МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії і екології
Кафедра біології людини та імунології

ЦИТОМОРФОЛОГІЧНА ОРГАНІЗАЦІЯ СЕЛЕЗІНКИ В УМОВАХ ДІЇ ЕНДОГЕННОГО СЕРОТОНІНУ, ІНДУКОВАНОГО НАДЛИШКОМ ТРИПТОФАНУ

Кваліфікаційна робота (проєкт)

на здобуття ступеня вищої освіти магістр

Виконала: студентка 2 курсу 211-М групи
Спеціальності 091 Біологія
Освітньо-професійної програми
«Біологія»
Маслянка Альбіна Андріївна

Керівник к.б.н., доцент Гасюк О.М.
Рецензент к.б.н., доцент Загороднюк Н.В.

Херсон - 2019

ЗМІСТ

Вступ…….. 3

Розділ 1. Огляд літературних джерел…….. 6

1.1. Гістологічна будова селезінки людини……..……. 6

1.2. Гістологічна будова селезінки мишей та щурів..…… 11

1.3. Серотонін, його прямі та непрямі ефекти…… 16

1.4. Вазоактивні властивості серотоніну……... 22

Розділ 2. Матеріали та методи дослідження ……..... 25

2.1. Організація дослідження ……..…… 25

2.2. Модель дослідження впливу ендогенного серотоніну на лімфоїдні органи…… 25

2.3. Проведення перфузії селезінки за методом Langendorff….. 27

2.4. Методика фарбування зразків гематоксилін-еозином …….. 30

2.5. Методика визначення серотоніну в сироватці крові…….. 36

2.6. Цитоморфологічне дослідження…….. 37

Розділ 3. Аналіз отриманих результатів……. 39

3.1.Біометричні показники селезінки експериментальних тварин…….. 39

3.2. Вміст ендогенного серотоніну у досліджуваних тварин…… 45

3.3. Цитоморфологічна будова селезінки мишей досліджуваних груп……..

Висновки…….…….. 54

Список використаних джерел……. 56

ВСТУП

Актуальність дослідження. Організм людини та тварин завжди перебуває під загрозою різних факторів. Для того, щоб запобігти та оцінити такий вплив допомагають мікро- та макроскопічні дослідження структури певного органу чи систем органів.

Вазоактивні речовини почали досліджувати ще у 20 столітті. У 1980 році R.F. Furchgott и J.M. Zawadzki опублікували результати про вплив вазоактивних речовин на судини [12]. Вазоактивні речовини мають ендогенне та екзогенне походження Ендогенні вазоактивні речовини завжди пребувають у метаболізмі, але їх концентрації значно варіюють в залежності від функціонального стану організму. Екзогенні вазоактивні речовини найчастіше уводяться в організм у вигляді ліків.

Однією з таких вазоактивних речовин є серотонін, який є попередником незамінної амінокислоти L – триптофану. Серотонін має неоднозначний вплив на судинну реакцію, він може проявляти як вазоконстрикторний так і вазодилатаційний ефект. Така неоднозначність спричинена взаємодією різних серотонінових рецепторів з клітинами судин [39]. На даний момент все частіше з’являються повідомлення про порушення вазодилатації та вазоконстрикції судин. Але зараз даній проблемі приділяється недостатньо уваги, тож обрана тема є актуальною та перспективною для подальших досліджень.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконане в межах роботи над науково-дослідною ініціативною темою «Вплив деяких вазоактивних речовин на центральні та периферичні лімфоїдні органи білих мишей (державний реєстраційний номер 0117U001764, керівник доц. Гасюк О.М.)

Мета дослідження. Вивчити цитоморфологічну організацію селезінки в умовах дії ендогенного серотоніну, індукованого надлишком триптофану.

Завдання дослідження:

1. Розробити модель для дослідження впливу ендогенного серотоніну на лімфоїдні органи;

2. Модифікувати методику перфузії ізольованого серця за методом Langendorff для ізольованої селезінки миші та провести апробацію даного метода відповідно мети та завдань кваліфікаційної роботи;

3. Визначити рівень серотоніну в сироватці крові досліджуваних тварин;

4. Визначити морфометричні параметри селезінок досліджуваних тварин, в умовах впливу різних концентрацій триптофану;

5. Дослідити, за виготовленими мікропрепаратами, зміни цитоморфологічної організації селезінки в умовах дії ендогенного серотоніну, індукованого різними концентраціями триптофану.

Об’єкт дослідження. Цитоморфологічна будова селезінки лабораторних мишей.

Предмет дослідження. Гістологічна організація селезінки при дії ендогенного серотоніну, індукованого надлишком триптофану.

База дослідження. Лабораторія молекулярної біології та віварій кафедри біології людини та імунології факультету біології, географії і екології ХДУ.

Методи дослідження. Аналітичний огляд літературних джерел за тематикою кваліфікаційної роботи, моделювання впливу ендогенного серотоніну на лімфоїдні органи, перфузія ізольованої селезінки за методом Langendorff, гістологічні методи, метод визначення рівня серотоніна в сироватці крові, цитохімічні методи, методи математичної статистики.

Наукова значущість отриманих результатів. В роботі вперше створена модель, яка дозволяє вивчити вплив серотоніну на лімфоїдні органи (селезінка) лабораторних мишей, показано, що надлишкове уведення триптофану дає можливість додатково індукувати синтез ендогенного серотоніну. Показано, що ендогенний серотонін, індукований надлишком триптофану, має дозозалежний вплив на цитоморфологічну організацію селезінки.

Практична значущість отриманих результатів. Результати проведеного дослідження будуть використані в освітньому процесі підготовки фахівців-біологів при викладанні курсів «Імунологія», «Клітинні основи кровотворення», «Основи патології» для спеціальностей 091 Біологія, 014.05 Середня освіта (Біологія) та 014.05 Середня освіта (Біологія та здоров’я людини) та у шкільному курсі біології. Також вони дозволяють оволодіти практичними навичками роботи в клінічній лабораторії.

Апробація результатів дослідження. Робота була представлена на звітній студентській конференції на кафедрі біології людини та імунології у 2018 та 2019 роках. Також результати опубліковано у науковій статті).

Структура роботи. Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків та списку використаних джерел із 60 найменувань. Робота ілюстрована 2 таблицями та 27 рисунками.

РОЗДІЛ 1.
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Гістологічна будова селезінки людини

Одним з найважливіших периферичних органів імунної системи є селезінка, [45] що виконує в організмі різноманітні та важливі функції [33]. Лімфоїдний орган відіграє важливу роль в забезпеченні активного контакту імунокомпетентних клітин з антигенами крові, тому й забезпечує гуморальний імунітет [1]. Також, різні автори розглядають селезінку як «фільтр кровоносної системи», так як, вона знищує пошкоджені та старі формені елементи [27].

Залежно від процесів депонування крові і активності кровотворення маса, об’єм і розміри селезінки можуть значно варіювати. За даними різних авторів селезінка дорослої людини важить від 55 до 245 г (вага у чоловіків більше, ніж у жінок) [7].

