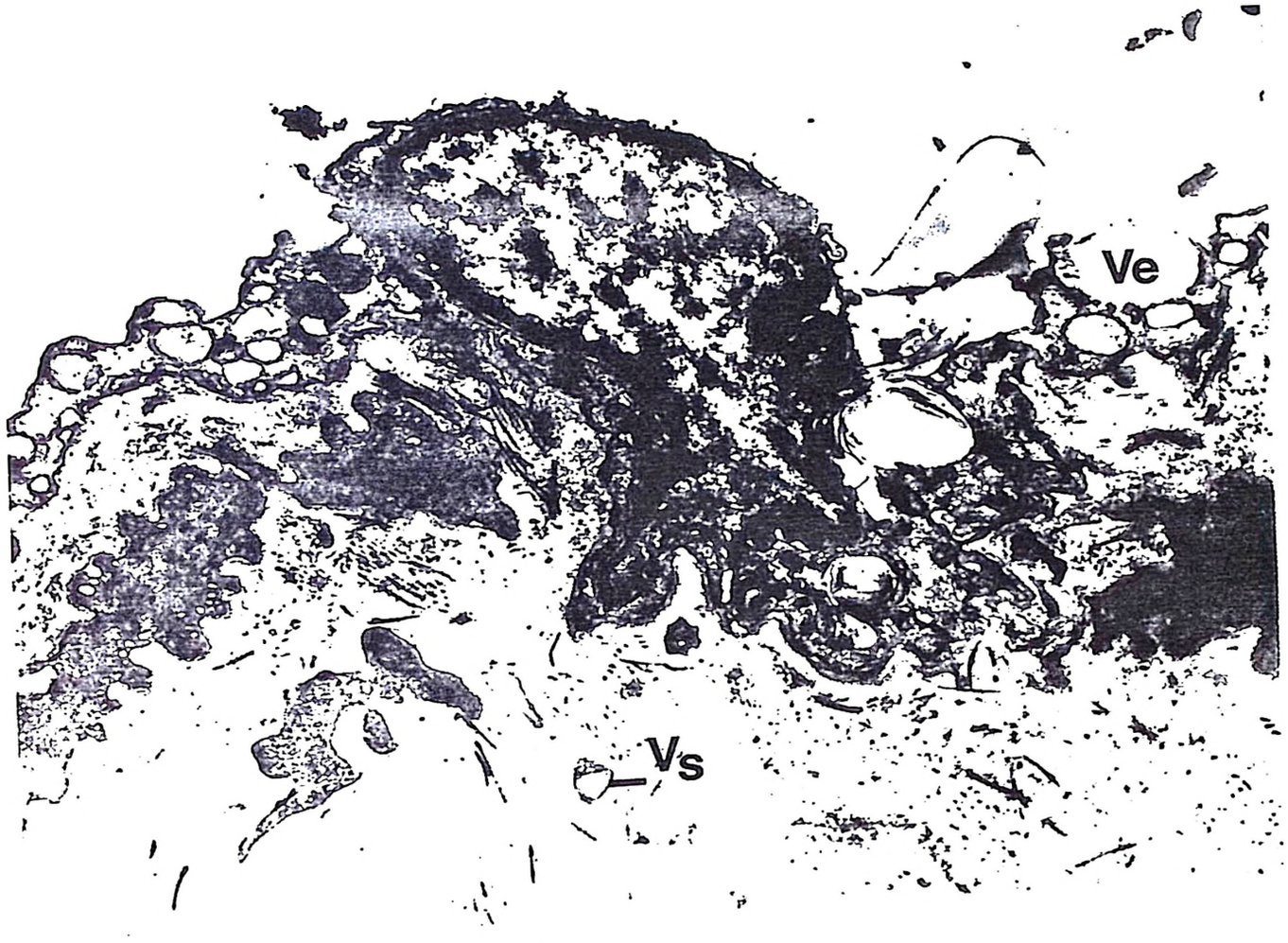
Na mjestima odljubljenja nalazi se samo rijetki sadržaj, nepravilno raspo-

redjen. Citoplazmatski nabori, osim što prominiraju prema lumenu ductus thoracicusa, ulaze duboko u subendotelni sloj. Pojedini fragmenti citoplazme su otrgnuti slobodni u lumenu ductus thoracicusa. Jedra endotelnih ćelija izrazito su piknotična. Uočavaju se bizarni oblici, kao i slobodni fragmenti jedra unutar jedne endotelne ćelije.



Slika 34. Jednoćelijska valvula ductus thoracicusa u histaminskom šoku (Jv) 60 minuta nakon šoka, 19 600 x

Zbog kontrakcije endotela jedro strši u lumen ductus thoracicusa, a za subendotelni sloj vezano je samo uskim tračkom citoplazme. Duža osovina jedra okomita je na smjer pružanja endotela. Jedarna membrana također je nepravilnog oblika sa brojnim izbočenjima i usjecima. Heterohromatin je nepravilno rasporedjen po čitavom jedru.



Slika 35. Vakuola u citoplazmi endotelne ćelije (Ve), vakuola u subendotelnom sloju (Vs).
60 minuta nakon šoka, 19 600 x

U subendotelnom sloju prisutne su mišićne ćelije sa naboranom

ćelijskom membranom. Oko njih nalaze se kolagena i elastična vlakna presječena u različitim pravcima. Nepravilno su rasporedjena tako da se ne uočavaju snopovi vlakana. Čitav subendotelni sloj veoma je rastresit i pokazuje nepravilnost u rasporedu kolagenih i elastičnih vlakana.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

4.1. DISKUSIJA

Kao što se moglo vidjeti u uvodnom dijelu, patofiziologija i morfološki ekvivalenti šoka vrlo intenzivno su izučavani u različitim vremenskim periodima, ovisno o novim naučnim saznanjima i usavršavanju metoda istraživačkog rada. Brojne činjenice poznate su već decenijama, a u novije vrijeme težište se prebacuje na objašnjenje šoka na nivou ćelije, gdje elektronska mikroskopija zauzima značajno mjesto.

Morfološka dijagnostika šoka u humanom materijalu nije jednostavna i većim dijelom je nespecifična. Morfologija eksperimentalnog šoka nešto bolje je proučena, jer postoji mogućnost doziranja intenziteta šoka, te isključivanje terapeutskih utjecaja koji u finalnoj fazi sigurno modificiraju morfološke promjene, a dijelom ih mogu uzrokovati. Tragajući za podacima o morfološkim promjenama u ductus thoracicusu u stanju šoka naišli smo na malobrojne podatke (Casley-Smith 1967, Gnepp 1980). U eksperimentalnim istraživanjima šoka, iako je patofiziologija limfe detaljno proučena, morfologija i ultrastruktura samog zida ductus thoracicusa praktično je neispitana. Upravo ta činjenica bila je odlučujuća da u uslovima eksperimentalnog histaminskog šoka, koji je pogodan za proučavanje limfnog sistema zbog intenzivnog prelaska tečnosti iz krvnog u limfni sistem, pokušamo indirektno riješiti zbivanja u limfotoku kroz proučavanje morfoloških promjena endotela ductus thoracicusa.