Селезінка у людини має різну форму - округлу або овальну, подовжується з віком, що пов'язують з приростом лімфоїдних утворень в органі. Єдина класифікація форм відсутня (овальна, тетраедра, кавового зерна та ін.) [43]. Пропонують розрізняти селезінку коротку і широку (частіше зустрічається у дітей) та довгу і вузьку (більш характерна для дорослих). Селезінку порівнюють з кавовим зерном, розрізняють дві її поверхні - опуклу латеральну (діафрагмальну) і дуже нерівну медіальну (вісцеральну), причому остання контактує з внутрішніми органами і підрозділяється на вторинні поверхні - увігнута шлункова (передня з воротами), ниркова (задня) і ободова (нижня) [32].

Покрита селезінка очеревиною і капсулою, саме від якої всередину органу відходять трабекули, анастомозуючи один з одним [7].

Структурна організація рельєфу поверхні очеревини характеризується великою кількістю специфічних ознак. Серед яких:

складчаста форма поверхні, різної величини та округлої форми ямки на поверхні місць прикріплення до неї трабекул, наявність на поверхні дрібних кулястих ворсин та підвищень. Ці ознаки пов'язані з депонуючою функцією селезінки, рухливістю прилеглої діафрагми і вираженим механічним впливом на поверхню селезінки оточуючих органів [25].

У селезінці розрізняють червону пульпу, яка складає від 70 до 80% маси органу, та білу пульпу, на частку якої припадає від 6 до 20% маси селезінки. У білій пульпі селезінки переважають лімфоцити [45].

Біла пульпа складається з периартеріальних лімфоїдних піхв, лімфоїдних фолікулів або лімфоїдних вузликів, і маргінальної зони [7] (рис. 1.1).

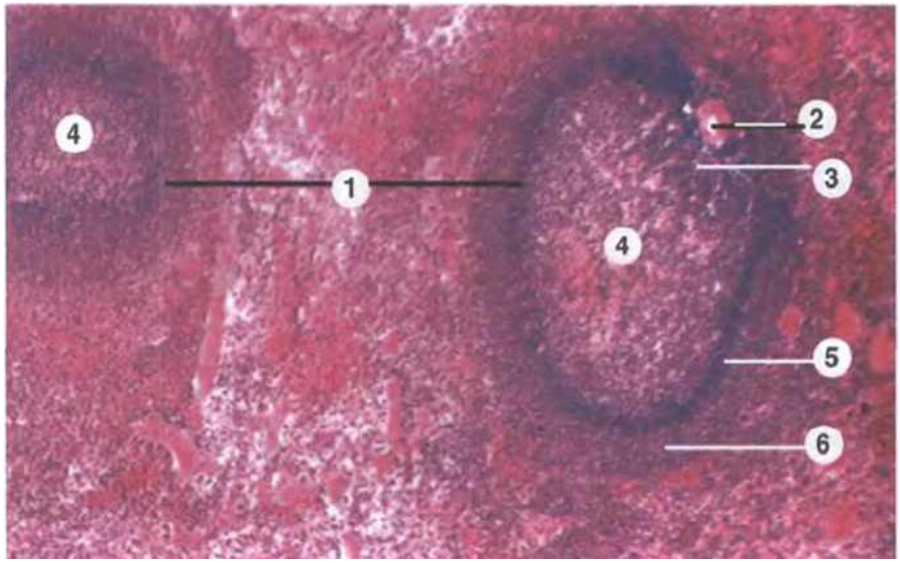


Рис.1.1. Біла пульпа (за Кузнецовим С. Л.) [14]

Примітки:

1. Фолікули (лімфоїдні вузлики);

2. Артерія вузлика, або центральна артерія;

3. Периартеріальна зона;

4. Гермінативний (або реактивний) центр;

5. Мантійна зона: оточує дві попередні зони;

6. Крайова, або маргінальна зона: перехідна область навколо вузлика

Основу лімфоїдного вузлика утворює ретикулярна тканина, в петлях якої лежать лімфоцити. Вузлики селезінки мають діаметр 0,3-0,5 мм, в їх центрі або ексцентрично розташована артеріола. Основна частина вузлика - В-зона, де відбувається розмноження і диференціювання В-лімфоцитів і плазмоцитів і де знаходяться спеціалізовані макрофаги - дендритні клітини. В вузлику є невелика Т-зона, розташована навколо артеріоли, де відбувається розмноження і диференціювання Т-лімфоцитів [48] .

Більшість Т- і В- лімфоїдних елементів білої пульпи селезінки є частиною рециркулюючого пулу лімфоцитів, безперервно мігрують по всіх лімфоїдних органах. Біла пульпа може змінювати свої розміри за рахунок міграції імунокомпетентних клітин [6] .

Лімфоїдні вузлики мають кілька стадій розвитку (початкова, без світлого центру, зі світлим центром). Формування світлих центрів відбувається при антигенній стимуляції і є показником високої функціональної активності лімфоїдного вузлика. В такому функціонально активному вузлику розрізняють 4 основні зони: центр розмноження, мантійну, крайову (маргінальну) і периартеріальну зони. У центрі розмноження (світлому центрі) відбувається проліферація В-бластів і диференціювання В-лімфоцитів і плазмоцитів, тут часто видно фігури мітозів. У мантійній зоні накопичуються малі В-лімфоцити, плазмоцити і невелике число Т-лімфоцитів. У крайовій зоні знаходяться переважно диференційовані Т- і В-лімфоцити. Периартеріальні лімфоїдні піхви, розташовані по ходу пульпарних артеріол, - це в основному В-зони, де знаходяться В-лімфоцити і плазмоцити [48].

Червона пульпа займає більшу частину всієї пульпи органу. Представлена ретикулярною тканиною з розташованими в ній форменими елементами крові, в тому числі в червоній пульпі вільно розташовуються лімфоцити, макрофаги, плазматичні клітини (рис. 1.2)

[41]. Також червону пульпу описуються як фільтр крові, який видаляє пошкоджені еритроцити [48].

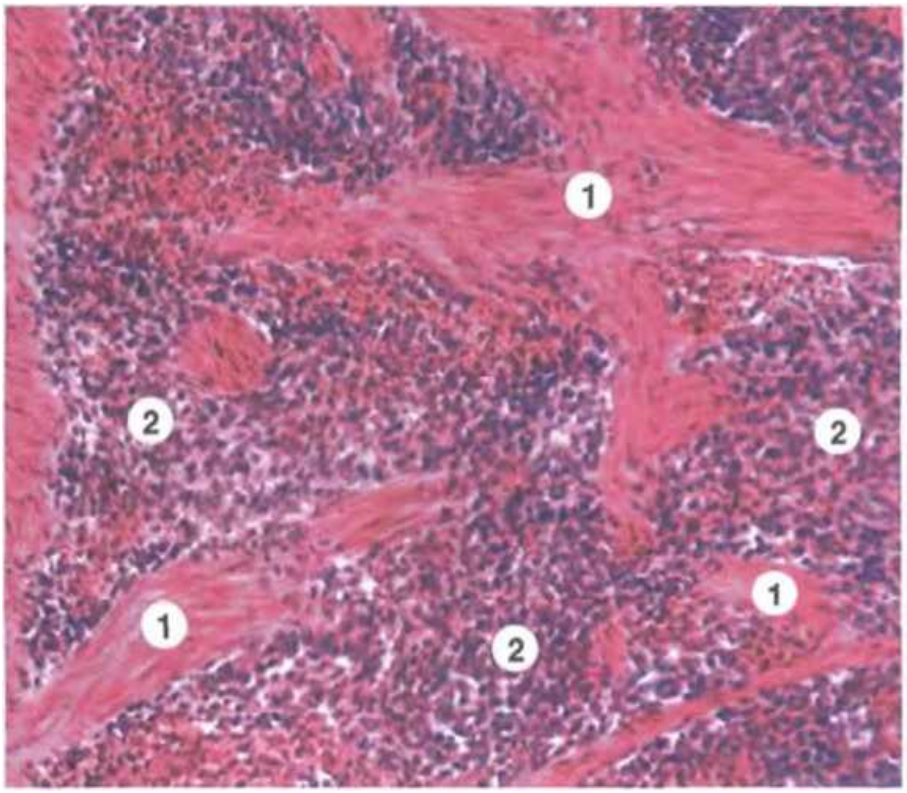


Рис.1.2. Червона пульпа (за Кузнецовим С. Л.) [14]
Примітки:
1. Трабекули;
2. Червона пульпа (розташована між трабекулами).

Червона пульпа включає венозні синуси і селезінкові або пульпарні тяжі [7]. Наявність в цій пульпі еритроцитів і синусоїдів з кров'ю обумовлює її червоний колір. У червоній пульпі знаходяться численні макрофаги, які руйнують старі еритроцити, а також забезпечують захоплення сторонніх часток і бактерій, що потрапили в кров. Посилення захисної функції селезінки при багатьох інфекційних захворюваннях, як правило, супроводжується збільшенням її розмірів, що використовується в діагностиці. Селезінка може депонувати значну

кількість крові (до 1 л), що забезпечується особливою будовою і функціонуванням її кровоносних судин [48].

Функціональні зони селезінки, а саме їх структура в більшій мірі залежать від функціонального стану імунної та кровотворної систем, які визначають стан гемопоезу, інтенсивність імунної відповіді і індивідуальну реактивність [41].

Безперервна міграція гематопоетичних клітин слезінки з крові в лімфоїдні органи і назад до крові - це ефективний спосіб для цих клітин шукати збудників та антигенів. У селезінці, гранична зона є важливою транзитною зоною для клітин які залишають кров і потрапляють в білу пульпу. Це активний процес, який передбачає сигналізацію через рецептори, пов'язані з G-білком [55].

Одна з провідних ролей у формуванні протипухлинного імунного захисту належить селезінці. Тут відбувається остаточне антигензалежне диференціювання В- і Т-лімфоцитів, а також перетворення В-лімфоцитів в плазмоцити і накопичення клітин-пам'яті [23].

В селезінці забезпечується активний і досить тривалий контакт різноманітно детермінованих імунологічно компетентних клітин з антигенами, що знаходяться в крові, що проходить через селезінку [18]. Селезінка не належить до числа життєвоважливих органів, проте є найбільшим колектором лімфоїдної тканини в організмі і виконує важливі гематологічні та імунологічні функції, формуючи генералізовану імунну відповідь всього організму на проникнення антигену, запальний процес або будь-яке інше порушення гомеостазу організму [49, 530]. З’ясовано, що після спленектомії у людей виникаються процеси, які змінюють імунну резистентність організму, що призводять до летальних випадків [46].

На думку дослідників, імунний апарат селезінки, має більш складну будову, ніж інші периферичні органи імунної системи. В селезінці до імунного апарату слід віднести ділянки білої пульпи, а саме

периартеріальні лімфатичні вузли, які огортають всі пульпарні артерії, лімфатичні вузли, а також венозні синуси [36]. Селезінка відповідає на антигени, які потрапляють в неї з кров'ю, виробленням антитіл. Саме в селезінці раніше, ніж в будь-якому іншому органі, у відповідь на введення антигенних часток починається синтез Ig M. Після прояви атигенів в кровотоці вже на другий день відбувається активація лімфоцитів в білій пульпі селезінки [38]. Селезінка багата макрофагами, за допомогою яких здійснюється фагоцитоз і знищення зношених еритроцитів і лейкоцитів, а також бактерій і злоякісних пухлинних клітин [18].

Отже, селезінка це унікальний орган в системі лімфоцитопоезу, що включає в себе основну масу імуноглобулінпродукуючих лімфоцитів В-клітинної системи і регуляторів імунологічних реакцій Т-клітинної системи [3].

1.2. Гістологічна будова селезінки мишей та щурів

Як і у людини так і у тварин селезінка це мультифункціональний та найважливіший орган імунної системи [2], що реагує на будь-який іммунопатологічний процес в організмі, забезпечує гомеостаз еритроцитів і бере участь в ефекторних фазах гуморальної імунної відповіді [11]. Основною відмінністю людської селезінки від селезінки щурів є відсутність в паренхімі (рис 1.3.) навколо артеріол периартеріальної лімфоїдної муфти і маргінального синуса, що відокремлює маргінальну зону від мантійної зони (корони) лімфатичного вузлика [57]. Пульпарні артерії не супроводжуються колагеновими волокнами, але навколо них присутня лімфоїдна тканина, яка зменшується в міру ділення на артеріоли і капіляри.

Також відмінність у гістологічній будові людини та тварин, полягає у тому, що у селезінці тварин відсутній маргінальний синус, який у

тварин є кордоном між мантійною і маргінальною зонами. Тож, у людини складно виявити кордон між мантійною і маргінальною зонами в лімфоїдному вузлику селезінки, що призводить до плутанини у визначенні терміну маргінальна зона. Так, J.Krieken, J.TeVelde [52] запропонували позначати прикордонний простір між червоною і білою пульпою як "перифолікулярну зону", а термін "маргінальна зона" залишити для єдиної селезінкової структури, яка завжди і ексклюзивно присутня навколо невеликих Ig D і Ig M-позитивних лімфоцитів мантійної зони або "корони", що найбільш прийнятно при описі морфології селезінки в нормі та патології. Маргінальна зона селезінки являє собою область, сформовану різними типами клітин. Деякі з цих типів клітин, такі як макрофаги маргінальної зони, металофільні макрофаги і в невеликому ступені, В-клітини маргінальної зони, здається мають фіксоване положення по внутрішньому краю маргінальної зони. Інші типи клітин Т- лімфоцити, малі В-лімфоцити і дендритні клітини - розташовані в маргінальній зоні тимчасово. Завдяки комбінації тимчасово осілих клітинних популяцій і постійної циркуляції в кровотоці імунокомпетентних клітин маргінальна зона перетворюється в динамічний простір по Kraal, яка здійснює переважно адаптивну імунну відповідь (антитілоутворення).

Розміри у білих щурей відносні, відносна довжина селезінки щурей вона є більшою, ніж у людини. Її абсолютна довжина наближається до поздовжнього розміру черевної порожнини. Довга селезінка щура (але при цьому не вузька) більш-менш косо спускається від лівого купола діафрагми каудально, в напрямку лівої клубової ямки [31].