U našim istraživanjima utvrdili smo da je lumen ductus thoracicusa životinja uginulih u akutnom histaminskom šoku proširen u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. To je posljedica enormnog porasta količine intersticijske tečnosti i njenog prelaska u limfotok.

Povećana količina intersticijske tekućine u histaminskom šoku posljedica je promjena na krvnim sudovima. U većini proučavanja promjene permeabilnosti krvnih sudova izazivane su samo u jednoj vrsti tkiva, kao što su; koža (Gerdin 1981), skeletni mišići (Miller 1982), mezenterij (Fox 1980) ili crijevo (Guth 1983). Premda postoji dosta literature o efektima histamina i drugih vazoaktivnih sredstava na vaskularnu permeabilnost, zbog razlike u dozama, načinu administriranja, eksperimentalnim uslovima i pokazateljima vaskularne permeabilnosti, postoji neuskladjenost podataka koji bi dozvolili direktnu usporedbu osjetljivosti razl čitih tkiva i obim promjena njihove vaskularne permeabilnosti kao odgovor na vazoaktivna sredstva. Povećanje vaskularne permeabilnosti za albumin prvenstveno nastaje povećanjem brzine difuzije. Ovaj proces zahtijeva povećanje broja i veličine vaskularnih pora dovoljno velikih da propuste albumin, a taj fenomen je u skladu sa opisanim formiranjem pu kotina izmedju endotelnih ćelija vena u eksperimetnalnim uslovima (Palade 1961).

Način na koji histamin povećava količinu limfe jasan je iz eksperimenata koji su radili Mason (1979), Altura (1985), Kilzer (1985) i Antohe (1986). Normalni efekat histamina na mikrocirkulaciju uglavnom se manifestuje usljed povećanja površine krvnih sudova, povećanja vaskula rne permeabilnosti i povećanja hidrostatskog pritiska plazme. Istraživanja Furchgotta (1980) i zaključak da acetilholin može relaksirati aortu z ca u prisustvu, ali ne i u odsustvu intaktnog endotela, snažno je stimu lisao interes o mogućoj modularnoj ulozi endotela na vaskularnu reaktivnost. U daljnjim instraživanjima (Stewart 1988), je pokazao da endotel oslobadja humoralni faktor nazvan endotel-derived relaxing factor (EDR

za koji je ustanovljeno da odgovara azotnom oksidu. Identifikacija uloge EDRF u mikrocirkualciji (Morishita 1986) išla je sporo zbog tehničkih poteškoća u potpunom odstranjivanju endotela. Smatra se da je EDRF humoralni medijator koji omogućuje farmakološki aktivnim supstancama (vazodilatatorima) da djeluju na glatki mišić krvnog, ali i limfnog suda. Morfološke promjene koje pretrpi endotel krvnih i limfnih sudova u histaminskom šoku svakako će modificirati odgovor glatkih mišićnih ćelija na histamin. Propadanjem endotela propada i EDRF, a tada je odgovor glatkih mišićnih ćelija krvnih i limfnih sudova na histamin upravo suprotan, nastaje vazokonstrikcija (Stewart 1988).

Efekti histamina mogu se djelimično blokirati acetil-salicilnom kiselinom i indometacinom, što sugerira da povećanu vaskularnu permeabilnost induciranu hsitaminom ostvaruju metaboliti arahidonske kiseline (Kilzer 1984). Povećani permeabilitet endotela zbog djelovanja histamina uslovljava bubrenje endotelijalnih ćelija (Fox 1980, Gerdin 1981). Istraživanjem limfnih čvorova životinja uginulih u akutnom histaminskom šoku, te životinja žrtvovanih 3 minuta nakon preživljenog akutnog šoka, Pikula (1977) je našao da su aferentni i eferentni limfni sudovi prošireni, te da se u proširenim sinusima limfnih čvorova nakuplja limfa bez bitnijih promjena na celularnim strukturama. Ovo nakupljanje limfe posljedica je dinamičke insuficijencije limfotoka, kako je to opisao Földi (1972), usljed povećanog permeabiliteta pod djelovanjem histamina i nemogućnosti limfotoka da svojim rezervnim kapacitetom drenira nagli prelazak velike količine tečnosti u intersticijum. Ova dinamička insuficijencija uslovljava intenzivno bubrenje retotelnih ćelija sinusoida, te retikularnih ćelija u njihovoj okolini i okolini krvnih sudova čiji je endotel takodje intenzivno nabubrio. Ob-

zirom da je svako stanje šoka praćeno hipoksijom koja ima za posljedicu energetski disbalans sa oštećenjem funkcije "natrijeve pumpe" i retencijom vode u ćelijama, to je vjerovatno i jedan dio objašnjenja hidratacije retikuloendotelnih elemenata u limfnim čvorovima. Povećani dotok tečnosti ima za posljedicu njen "pasivni" prelazak u ćeliju koja nije u mogućnosti da je aktivno transportuje, jer su poremećeni energetski mehanizmi, ali i oštećen permeabilitet po istom principu kao i u endotelnim ćelijama krvnih sudova (Casley-Smith 1967, 1972). Ta intenzivna hidratacija manifestuje se razrijedjenjem citoplazme uz propadanje ćelijskih organela u njoj, malim brojem pinocitotičnih vakuola i vezikula koje su znak aktivnog transcelularnog transporta, te izrazitim povećanjem sadržaja vode u citoplazmi, koje je registrovano interferentno-mikroskopskim mjerenjima (Pikula 1977). Utvrdjeni porast apsolutne količine vode u citoplazmi ima svoje reperkusije i na povećanje površine i volumena citoplazme. U jedrima nisu nadjene promjene u smislu povećanja sadržaja suhe supstance ili vode, što ukazuje da se poremećaji u prometu tečnosti odigravaju u citoplazmi bez znatnijeg utjecaja na funkciju jedra.

Problem hipoksije u histaminskom šoku u posljednje vrijeme povezuje se sa funkcijom lizozoma i oštećenjem mitohondrija. Naime, ranije se smatralo (Courtice 1973) da je hipoksija direktni uzrok promjene u mitohondrijama, te da u stanjima šoka, upravo zbog hipoksije, dolazi do oštećenja u smislu propadanja krista, bubrenja i vakuolizacije mitohondrija. Prema novijim istraživanjima (Lindena 1986) smatra se da lizozomalni enzimi nakon rupture lizozoma, uzrokovane hipoksijom, prelaze u citoplazmu i oštećuju mitohondrije i druge organele. Lizozomi sadrže hidrolitičke enzime neophodne za digestiju stranih materija koje se unose u ćeliju, ili

za autodigestiju elemenata koji nastaju oštećenjem ćelije. Materijal koji se putem endocitoze unese u ćelije (fagocitozomi) ili dijelovi same ćelije (autofagozomi) se putem tzv. fuzije spajaju sa primarnim lizozomima i unutar membrane, koja zatvara enzime i materijal (sekundarni lizozomi) odvija se digestija.