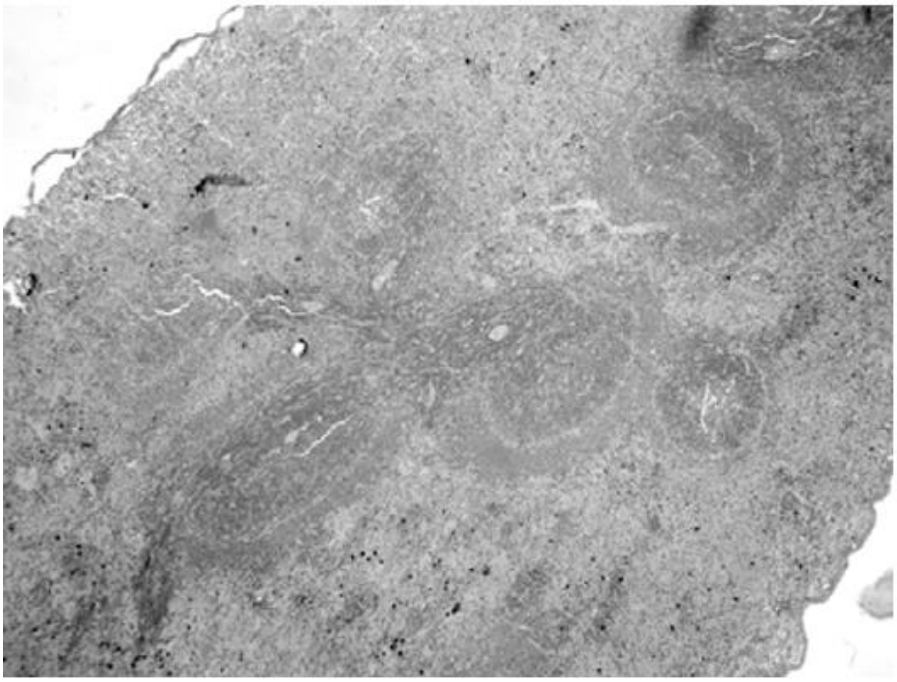


Рис.1.3. Паренхіма селезінки статевозрілого щура. Збільшення 40Х . Забарвлення – гематоксилін-єозин (за Овчаренко В.В.) [29].

Особливістю будови капілярів селезінки є наявність на термінальному кінці структур, специфічних тільки для селезінки, які називаються різними дослідниками по різному: капіляри в оболонці, еліпсоїди, периартеріальна макрофагальна оболонка, макрофагальні еліпсоїди [58]. У людини вони присутні тільки в червоній пульпі і перифолікулярній зоні. Ці оболонки (еліпсоїди) капілярів складаються тільки з фагоцитів. Ендотеліальний шар закінчень цих капілярів закінчується концентрично розташованими навколо макрофагами.

Роль, яка виконується маргінальним синусом у гризунів в обміні лімфоцитами між циркуляційною кров'ю і білою пульпою, у людей виконується ендотелієм у широких синусах бобовидної форми в червоній пульпі. Підтвердженням цього служить той факт, що лімфоїдні вузли людської селезінки оточують перифолікулярну зону, яка має структуру ретикулярної тканини червоної пульпи, що містить лімфоретикулярні клітини в результаті загальної і локальної проліферації лімфоцитів всередині стромальних тяжів. Таким чином,

нові лімфоїдні вузли можуть утворюватися всередині червоної пульпи з невеликих сукупностей лімфоцитів не у фільтрувальних зонах.

Т-лімфоцити у селезінці людини, як і у тварин, розташовані навколо артеріол, але вони не так упорядковані, як у периартеріальній лімфоїдній муфті гризунів. У людей вони представляють неправильну форму просторів, зайняті дрібними поліморфними лімфоцитами, більшість із яких зафарбовуються імуногістохімічними антитілами кластера CD4 (Т-хелпери). Навколо скупчень Т-лімфоцитів також є перифолікулярна зону, яка візуально важко визначається у людей, але дуже чітко виражена у гризунів, зокрема у щурів. Нерідко лімфоїдні вузли межують з Т-лімфоцитами периартеріальної лімфоїдної муфти, з якою вони діляться загальною перифолікулярною зоною.

Отже, структурна організація селезінки людини відрізняється від селезінки тварин у зв'язку з чим, не можна розповсюджувати на людину досліди, проведені на тваринах. Паренхіма селезінки ділиться септами і трабекулами на окремі частини (камери), кожна з яких має свою структуру і популяцію клітин і тому може мати власну функцію, в зв'язку з чим, попереднє ділення селезінки на червону та білу пульпу є дещо спрощеним і має бути більш розширеним [5].

Важливо зазначати, що зміни селезінки можуть бути певним маркером вікових змін, адже функціональні взаємозв’язки селезінки з іншими органами імунної системи, зокрема, з тимусом, можуть обумовлювати певні вікові інволюційні процеси. Наприклад, під час дослідження В.В.Овчаренко динаміки вікових змін морфометричних характеристик елементів будови селезінки інтактних груп тварин (рис. 1.4, 1.5) на гістотопографічних зрізах виявлено, що біла пульпа займає селезінки щура від 10 до 15% площі паренхіми органу, в середньому, складаючи 13,3 ± 1,9%, тоді як площа червоної пульпи варіює від 70,2% до 80 % і становить, в середньому, 74,6 +2,0%.

Велика частина білої пульпи припадає на периартеріальні лімфоїдні муфти, площа яких на зрізах селезінки коливається від 6,8% до 8,2% від усієї площі білої пульпи.

Хоч селезінка не є життєво важливим органом, але після видалення селезінки число інфекційних ускладнень при хірургічних втручаннях вище в 58 разів, а смертність в 14 разів. В той же час доведено значення її в продукції антитіл, у регуляції синтезу гемоглобіну і дозрівання еритроцитів. Досліджено, що видалення селезінки у щурів призводить до загибелі тварини, тому саме селезінка виконує захисну функцію.

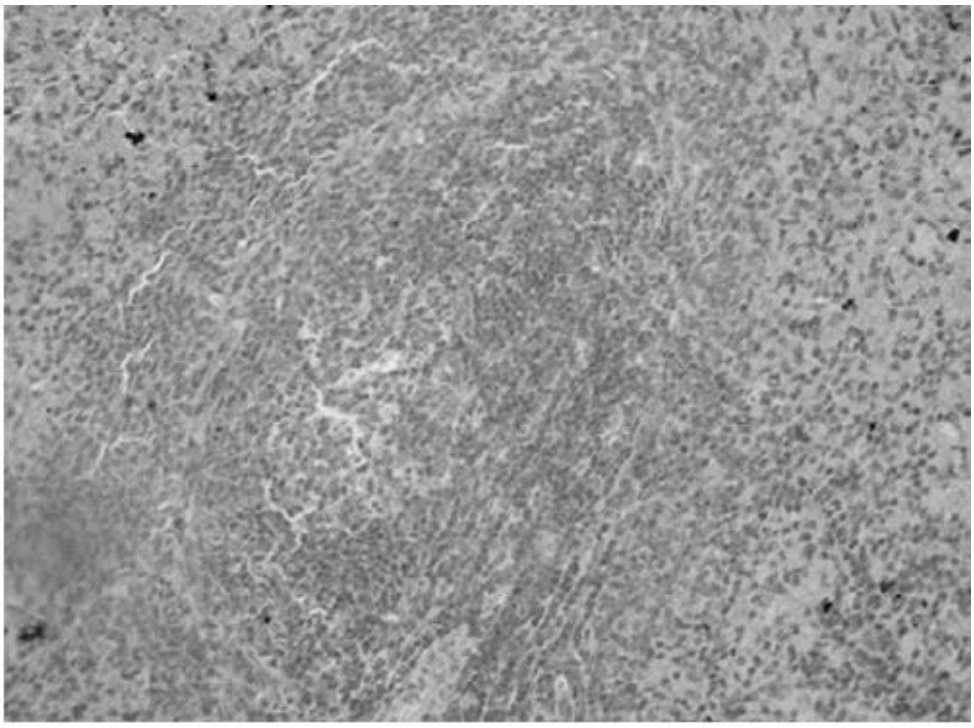


Рис.1.4. Лімфатичний вузлик білої пульпи селезінки статевозрілого щура. Збільшення 400Х . Забарвлення – гематоксилін-єозин (за Овчаренко В.В.) [29].