Pojačan protok limfe u sabirnim limfnim sudovima i sve promjene koje se dešavaju u limfnim čvorovima u histaminskom šoku, imaju utjecaja na izmjenu morfoloških osobina endotela ductus thoracicusa. Ukoliko su životinje provele više vremena u histaminskom šoku, navedene promjene su izraženije.

U našem materijalu uočene su brojne krupne vakuole u endotelu ductus thoracicusa. Neke od njih otvaraju se u lumen ductus thoracicusa, neke su smještene neposredno uz jedro endotlnih ćelija, a ima ih i po čitavoj citoplazmi. Zapažene su velike pojedinačne vakuole (slika 31) locirane izmedju jedra i subendotelnog sloja. Okrugle ili ovalne vakuole sa elektronooptički svijetlim sadržajem prisutne su i u subendotelnom sloju zida ductus thoracicusa (slika 35). Prisustvo transportnih vezikula u svim slojevima zida ductus thoracicusa ukazuje da se u histaminskom šoku odvija transport i u glavnom limfovodu, što do sada nije bilo poznato iz literature. Pitanje je sada u kojem smjeru se transport odvija? Daljnja diskusija pokušat će dati odgovor na to pitanje.

Sistem endocitotičnih vezikula karakteristična je morfološka komponenta endotelnih ćelija ductus thoracicusa. Uprkos rasprostranjenosti, puno je nepoznatog o strukturi tog sistema i o njegovoj ulozi u molekularnom transportu iz ili u limfni sud. Zbog nedostatka preciznih informacija, shvatanje transportne uloge limfatičkog sistema u raznim organima

nije zadovoljavajuće. Jasno je da je limfni sistem integralno vezan za funkciju organa i da ne djeluje samo kao odvodni sistem iz intersticijskog prostora. Limfatički sistem djeluje specifično u smislu prihvata produkata parenhimnih ćelija, i na njega u mnogome djeluju patološke promjene koje pogadjaju same organe.

O'Morchoe (1985) je eksperimentalnim putem pokazao da su u slučaju krvnih sudova vezikule endotelnih ćelija od primarne važnosti za masovni prelazak plazma proteina iz lumena u intersticij. Prateći taj put, vezikularni sistem je sastavljen od malih vezikula nastalih od kaveola koje se formiraju na strani lumena, sve do intersticijalne površine ćelije, gdje se oslobadja njihov sadržaj. Neslaganje sa ovim tvrdnjama (Casley-Smith 1982, 1985) bazirano je na nekoliko faktora, od kojih je jedan da vezikule ne mogu psotojati kao diskretni citoplazmatski entiteti, već da formiraju, u zamjenu, sistem medjusobno spojenih vezikula koje imaju izgled kanala. Sva ova istraživanja vezikularnog sistema vršena su u fiziološkim uslovima. U histaminskom šoku krvni sudovi povećavaju svoju površinu (vazodilatacija), povećava se hidrostatski pritisak plazme i pojavljuju se pukotine izmedju endotelnih ćelija. Ovim su ispunjeni uslovi za enormni porast količine intersticijske tečnosti, a samim tim i limfe.

Transportna uloga vezikularnog sistema limfatičkog endotela veoma je slična, ali funkcionalno direktno suprotna, tj. transport se odvija od intersticija prema lumenu. Analiza transporta kroz limfatički endotel in vivo tehnički je teško izvodljiva. Nepristupačnost većine limfnih sudova za proučavanje transporta navela je istraživače da eksperimente izvode na perfudiranom limfnom sudu (Jones 1983, O'Morchoe 1984). Hromna peroksidaza (HRP) korištena je kao trejser za dokazivanje transendotelnog

vezikularnog sistema. Preparacija limfnog suda dozvoljava mjerenje udjela limfe koja protječe kroz njega na transendotelni transport trejsera. Takodje omogućuje da izolirani limfni sud bude brzo fiksiran na kraju eksperimenta. Brzina kojom se postiže fiksacija tkiva metodu čini prikladnom za ultrastukturnu trejser studiju koja ilustrira transportni put kroz endotel limfnog suda. U prilog ove konstatacije služe radovi Yanga (1981), Johnsona (1981), Jonesa (1983), McGuira (1983, 1984), Wagnera (1983) i Malcolma (1987) koji su za fiksaciju limfnih sudova koristili glutaraldehid, kao klasično fiksativno sredstvo, ali i brzo smrzavanje. Brza fiksacija tkiva trenutnim smrzavanjem daje signifikantne razlike u tumačenju rezultata. Zato se pri interpretaciji rezultata uvijek treba naglasiti na koji način je vršena fiksacija tkiva za elektronsku mikroskopiju.

Eksperimentom (O'Morchoe 1985), u kojem je korištena HRP kao trejser, prikazani su kvantitativni podaci distribucije endocitotičnih vezikula u čitavoj debljini zida limfnog suda. Evidentno je da HRP brzo prolazi kroz endotelni zid od ekstraluminalne do luminalne površine vezikularnim sistemom. Autor je iznio rezultate koji se odnose na raspored i brzinu kojom HRP prolazi vezikularnim sistemom. Uočeno je da je 90% vezikula na luminalnoj strani limfnog suda bilo obilježeno HRP-om unutar 5 sekundi od apliciranja HRP. Nakon 15 sekundi 100% vezikula obilježeno je HRPom, i odnosi se na ukupnu debljinu limfnog suda. Autor navodi da se transportne vezikule vide samo na nivou limfnih kapilara i sabirnih limfnih sudova, dok za ductus thoracicus te podatke ne navodi. HRP unijet u organizam eksperimentalne životinje (štakor, kunić) putem sistemske cirkulacije nalazi se u transportnim vezikulama endotela limfnih

sudova manjeg kalibra, što indirektno pokazuje način transporta vezikularnim sistemom.

O'Morchoe je (1987) izvršio dodatna ispitivanja transporta proteina kroz zid limfnog suda pomoću hromne peroksidaze uvodeći je u sistemsku cirkulaciju, da bi utvrdio kolika je uloga intercelualrnih spojeva u makromolekularnom transportu. Poznato je da kroz samu endotelnu ćeliju prolazi voda, male polarne supstance i liposolubilne supstance putem mikropinocitotičnih vezikula. Vezikule su dovoljno velike da transportuju partikule radijusa do 250 Å (Dobbins 1970, Grega 1979). HRP je bio uočen izmedju graničnih endotelnih ćelija na mjestu njihovih junkcija. I u ovom eksperimentu autor ne navodi pozitivan rezultat u ductus thoracicusu, iz čega se može zaključiti da transporta u fiziološkim uslovima nema kroz zid glavnog limfovoda niti putem vezikularnog sistema, niti kroz interćelijske junkcije. Medjutim, u histaminskom šoku prisutni su morfološki detalji koji ukazuju da se vrši transport kroz zid ductus thoracicusa, i to vezikularnim sistemom i kroz same junkcije.

Obzirom da je u histaminskom šoku enormno povećana količina limfe u ductus thoracicusu, to je i hidrostatski pritisak limfne tečnosti u znatnom porastu. Zbog promjena na krvnim sudovima, izazvanih histaminom, povećan je sadržaj proteina u limfi. Ovi podaci dovoljan su razlog za uspostavljanje transporta kroz zid ductus thoracicusa od luminalne prema ekstraluminalnoj strani endotela. Na temelju rezultata O'Morchoe (1985) o brzini transporta kroz endotel limfnog suda, i u akutnom histaminskom šoku ima dovoljno vremena da se odigra cjelokupan transport putem endocitotičnih vezikula.

Konvencionalna elektronska mikroskopija tankih rezova kroz zidove

kapilara (Wagner 1981) i limfnih sudova (Grega 1979, Azzali 1981, Jones 1983, O'Morchoe 1987) bila je neadekvatna da razjasni odnose izmedju endotelnih vezikula i njihove morfološke i funkcionalne veze sa površinom endotelnih ćelija. Visoko-voltažna elektronska mikroskopija debelih rezova (Wagner 1984) kroz limfne sudove upotrijebljena je da se uoči trodimenzionalna struktura vezikularnog sistema. Stereo parovi debelih rezova omogućavaju direktna trodimenzionalna proučavanja uzoraka čija je dubina obuhvatala nekoliko vezikula. Zapažene su brojne pojedinačne i složene vezikularne forme, ali nisu sve medjusobno povezane. Ovakav raspored vezikula dopunjava koncept dinamičke interakcije izmedju slobodnih i priljubljenih vezikularnih struktura gdje se naizmjenično odvija fuzija i fisija vezikula. Ovakve interakcije omogućuju nekontinuirani transportni put kroz limfatički zid.

Simionescu (1982) je iznio pretpostavku da kanali fuzionisanih vezikula prave pore koje su prohodne za vodu. Fuzionisane grupe vezikula otvaraju se na luminalnu stranu endotelnih ćelija limfnog suda.

Wagner (1984) je visoko-volotažnom mikroskopijom uspio prikazati raznolikost pojedinačnih i složenih vezikularnih struktura. Najveći broj vezikula koje su priljubljene uz luminalnu ili abluminalnu stranu endotelnih ćelija su pojedinačne vakuole. One se razlikuju po formi, i ima ih četvrtastih, sfernih i okruglastih sa produženim vratovima. Prisutne su nakupine fuzionisanih vezikula koje komuniciraju sa površinom endotelne ćelije. Vezikule smještene najdublje uglavnom su sfernog oblika. Medjutim, ponekad su prisutne vezikularne formacije u obliku grozdastih nakupina ili forme u kojoj sferni elementi komuniciraju putem izduženih istmusa. U nekim slučajevima pojedinačne vezikule izgledaju kao priljubljene uz dis-

talni kraj kaveolusa, ili kao da su se tek odvojile od njega. Ove forme sugeriraju bilo na fisiju ili fuziju u razvoju, za vrijeme fiksacije. Wagner nije uočio transendotelne kanale nastale od fuzionisanih vezikula u endotelnim ćelijama limfnih sudova pomoću visoko-voltažne elektronske mikroskopije. Trodimenzionalna struktura vezikula dopunjuje sliku dinamičke interakcije izmedju pojedinačnih i složenih vezikularnih struktura gdje se fisija i fuzija naizmjenično dešavaju. Takve interakcije omogućile bi diskontinuirani put kroz endotelnu ćeliju, ali uz viši stepen strukturalne i vremenske složenosti nego što je jednsotavni rezerzibilni mehanizam.

Izrazita morfološka karakteristika zida ductus thoracicusa u histaminskom šoku je prisutnost velikog broja vezikula. One ukazuju na pojačan transport kroz zid glavnog limfovoda. To je potpuno novi momenat koji se javlja u histaminskom šoku, jer u fiziološkim uslovima nisu zapaženi nikakvi morfološki detalji u strukturi zida ductus thoracicusa koji bi ukazivali na bilo kakav oblik transporta.

Niiro (1985) je vršio kvantitativna istraživanja rasporeda vezikula u endotelnim ćelijama sabirnih limfnih sudova. Našao je da vezikule zauzimaju 3,5% volumena endotelijalne citoplazme po slijedećem rasporedu: 40% otvorenih na ili dodirujući luminalnu membranu, 34% izvan vidljive veze na istoj površini, 23% otvorenih na ili dodirujući albuminalnu membranu i 3% malih vezikula pridruženih membranama koje formiraju intercelularne kontakte.

Pošto je poznat smjer transporta u sabirnim limfnim sudovima, od ekstraluminalne prema luminalnoj strani endotela, kvantitativna istraživanja Niira o količini i rasporedu vezikula su morfološka potvrda fizioloških

zbivanja. Tri četvrtine vezikula u zidu limfnog suda prisutne su na luminalnoj, to jest strani gdje se oslobadja sadržaj vezikula.

U zidu ductus thoracicusa u histaminskom šoku vezikule su okruglog i ovalnog oblika, većinom pojedinačne. Takodje se zapažaju fuzionisane vezikule sa lučno konturiranom membranom koje se otvaraju na ekstraluminalnoj strani zida ductus thoracicusa (slika 20). Vezikule zastupljene u čitavoj debljini zida ductus thoracicusa nedvosmisleno ukazuju na značajan transport materija u hsitaminskom šoku. Da bismo objasnili smjer transporta materija pozvat ćemo se na rezultate eksperimenata Yanga (1981), O'Morchoea (1980, 1984) i Niiroa (1985) koji su dokazali da se kod kapsularnih organa (bubreg, jetra) limfa stvara uglavnom vezikularnim transportom. U ostalim dijelovima tijela intersticijalna tečnost prelazi u limfne sudove znatnijim dijelom kroz interćelijske dilatacije u pukotine, a malim dijelom je zastupljen vezikularni transport. Na osnovu ovih, a i ranijih istraživanja (Satir 1979, Albertine 1980, Leak 1984) poznato je da je vezikularni sistem formiranja limfe zastupljen u organima i tkivima čija je intersticijska tečnost bogata proteinima.

Prisutnost vakuola u zidu ductus thoracicusa u histaminskom šoku pokazatelj je proteinima bogate intersticijske tečnsoti, a samim tim i limfe. Povećan protok limfe u ductus thoracicusu povećava i hidrostatski pritisak u njemu. Na taj način stvoreni uslovi u lumenu ductus thoracicusa u histaminskom šoku odgovaraju u potpunosti uslovima u intersticijskim prostorima. U intersticijskom prostoru transport se odvija vezikularnim sistemom prema lumenu limfnih kapilara, tj. u smjeru manjeg hidrostatskog i onkotskog pritiska.

Novonastali uslovi u lumenu ductus thoracicusa izazvani histaminskim šo-

kom, povećana količina limfe bogate proteinima, preduslov su za uspostavljanje transporta kroz zid limfovoda od luminalne prema ekstraluminalnoj strani. Raspored, veličina i prisustvo vezikula u čitavoj debljini zida ductus thoracicusa morfološka su podloga za odvijanje tog transporta.