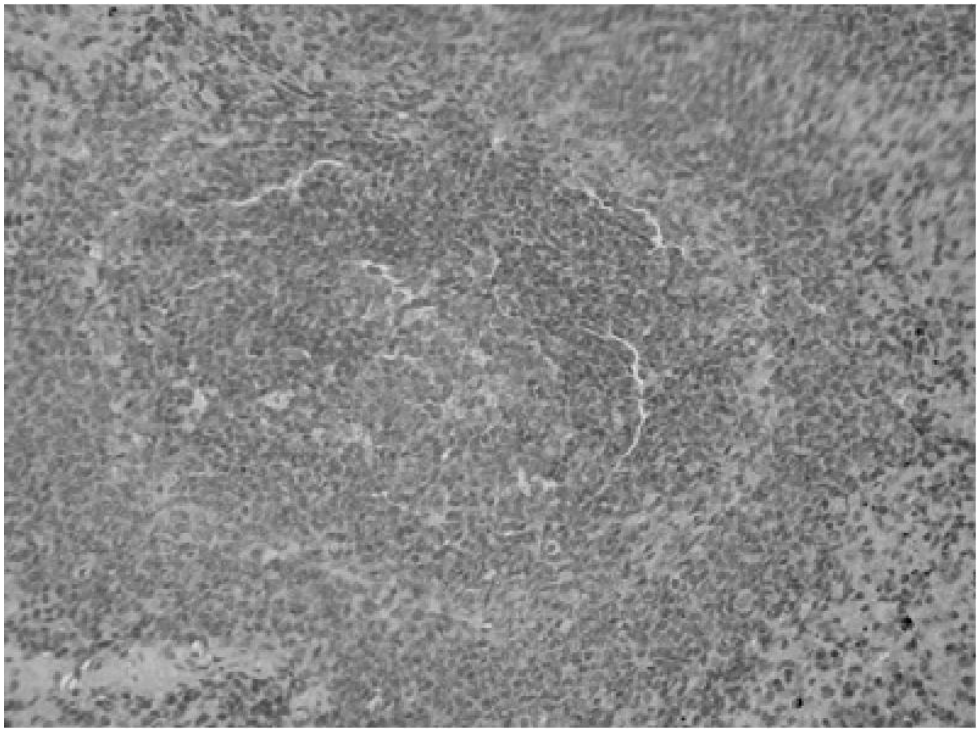


Рис.1.5. Лімфатичний вузлик білої пульпи селезінки старого щура. Збільшення 400Х. Забарвлення – гематоксилін-єозин (за Овчаренко В.В.) [29].

Селезінка дорослих щурів зберігає також функцію еритропоезу протягом всього життя . Відомо що, імунний апарат селезінки має більш складну будову, ніж інші периферичні органи імунної системи, у зв'язку з чим до сих пір відсутні переконливі інтерпретації функцій окремих ланок цього апарату [29]

1.3. Серотонін, його прямі та непрямі ефекти.

В організмі людей та тварин, як відомо виробляється, так званий «гормон щастя». Серотонін - найважливіший регулятор функцій центральної нервової системи [44], який ідентифікований і названий M. Rapport і I. Page [4]. Також це один з головних нейромедіаторів, але міститься він не тільки в нервовій тканині, але в багатьох внутрішніх

органах, в тому числі в шлунково-кишковому тракті, ендокринних залозах, тромбоцитах, клітинах мозкового шару наднирників [8].

Попередником серотоніну є незамінна амінокислота L-триптофан. Відомо, що рівень серотоніну в тканинах головного мозку знаходиться в прямій залежності від вмісту триптофану в плазмі крові. При дефіциті триптофану в їжі падає не тільки кількість його в плазмі крові, але також рівень серотоніну в головному мозку [10]. Триптофан допомагає підтримувати природний сон, зменшує больову чутливість, діє як природний антидепресант, здійснює допомогу в зменшенні занепокоєння і напруги. Ця амінокислота знижує деякі симптоми біохімічних порушень в організмі, викликані прийомом алкоголю, а також перешкоджає розвитку алкоголізму. Триптофан не синтезується в людському організмі, ми можемо отримати його тільки з продуктами харчування [42].

L-триптофан - це унікальна білкова амінокислота, що містить індольне кільце, (рис 1.6.) її біотрансформація в живих організмах сприяє або утриманню цієї хімічної групи в клітинах і тканинах, або до її руйнування, генеруючи в обох випадках різні біоактивні молекули [54].

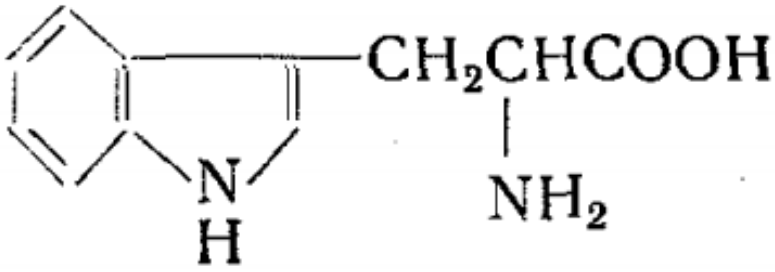


Рис 1.6. Структурна формула триптофану [17]

Триптофан є протеїногенною амінокислотою і входить до складу білків всіх живих організмів. У природі триптофан синтезують

мікроорганізми, рослини і гриби; при цьому триптофан синтезується через антрапілат. Для людини, як і для всіх Metazoa, триптофан є незамінною амінокислотою і повинен надходити в організм у достатній кількості з білками їжі [34].

Також, триптофан, по-перше, є джерелом утворення нікотинамідних коферментних форм вітаміну В5 (РР), а по-друге, метаболізм триптофану пов'язаний з утворенням серотоніну, мелатоніну, 5-гідроксиіндолацетата, які здатні чинити значний вплив на обмінні процеси різних органів і тканин організму. Триптофан може перетворюватися в різні індольні похідні, кінцевими продуктами цих перетворень, які екскретуються разом з сечею, є в основному 5-гідроксиіндолацетат, головний продукт гідрокситриптофан - серотонінового шляху обміну, який є індуктором диференціювання і проліферації швидко оновлюючих тканин .

Триптофан може утворюватися двома метаболітичними шляхами – серотоніновим та кінуреніновим, який є основним шляхом утворення в організмі (рис 1.7.) та бере участь у процесі трансляції мРНК [35].