Uporedjujući rezultate Wagnera (1984) o rasporedu vezikula u zidu limfnog suda i njihovim medjusobnim odnosima sa našim rezultatima, može se zaključiti da se transport u zidu ductus thoracicusa odvija vezikularnim, a kao što ćemo poslije vidjeti, manjim dijelom i interćelijskim putem.

U našim rezultatima nismo uočili morfološke karakteristike vezikula koje iznosi u svojim rezultatima Casley-Smithova (1982, 1987). Autorica je svoja istraživanja vršila na sabirnim limfnim sudovima u fiziološkim sulovima. Njeni rezultati su u suprotnosti sa rezutlatima Wagnera (1984), a odnose se na način vezikularnog transporta. Njeni rezultati govore da u endotelnoj ćeliji postoje kanali, nastali spajanjem transportnih vezikula, koji spajaju albuminalnu i luminalnu stranu endotelne ćelije. Na taj način omogućen je kontinuirani prolazak materija iz intersticijuma u lumen limfnog suda.

Mi smo mišljenja da je prihvatljivije objašnjenje Wagnera o načinu vezikularnog transporta kroz zid limfnog suda. Raspored i medjusobni odnosi vezikula u našim rezultatima idu u prilog takvog stava, s tim što je smjer transporta kod nas izmijenjen, što je uzrokovano histaminskim šokom.

Čvrste junkcije predstavljaju specijalizirane regije lateralnih membrana plazme graničnih endotelnih ćelija ductus thoracicusa. Ove struk-

ture jasno se prepoznaju u tankim sekcijama kao oblasti gdje su se listovi vanjske membrane graničnih endotelnih ćelija spojili da bi formirali tačke pripoja ćelije sa ćelijom, i tako stvorili barijeru za intercelularnu permeabilnost (McGuire 1984).

Elektronsko-mikroskopska istraživanja sabirnih limfnih sudova (Dobbins 1970) pokazala su da u endotelnim ćelijama postoje brojne adhezione i zonule okludens, tako da se praktično ne vide otvorene ćelijske junkcije, naravno, u fiziološkim uslovima. Dakle, postoji morfološka podloga za selektivnu permeabilnost junkcija endotelnih ćelija. O'Morchoe (1984) iznosi rezultate da su zonule okludens i zonule adherens mjesta pojačanog medjućelijskog kontakta.

Sva tri tipa endotelnih junkcija, end-to-end, overlapping i interdigitating imaju promijenjene morfološke karakteristike u histaminskom šoku, s tim da nisu sve podjednako osjetljive na dužinu trajanja šoka.

Interdigitating junkcije endotelnih ćelija ductus thoracicusa najosjetljivije su na histaminski šok, i prvo se na njima uočavaju morfološki detalji koji nisu zapaženi u fiziološkim uslovima. U ductus thoracicusu životinja žrtvovanih pola sata nakon početka histaminskog šoka, lateralna strana endotelnih ćelija pokazuje znatne varijacije u odnosu na normalnu strukturu. Interdigitacijski nastavci citoplazme endotelnih ćelija nisu više u skladnom neposrednom kontaktu. Prisutne su brojne sitne dilatacije koje predstavljaju mjesta pojačanog interćelijskog transporta (O'Morch 1984). Interdigitacije su kontrahirane i izuvijane, tako da čitava junkcija daje utisak jednog rastresitog i nedovoljno čvrstog kontakta. Na osnovu morfoloških karakteristika samih dilatacija nije moguće zaključiti u kojem smjeru se odvija transport kroz junkciju.

U istoj eksperimentalnoj grupi nisu zapažene morfološke promjene u vezama endotelnih ćelija tipa end-to-end i overlapping. Ta dva tipa interćelijskih veza posjeduju specijalizirane aree izmedju graničnih membrana endotelnih ćelija koje su elektronski gušće od susjednog dijela citoplazme. Ove aree vrlo su slične dezmosomima izmedju epitelnih ćelija.

Medjutim,jedan sat nakon početka histaminskog šoka dolazi do promjene morfoloških osobina i na ovim junkcijama. Zapažaju se velike dilatacije, ovalnog i okruglog oblika, u središnjem dijelu postojeće junkcije. Pinto da Silva (1982), O'Morchoe (1984) i Reilly (1986) opisali su dilatacije u junkcijama endotelnih ćelija limfnih kapilara jetre i bubrega, tj. u organima čija je intersticijska tečnost bogata proteinima. Smjer transporta kroz dilatacije junkcije potpuno je u skladu sa smjerom vezikularnog transporta u dodirujućim endotelnim ćelijama. Kako je smjer transporta vezikularnog sistema u zidu ductus thoracicusa suprotan smjeru u sabirnim limfnim sudovima, to će i transport materija putem dilatacija u junkcijama biti u skladu sa smjerom transporta materija u ductus thoracicusu, tj. od luminalne prema ekstraluminalnoj strani endotela. Dilatacije u junkcijama endotelnih ćelija jasno pokazuju da je transport kroz zid ductus thoracicusa u hsitaminskom šoku veoma intenzivan, i da se odvija, osim vezikularnim transportom, i putem interćelijskih veza.

Valvule ductus thoracicusa kontrolne grupe životinja po svojim ultrastukturnim osobinama potpuno su u skladu sa dosad iznijetim podacima u literaturi (Vajda 1971, Takada 1981, Albertine 1982). Istraživanja valvula dictus thoracicusa glodavaca, mačaka i pasa bazriana su na svjetlosnoj i elektronskoj mikroskopiji. Elektronska mikroskopija, koja je re-

levantnija za uporedjivanje sa našim rezultatima, daje podatke o ultrastrukturnim karakteristikama valvula u fiziološkim uslovima.

Valvule su primarno bikuspidalne sa dva semilunarna kuspisa od kojih je svaki pričvršćen za zid limfnog suda. Pripoj kuspisa za zid limfnog suda lučno je savijen sa konkavitetom u centripetalnom smjeru. Slobodni rub kuspisa može biti nazubljen ili polumjesečast, što zavisi od trenutne količine limfe koja prolazi kroz ductus thoracicus u vrijeme fiksacije. Kada je limfni sud pun, nazubljenost slobodnog ruga kuspisa nestaje (Gnepp 1980). Kuspisi su svojom bazom prčvršćeni za zid limfnog suda i tu se nalaze nakupine kolagenih i elastičnih vlakana (Lauweryns 1973, 1976). Vlakna su složena u snopove, a snopovi su poredani u različitim smjerovima i čine snažno uporište za kuspis. Nakupine tih vlakana projiciraju se u lumen limfnog suda, i sa proksimalne i sa distalne strane kuspisa. Kuspisi su konusnog ili vrećastog oblika, što zavisi od prisutne količine limfe u sudu. Ova strukturalna razlika funkcija je dijametra limfovoda (Reddy 1986).

Da bi valvule bile efikasne moraju biti čvrsto vezane za limfatički zid. Courtice (1970) smatra da prstenasto pripojište valvula u obliku lijevka ili vrećica ne može biti dovoljno da prevenira inverziju, pod uslovom povećanog intraluminalnog pritiska. Prema istraživanjima Lauwerynsa (1973) i Gneppa (1980) prisustvo aktinu sličnih filamenata koji su utkani u strukturu valvule i zida limfnog suda dovoljan su razlog za sprečavanje inverzije valvula pri pojačanom protoku limfe, kao što je slučaj u našim istraživanjima.

Sa funkcionalnog stanovništva postavlja se pitanje da li valvule sprečavaju antegradni protok limfe. Reddy (1986) je u sovjim istraživa-

njima koristio biomehanički model limfnog suda koji najviše odgovara fiziološkim uslovima limfotoka. Autor je razradio i eksperimetnalno potkrijepio teoriju o intrinsic i extrinsic snagama koje utječu na protok limfe. To su: hidrostatski pritisak limfe, sadržaj proteina u njoj, sadržaj farmakološki aktivnih supstanci u limfi, količina periadventicijalnog tkiva ductus thoracicusa, kao i neposredna blizina velikih krvnih sudova. Svi ovi faktori neposredno ili posredno utječu na morfološke karakteristike valvula ductus thoracicusa. Na osnovu dosadašnjih znanja (Albertine 1982, Brace 1982, De Freitas 1984) i vlastitih eksperimenata, autor zaključuje da valvule utječu negativno na antegradni protok limfe u fiziološkim uslovima.

Povećana količina limfe, kao i povećan sadržaj histamina u njoj, ostavljaju značajne ultrastrukturne morfološke promjene na valvulama ductus thoracicusa. Sve valvule okrenute su u sitom smjeru i zatvaraju oštri ugao sa zidom ductus thoracicusa. Poprečni presjek kroz ductus thoracicus u nivou valvule daje mogućnost sagledavanja odnosa pripoja valvule, odnosno njene baze, sa zidom ductus thoracicusa. Kontrakcija endotelnog i subendotelnog sloja glavnog limfovoda naročito je izražena na bazi kuspisa. Na tom mjestu nabori endotela ulaze duboko izmedju kolagenih i elastičnih niti i na taj način stvaraju jednu stisnutu lepezu koja daje mogućnost značajnih ekskurzija valvule prema lumenu ductus thoracicusa. Ova morfološka karakteristika pretpostavka je izmijenjenih funkcionalnih sposobnosti valvula u histaminskom šoku. Valvule su u mogućnosti da mijenjaju svoj oblik i položaj prema lumenu ductus thoracicusa zavisno od količine limfe koja protječe u datom momentu. Količina, kao i brzina limfe u ductus thoracicusu u histaminskom šoku nisu konstantne.

Valvule su u tim uslovima podvrgnute stalnim promjenama položaja, tako da njihove morfološke osobine zavise od momenta u kojem je tkivo fiksirano.

Ultrastukturne osobine endotela koji prekriva valvule u mnogome se razlikuju od ultrastrukturnih osobina parijetalnog endotela ductus thoracicusa. Nije uočena vakuolizacija endotela na valvulama u histaminskom šoku, što pokazuje da nema transporta kroz endotel koji pokriva valvule. To je razumljivo ako se uzme u obzir da je valvula potpuno uronjena u limfu i da je sa svih strana isti hidrostatski pritisak, kao i ista koncentraicja proteina. Dakle, nema osnovnih uslova, tj. pokretača vezikularnog transporta kroz endotel. Takodje nisu prisutne dilatacije u junkcijama endotelnih ćelija.

Najkarakterističnija morfološka odlika valvula u histaminskom šoku je pojava sekundarnih jednoćelijskih valvula. One nastaju snažnom kontrakcijom endotelnog i subendotelnog sloja na valvuli. Na taj način kontrahirana jedra endotelnih ćelija sa uskim obrubom citoplazme prominiraju u lumen ductus thoracicusa. Osnovna valvula tako postaje izrazito naborana i nepravilno konturirana, što svakako utječe na protok limfe u histaminskom šoku. Pripojišta valvula za zid ductus thoracicusa su mjesta gdje takodje nema transporta u endotelu, tako da su to funkcionalno najočuvaniji dijelovi zida limfovoda u histaminskom šoku.

4.2. Z A K L J U Č C I

Promijenjeni uslovi u ductus thoracicusu izazvani histaminskim šokom djeluju na mijenjanje morfoloških ultrastrukturnih osobina endotela ductus thoracicusa.

Transport materija vezikularnim sistemom endotela ductus thoracicusa, koji nije u literaturi opisan, odvija se u histaminskom šoku od luminalne prema ekstraluminalnoj strani. Smjer kretanja materije kroz endotel glavnog limfovoda suprotan je smjeru kretanja materije kroz endotel limfnih kapilara i limfnih sudova manjeg kalibra, a posljedica je povećanog pritiska i koncentracije proteina.

Uočene dilatacije u junkcijama endotelnih ćelija tipa end-to-end, overlapping i interdigitating, morfološka su podloga za pojačani transport kroz endotel ductus thoracicusa putem interćelijskih spojeva.

U endotelu koji oblaže valvule ductus thoracicusa nisu zapažene transportne vezikule niti dilatacije u junkcijama endotelnih ćelija, što sugerira da se transport materija u histaminskom šoku odvija samo u parijetalnom endotelu ductus throacicusa.

Prisustvo sekundarnih jednoćelijskih valvula na valvulama ductus thoracicusa specifičan su morfološki nalaz za stanje histaminskog šoka.

Mišljenja smo da ovo eksperimentalno morfološko istraživanje promjena u endotelu ductus thoracicusa u histaminskom šoku predstavlja doprinos u razrješavanju patofizioloških zbivanja u limfotoku, a posebno u endotelu centralnog limfnog suda.

LITERATURA

1. Abelda SM. Permeability characteristics of cultured endothelial cell monolayers. Journal of appl physiol 1988; 64/1:308.

2. Albertine KH, O'Morchoe CCC. Renal lymphatic ultrastucture and translymphatic transport. Microvasc Res 1980; 19:338-351.

3. Albertine KH, Fox LM, O'Morchoe CCC. The morphology of canine lymphatic valves. Anat Rec 1982; 202/4:453-461.

4. Albertine KH, O'Morchoe CCC. The morphology of Canine Lymphatic Valves. The Anatomical Record 1982; 202:453-461.

5. Altura BM. Handbook of Shock and Trauma. Basic Science, Raven Press, New York, 1983.

6. Altura BM, Gebrewold A, Burton RW. Failure of microscopic metarterioles to elicit vasodilator responses to acetylcholine bradykinin, histamine and substance P after ischemic shock, endotoxemia and trauma: possible role of endothelial cells Microcirculation, Endothelium and Lymphatics 1985; 2:121-127.

7. Antohe F, Heltianu C, Simonescu N. Further Evidence for the Distribution and Nature of Histamine Receptors on Microvascular Endothelium. Microcirc Endothel and lymph 1986; 3/2; 163-167.

8. Azzali G, Ter RC, Casley-Smith JR. Endothelial vesicles. Microvasc Res 1981; 21:267-298.

9. Berman IR, Moseley RV, Lambarn PB, Sleeman MK. Thoracic duct lymph in shock: gas exchange; acid basc balance and lysosomal enzymes in haemorrhagic and endotoxin shock. Ann Surg 1969; 169-202.