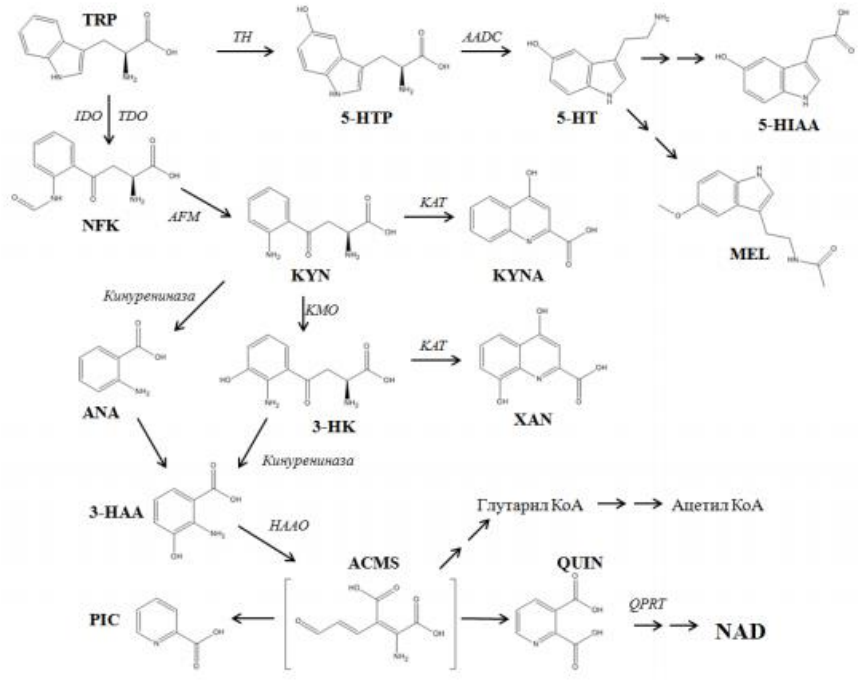


Рис 1.7. Схема метаболізму триптофану в організмі людини [47]

Серотонін за хімічною будовою відноситься до групи індолілалкіамінів, він є біогенним аміном, який утворюється в організмі з незамінної амінокислоти L-триптофана [39]. L-триптофан перетворюється (рис 1.8.) спочатку в 5-гідрокситриптофан за допомогою триптофангідроксилази, а потім в серотонін за допомогою декарбоксилази ароматичних L-амінокислот [37].

Одним з важливих шляхів обміну триптофана в організмі є його перетворення в 5-гідрокситриптамін. Такі вчені як Верле і Меннікен пишуть, що в тканинах ссавців триптофан перетворюється в речовину, яка призводить до збільшення відповіді на зовнішній вплив. Нещодавні дослідження Юденфренда показали, що вказана речовина це 5-гідрокситриптамін. Вона схожа на гормон бесхребетних - ентерамін або серотоніну. Попередником 5-гідрокситриптаміну є триптофан; це показали дослідження, в яких після годування кроликів міченим триптофаном був виділений мічений 5-гідрокситриптамін [17].

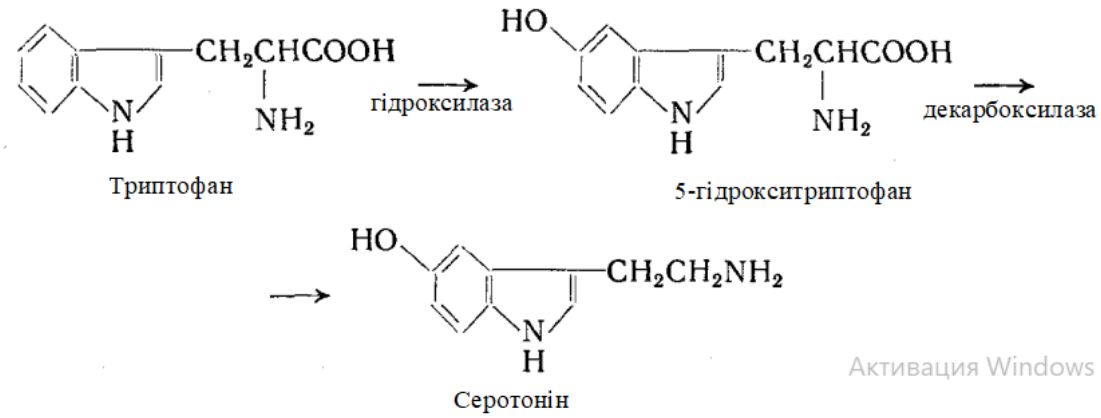


Рис 1.8. Схема претворення триптофана в серотонін [17]

Припускають, що при цьому перетворенні спочатку відбувається окиснення ароматичного ядра, а потім декарбоксилювання бічного ланцюга, так як в тих же умовах триптамін не утворюється і не переходить в 5-окситриптамін. У ізотопних дослідах із застосуванням

методу «пастки» показано перетворення триптофану в 5-окситриптамін зрізами печінки морської свинки і щурів [17].

Молекула серотоніну відноситься до сімейства сполук ароматичної природи, вона містить групу з п'яти атомів, що містять азот. Фермент, який контролює виробництво 5НТ - триптофангідроксилаза, це перший фермент цього метаболічного ряду.

Багато серотонінергічних (що відносяться до дії серотоніну) нейронів знаходяться в стовбурі головного мозку, в групі ядер шва головного мозку.

Ці нейрони включені в комплекс різних когнітивних (пізнавальних) функцій, серед яких є управління увагою. Проекції (провідні шляхи) таких клітин розподілені в напрямку до церебральних утворень і до кісткового мозку [28].

Серотонін приймає участь в таких важливих функціях як: передача нервового імпульсу, регуляція моторики шлунково-кишкового тракту, гомеостазу, судинних реакціях. Всі ці функції взаємопов’язані з рецепторами. В останні роки виділяють таку функцію серотоніну як імунорегуляторну [51].

Насьогодні вчені виділяють 7 родин рецепторів серотоніну - 5-НТ-1, 5-НТ-2, 5-НТ-3, 5-НТ-4, 5-НТ- 5, 5-НТ-6, 5-НТ-7, частина з яких має підтипи. Існує ще одна класифікація серотонінових рецепторів, запропонована в 1993 р «Serotonin Club», яка виділяє 7 їх популяцій: 5-НТ1А, 5-НТ1В, 5-НТ1D, 5-НТ1Е, 5-НТ1F, 5-НТ2А, 5 НТ2В, 5-НТ2С, 5-НТ 3, 5-НТ4, 5-НТ5, 5-НТ6, 5-НТ7 [4]. Взаємодія молекули серотоніну з певним класом рецепторів викликає характерний фізіологічний ефект. Активація серотонінових рецепторів запускає внутрішньоклітинні процеси, які впливають на збудження інших медіаторних систем - глутаматної, дофамінової, ГАМК [8]. Наприклад, активація серотонінових рецепторів 5-НТ-2 та їх антагоністів може стимулювати активацію пролактину [16, 56].

«Гормон щастя» здатний перетворюватися в мелатонін - гормон епіфіза, який регулює добові та сезонні зміни метаболізму організму і бере участь в регуляції репродуктивної функції. Також серотонін полегшує рухову активність в організмі [34].

Також серотонін бере участь у здійсненні важливих фізіологічних функцій, таких як: передача нервового імпульсу, регуляція моторики шлунково-кишкового тракту, гомеостаза та судинних реакцій організмі [39]. Доведений зв'язок серотоніну з катехоламінами в регуляції менструальної функції. На рівень ендокринної системи він впливає не лише на регуляцію менструальної функції через гіпоталамо-гіпофізарну систему, але і на соматичну сферу [42]. На рівень ендокринної системи він впливає не лише на регуляцію менструальної функції через гіпоталамо-гі-пофізарну систему, но і на соматичну сферу, що показує вплив на різні органи та системи [3].