10. Brace RA, Power GG. Thoracic duct lymph flow and protein flux olynamics. Am J Physiol 1982; 240:R282-R288.

11. Brighman KL, Owen PJ. Increased sheep lung vascular permeability caused by histamine. Circ Res 1975; 37:647-657.

12. Cameron JL, capuzzi DM, Zuidernia GD, Mayolis S. Acute pancreatitis with hyperlipidemia. Am J Med 1974; 56:482-489.

13. Campbell FR. Intercellular contacts of lymphocytes during migration across high-endothelial venules of lymph nodes. An electron microscopic study. Anat Rec 1983; 207/4:643-652.

14. Casley-Smith JR. An electron microscopic study of injured and abnormally permeable lymphatics. Ann N Y Acad Sci 1964; 116--203.

15. Casley-Smith JR. The fine structure, properties and permeabilities of lymphatic endothelium. Exp suppl 1967; 14-19.

16. Casley-Smith JR. The fine structures and permeabilities of lymphatich under some pathological conditions. Exp suppl 1967; 19--26.

17. Casley-Smith JR. The fine structure and fine functioning of initial lymphatics. Czechosl Med Press 1982:6-13.

18. Casley-Smith JR. Mechanisms in the formation of lymph. Int Rev-Physiol 1985; 26:147-187.

19. Casley-Smith JR. The Phylogeny of the Fine Structure of Blood Vessels and Lymphatics: Similarities and Differences. Lymphology 1987; 20/4:182-186.

20. Chand N, Altura BM. Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells. Science 1981; 213:1376-1379.

21. Chavez CM. The clinical significance of lymphatico-venous anastomo-

ses. Vasc Dis 1968; 5-35.

22. Chien S, Laufer L, Handley DA. Vesicle Distribution in the Arterial Endothelium Determined with Ruthenium Red as an Extracellular Marker. J Ultrastr Res 1982; 79:198-202.

23. Courtice FC, Adams EP, Shannon AD. Lysosomal enzymes in lymph and plasma in shock and limb ischemia. Presented at the 4th International Congress of Lymphology, 1973, Tucson.

24. Daroczy J. Struktur und Funktion der Klappen der dermalen Lymplikapillaren. Hantarzt 1983; 33:136-138.

25. Daroczy J. The structure and dynamic of the dermal lymphatic capillaries. Br J Dermatol Suppl 1983; 25:99-102.

26. Daroczy J. New ultrastuctural details of dermal lymphatic valves and its functional interpretation. Lymphology 1984; 17:54-60.

27. De Freitas V, martins SR, Dall Pai. On the Microscopic Anatomy of Periadventitial Tissue of Cisterna chyli and Ductus thoracicus of the Cat. Anat Anz 1984; 155:89-93.

28. Dobbins WO, Rollins EL. Intestinal mucosal lymphatic permeability an electron microscopic study of endothelial vesicles and cell junctions. J Ultrastruc Res 1970; 33:29-59.

29. Dodd GD. Lymphography in diseases of the liver and pancreas. Radiology 1970; 8:69.

30. El-Gendi MA, Zaky HA. Thoracic duct lymph flow; a theoretical concept. Surgery 1970; 68:786-91.

31. Földi M. Origin and composition of lymph. Exp Suppl 1967; 14:11.

32. Földi M. Physiologie und pathophysiologie des lymphgefässystems. In:Hdbh. Allg. Path. Bd.III, Teil 6, Springer, 1972.

33. Fox J, Galey F, Wayland H. Action of histamine on the mesenteric microvasculature. Microvasc Res 1980; 19:108-126.

34. Frank BW, Kern F. Intestinal and liver lymph and lymphatic. Gasttroenterology 1968; 55.408-426.

35. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980; 288:373-376.

36. Gerdin B. Reevaluation of an old method for studies on substances with an enhancing effect on microvascular permeability. J Pharmacol Methods 1981; 6:167-175.

37. Gnepp DR, Green FHY. Scanning electron microscopis study of canine lymphatic vessels and their valves. Lymphology 1980; 13: :91-99.

38. Gneepp DR. Vascular Endothelial Markers of the Human Thoracic Duct and Lacteal. Lymphology 1987; 20/1; 36-37.

39. Grega JG, Dobbins DE, Scott JB, Haddy FJ. Effects of histamine and increased venous pressure on transmicrovascular protein transport. Microvasc Res 1979; 18:95-104.

40. Guth PH, Hirabayshi K. The effect of histamine on microvascular permeability in the muscularis externa of rat small intestine. Microvasc Res 1983; 25:848-857.

41. Guyton GA. Medicinska fiziologija. Medicinska knjiga Beograd-Zagreb 1981; 250-261

42. Hall JG. The flow of lymph. N Engl J Med 1969; 281:720-742.

43. Huth F, Bernhardt D. The anatomy of lymph vessels in relation to function. Lymphology 1974; 10:54-61.

44. Hyman C. Physiologic functions of the lymphatic system. Cancer Chemoter Rep 1968; 52:25-31.

45. Jdanov DA. Anatomy and function of the lymphatic capillaries. Lancet 1969; 2:895-899.

46. Johnson RA. Lymphatics of blood vessels. Lymphology 1969; 2:44-49.

47. Johnson TJA, Rash JE. Glutaraldehyde Fixation Chemistry: Substituted Pyridine Polymers Result From Glutaraldehyde-Amine Reactions. J Cell Biol 1981; 91:217-221.

48. Johnston MG, Walker MA. Lymphatic endothelial and smooth - muscle cells in tissue culture. In vitro 1984; 20/7; 566-571.

49. Jones WR, O'Morchoe PJ, O'Morchoe CCC. The organization of endocytotic vesicles in lymphatic endothelium. Microvasc Res 1983; 25:286-299.

50. Kamei Y. The distribution and relative location the lymphatic and blood vessels in the mucosa of the rabbit colon. Nagoya Med J 1969; 15:223-227.

51. Kilzer P, Chang K, Marvel J, Kilo C, Williamson JR. Tissue Differences in Vascular Permeability changes Induced by Histamine. Microvascular Res 1985; 30:270-285.

52. Lauweryns JM, Boussauw. The Ultrastructure of lymphatic valves in the adult rabbit lung. Z Zellforschung 1973: 143:149-168.

53. Lauweryns JM, Baert J, Desloecker W. Fine filaments in lymphatic endothelial cells. J Cell Biol 1976; 68:163-167.

54. Leak L.V.: The Fine Structure and Function of the Lamphatic Vascular System Springer-verlag, 1972.

55. Leak LV. Physiology of the lymphatic system. Acad Press New York

1984; 1934-1964.

56. Leak LV. Lymphatic Endothelial-Interstitial Interface. Lymphology 1987; 20/4:196-199.

57. Leandoer L, Lewis DH. The effect of L-norepinephrine on lymph flow in man. Ann Surg 1970; 171.257-262.

58. Lindena J, Kupper W, Trautschold I. Catalytic Enzyme Activity Concentration in Thoracic Duct, Liver and Intestinal Lymph of the Dog, the Rabbit, the Rat and the Mouse. J Clin Chem Clin Biochem 1986; 24:19-33.

59. Magari S. Comparison of Fine Structure of Lymphatics and Vessels in Normal Conditions and During Embrionic Development and Regeneration. Lymphology 1987; 20/4:189-192.

60. Malcolm R, Wood MR, Wagner RC. Rapidly-Frosen, Cultured, Human Endothelial Cells: An between Treshly-Frasen and Glutaraldehy de Prefixed Cells. Microcirc Endoth and Lymph 1987; 3/5-6; 323-327.

61. Mason RG. Functions of Endothelium. Raven Press, New York, 1979.

62. Mayerson HS. Observations and reflections on the lymphatic system. Coll of Physicians Philadelphia 1961; 28:109-112.

63. Mayerson HS. The lymphatic system with particular reference to the kidney Surg Gynecol Obstet 1963; 116:259-262.

64. McGuire PG, Twietmeyer TA. Morphology of rapidly frozen aortic endothelial cells: Glutaraldehyde fixation increases the number of caveolae. Circ Res 1983; 53:424-429.

65. McGuire PG, Tvitmeyer TA. Intramembrane particle distribution and junction morphology in rapidly frozen aortic endothelial cells.

Microcirculation, Endothelium and Lymphatics 1984; 1:705-726.

66. Miller FN, Joshua IG, Anderson GL. Quantitaion of vasodilatator-in-macromolecular leakage by fluorescent microscopy. Microvasc Res 1982; 24:56-67.

67. Morishita T, Guth PH. Escape of Gastric Submucosal Arterioles from Acetylcholine Induced Dilatation. Microcirs Endoth and Lymph 1986; 3/1:89-92.

68. Morris B, Sass MB. the formation of lymph in the ovary. Proc R Soc Lond 1966; 164:577-581.

69. Niiro GK, O'Morchoe CCC. An ultrastuctural Study of Transport Pathways Across Rat Hepatic Lymph Vessels. Lymphology 1985; 18/3:98-101.

70. Nikulin A. O nekim morfološkim promjenama kod akutnog djelovanja histamina. Disertacija. Sarajevo 1964.

71. Nisimaru Y. Blood and lymph vessels and body fluid flow in the lungs Hiroshima J Med Sci 1969; 18:31-34.

72. Nose H, Yamada S, Morimoto T. Transvascular Fluid Shift and thoracic Duct Lymph: Analysis of Lymph Formation in the Rat. Jap J of Physiol 1984; 34:713-729.

73. Ohlsson E, Tegner H. Experimental pancreatitis in dogs - lymp flow. Scand Y Gasterenteral 1973; 4:89-92.

74. O'Morchoe PJ, Yang VV, O'Morchoe CCC. Lymphatic transport pathways during volume expansion. Microvasc Res 1980; 20:275-294.

75. O'Morchoe CCC. The anatomy of the lymphatic system. Acad Press New York 1984; 126-133.

75. O'Morchoe CCC, Jones WR, Jarosz HM, O'Morchoe PJ, Fox LM. Tem-

perature dependence of protein transport across lymphatic endothelium in vitro. J Cell Biol 1984; 98:629-640.

77. O'Morchoe CCC, Jarosz HM, Jones WR, O'Morchoe PJ. The study of Endothelial Vesicles in the Isolated Perfused Lymphatic Vessel. Prag Appl Microcirc 1985; 9:88-99.

78. O'Morchoe CCC, O'Morchoe PJ. Differences in Lymphatic and Blood Capillary Permeability. Ultrastructural-Function Correlations. Lymphology 1987; 20/4:205-207.

79. Palade GE. Small pore and large pore system in capillary permeability. Circulation 1961; 24:368-374.

80. Paldino RL, Hyman C. Relationship between lymphatic and blood flow in various structures in the abdominal cavity. Proc Soc Exp Biol Med 1964; 117:904-906.

81. Papp M, Markara GB, hajtman B. The resistance of in situ perfused lymph trunks and lymph nodes to flow. Experientia 1971; 27:391--396.

82. Pikula B. Morfološke i histohemijske studije limforetikularnog sistema u toku ireversibilnog i reversibilnog šoka. Doktorska disertacija. Sarajevo 1977.

83. Pinto da Silva P, Kachar B. On tight Junction Structure. Cell 1982; 28:441-445.

84. Reddy NP. A note on the lymphatic vessel network desing. J Biomech 1986; 13:529-531.

85. Reilly FD, Mccafferty RE. Hepatic Microvascular Regulatory Mechanisms. Microcirc Endoth and Lymph 1986; 3/1:21-23.

86. Satir BH, Satir P. Partitioning of intramembrane Particles During the

Freeze Fracture Procedure. Raven Press, New York, 1979.

87. Scnyder P. Hauser H, Moss A. CT of the thoracic duct. Eur J. Radiol 1983; 3:18-23.

88. Simionescu N, Hetianu C, Antohe F, Siminonescu M. Endothelial Cell Receptors for Histamine. New York Academy of Sciences, New York, 1982.

89. Stewart P. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation by EDRF. Br. J. Pharmacol 1988; 95:379-384.

90. Szabo G, Magyar Z. Pressure measurement in various parts of the lymphatic system. Acta Med Acad Sci Hung 1957; 23:237-241.

91. Takada M. The ultrastructure of lymphatic valves in rabbits and mice. Am J Anat 1981; 132:207-218.

92. Trapnell DH. The lymphatics of the thorax; the anatomy of the lymphatics of the lungs and chest wall. Thorax 1970; 25:255-260.

93. Vajda J, Tomcsik M. The structure of the valves of the lymphatic vessels. Acta Anat 1971; 78:521-531.

94. Wagner RC, Casley-Smith JR. Endothelial vesicles. Microvasc Res; 21:267-298.

95. Wagner RC, Robinson CS, Cross PJ, Devenny JJ. Endocytosis and exocytosis of transferrin by isolated capillary endothelium. Microvasc Res 1983; 25:387-396.

96. Wagner RC, Robinson CS. High-Voltage Electron Microscopy of Capillary Endothelial Vesicles. Microvasc Res 1984; 28:197-205.

97. Weiner S, Gramatiga L, Voegle LD. Role of the lymphatic system in the pathogenesis of inflammatory disease in the biliary tract and pancreas. Am J Surg 1970; 119:55-60.

98. Williams PL, Warwick R. Gray's anatomy churchill livingstone, 1980.

99. Witte MH, Witte CL, Okhashi. Are Lymphatics Different from Blood Vessels ? Lymphology 1987; 20/4: 169-174.

100. Yang VV, O'Morchoe PJ, O'Morchoe CCC. Transport of protein across lymphatic endothelium in the rat kidney. Microvasc Res 1981: 21: 75-91.

101. Zweifach FW, Fronek A. The interplay of central and peripheral factors in irreversible shock. Prag Cardiovasc Dis 1975; 18:147-150.