Відомо, що велика кількість серотоніну (90%) виробляється в ентерохромафінних клітинах слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, а саме в кишечнику [4], який потім декретується в кров та поглинається тромбоцитами. Тромбоцити зберігають серотонін у дуже високих концентраціях у своїх щільних гранулах і виділяють його при активації. Концентрація серотоніну в плазмі може швидко збільшуватися, коли тромбоцити активуються в місці утворення тромбу або запалення. Також, серотонін виконує функції як вродженого, так і адаптивного імунітету [51].

У 60-х роках минулого століття E. Bulbring показала, що при підвищенні внутрішньокишкового тиску в кишці серотонін виділяється в просвіт з ентерохромафінних клітин слизової, при цьому активується сенсорний нейрон підслизового шару і запускається перистальтичний рефлекс [40]. Тому серотонін відіграє важливу роль в регуляції моторики і секреції в шлунково-кишковому тракті, при цьому він посилює його перистальтику і секторну активність.

Серотонін як нейромедіатор використовується ядрами шва головного мозку, бере участь в регуляції сну і неспання, передачі сенсорної інформації, формуванні емоцій, а при системній гормональній дії стимулює стероїдогенез в наднирниках [37].

На думку деяких вчених серотонін є зв'язуючою речовиною між нервовою, імунною, ендокринною системами та власними покровами [18].

Відомо також, що серотонін має пряму дію на гладкі м'язи судин, викликаючи в різних умовах їх скорочення або релаксацію; бере участь в регуляції дихання, температури тіла, моторики органів травного тракту і секреції слизу. Крім того, він може потенціювати або послаблювати відповіді, індуковані іншими вазоактивними агентами [37].

1.4. Вазоактивні властивості серотоніну

Через різні типи рецепторів серотонін має комплексний (іноді протилежно спрямований – це залежить від взаємодії певного типу серотонінових рецепторів) вплив на серцево-судинну систему. Наприклад через 5-НТ2-рецептори гладких м'язів стінок судин серотонін викликає звуження судин [21]. У той же час непрямий ефект серотоніну обумовлює розширення судин і зниження артеріального тиску: через 5-НТ1А-рецептори він блокує симпатичні нейрони стовбура мозку і периферії, що призводить до зниження симпатичного тонусу, а активація 5-НТ1-рецепторів в судинному ендотелії призводить до викиду вазодилататорів (простациклін, оксид азоту) [59].

Вплив серотоніну на судинну реакцію є неоднозначним: він може проявляти і як пряму вазоконстрикторну дію, і як ампліфікація судиннозвужуючої активності адренергічних медіаторів [39]. Крім того, серотонін може викликати і зворотний ефект - розширення судин в

результаті безпосередньої дії на специфічні рецептори і внаслідок вторинних рефлекторних змін тонусу.

Вазоконстрикторна дія серотоніну найчастіше обумовлена взаємодією серотоніну з рецепторами 5-НТ2 мембран гладких клітин. Ця дія вибірково блокується кетансерином. Кетансерин - блокатор рецепторів серотоніну 5-НТ2. У людини цей препарат гальмує вазоконстрикцію і агрегацію тромбоцитів, спричинену серотоніном. Мабуть, вазоконстрикторний ефект серотоніну обумовлюється вивільненням тромбоксану А2, який є потужним вазоконстриктором. Активація 5-НТ2 рецепторів серотоніну, розміщених на поверхні мембран тромбоцитів, посилює судинний спазм під дією тромбоксанів [39].

Як судиннозвужуючий агент, серотонін діє переважно завдяки включенню анаеробних метаболічних механізмів. Однак стійкість судинного спазму, що виникає під дією серотоніну, залежить від наявності глюкози.

Виразність судиннозвужуючого ефекту серотоніну знижується в міру зменшення діаметра судин, крім того, різні ділянки судин мають різну чутливістю до серотоніну. [39]. Найбільш виражену дію серотонін спрямовує на великі судини. Скорочення гладкої мускулатури відбувається при взаємодії серотоніна з серотонін - реактивними структурами гладких м’язів [4].

У певних умовах серотонін має судинорозширювальну дію. У дослідженнях in vitro та in vivo встановлені три головних механізми, що зумовлюють вазодилатацію під дією серотоніну: прямий релаксуючий вплив на гладкі м'язи, пресинаптичне інгібування вивільнення норадреналіну з симпатичних нервових закінчень, інервуючих судини, а також виділення ендотеліальними клітинами фактора релаксації, який в даний час ідентифікується з оксидом азоту (N0). Всі зазначені механізми здійснюються за участю 5-НТ1 рецепторів, а підтипи рецепторів

забезпечують диференціацію цих механізмів. Кожен з цих механізмів може домінувати в певному регіоні судинного русла.

Тому, ймовірно, позитивні результати використання 5НТ2-антагоністів серотоніну обумовлені не тільки гальмуванням агрегації тромбоцитів і усуненням гладенько-м'язового спазму, але також і «демаскування» дилатаційного ефекту. Оксид азоту є інгібітором вазоконстрикторної дії серотоніну, а також у високих концентраціях серотонін може взаємодіяти з рецепторами класу 1 (5-НТ1), викликаючи вазодилатацію, але те що оксид азоту є прямим вазоконстриктором дії серотоніну є мало вивченим. В той час існуть такі дослідження в яких показано, що при придушенні синтезу серотоніну розвивається гіперчутливість мозкових судин до оксиду азоту, тобто дефіцит серотоніну потенціює вазодилатацію, викликану N0. Судиннорозширююча дія серотоніну на периферичні судини, пов'язана з активацією метаболізму N0, та блокується антагоністами 5-НТЗ / 5-НТ4-рецепторів [39].

РОЗДІЛ 2.
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Організація дослідження

Дослідження цитоморфологічної будови селезінки мишей в умовах дії ендогенного серотоніну, індукованого надлишком триптофану проводилось на базі лабораторії фізіології кровообігу кафедри біології людини та імунології ХДУ у 2018-2019 та 2019-2020 навчальному році.

Дослідження проводилось на білих лабораторних мишах лінії BALB, вагою 26 – 38 г. Тварини знаходилися на стандартному повноцінному харчуванні у звичайних умовах віварію. Хворих тварин в дослід не брали.

Усі маніпуляції із тваринами проводились у відповідності із положеннями Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України №66 від 13.02.2006 р. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006, № 3447-IV.

2.2. Модель дослідження впливу ендогенного серотоніну на лімфоїдні органи

Для вивчення ефектів впливу ендогенного серотоніну на макро- і мікроструктуру селезінки, ми розробили «Модель дослідження впливу ендогенного серотоніну на лімфоїдні органи».

Відповідно схеми експериментального дослідження (рис.2.1.) усі тварини були поділені на три групи по 2 особини в кожній: експериментальна група 1 – миші віком 3-4 місяці, яким перорально

вводили L- триптофан у дозі 6 мг/кг (n = 2), експериментальна група 2 – миші, яким перорально вводили L- триптофан у дозі 18 мг/кг (n = 2) та контрольна група – інтактні тварини віком 3-4 місяці (n = 2), які отримували перорально фізіологічний розчин.

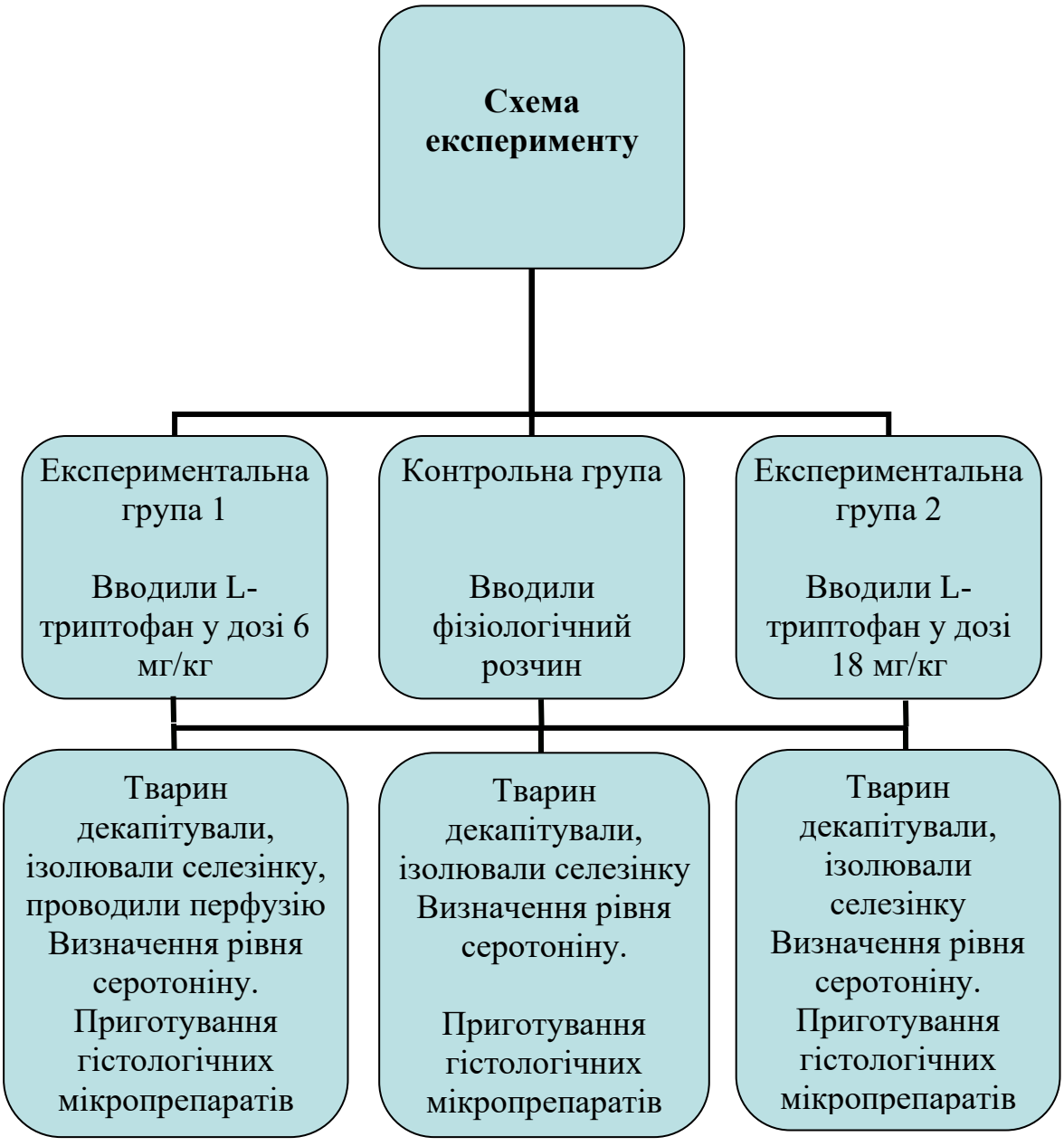


Рис. 2.1. Схема експериментального дослідження

Для того щоб оцінити ефективність препарату, його вводили протягом 8 днів. Потім тварин експериментальної та контрольної групи декапітували. Селезінку витягували, катетеризували у дистальному

напрямку та лігували селезінкову артерію на катетері. Перед проведенням перфузії в ізольований орган вводили 2 мл фізіологічного розчину.

2.3. Проведення перфузії ізольованої селезінки за методом Langendorff

Для досягнення мети дослідження ми застосували методику *Langendorff* для перфузії ізольованого серця, модифікувавши її для роботи з сеоезінкою. Використовуючи методику *Langendorff* [24], можна вести спостереження за ізольованою селезінкою, одночасно виконуючи перфузію селезінкової артерії поживним середовищем.

У лабораторних умовах було виготовлено модифікований апарат для проведення перфузії ізольованої селезінки методом *Langendorff* [26].

Перед проведенням перфузії була проведена велика підготовча робота. У лабораторних умовах було виготовлено модифікований апарат для проведення перфузії ізольованої селезінки методом *Langendorff* [24], а також перфузійний розчин Кребса-Хензеляйта (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Розчин Кребса-Хензеляйта

Склад	Концентрат. г/л	мл/1л	Вміст в моль
NaCl	172,4	40,0	118,0
KCl	35,0	10	4,7
$MgSO_4$ 25%.	амп	0,5	1,2
KH_2PO_4	16,3	10	1,2
$CaCl_2$ 10%	амп.	2,2	2,0
Глюкоза 40%	амп.	2,5	5,5
$NaHCO_3$	51,1	32	25,0
Гепарин		1 мл	

Перфузію ізольованої селезінки тварин експерементальної групи здійснювали перфузійним розчином Кребса (підігрітого до 37°С, рН – 7,35, р – 140-120 мм.рт.ст.) протягом 35 хв із зміною положення.

Отримані дані обробляли за допомогою методів варіаційної непараметричної статистики (підігрівали перфузійний розчин Кребса-Хензеляйта наступного складу (мМ): NaCl – 118,0; KCl – 4,7; $MgSO_4$ (25%) – 1,2;KH_2PO_4 – 1,2; $CaCl_2$ (10%) – 2,0; глюкоза (40%) – 5,5; $NaHCO_3$ – 25,0. до 37^0C, яким проводилася постійна перфузія селезінкових судин, що насичувалася сумішшю кисню з CO_2 з постійним контролем Ph розчину під постійним тиском 60-100 см водного стовпчика).

Селезінка людини і ссавців продовжує працювати і після її вилучення з організму, але лише за певних умов, які нам потрібно було врахувати перед початком перфузії. Серед них були наступні:

1. Постійна перфузія селезінкової артерії та інших судин селезінки під час перфузії розчином Кребса-Хензеляйта, Рінгера-Локка, Тіроде та іншими. Розчин було підібрано експериментальним шляхом за результатом пілотних досліджень і ми зупинилися на розчині Кребса-Хензеляйта як найбільш оптимальному;

2. Температура перфузійного розчину має бути постійною у межах від +37 - 40 °C;

3. Для підтримки окисного метаболізму селезінки необхідно мати достатньо насичений киснем перфузійний розчин. Для підтримки ph рідини через перфузійний розчин продувається не чистий кисень, а його суміш з CO_2. Ph рідини має бути постійним у межах 7,4;

4. Перфузійний розчин повинен подаватися під постійним тиском 60-100 см водного стовпчика.

Після виконання усіх необхідних умов ми розпочали ізоляцію селезінки. Миші не були наркотизовані ефіром, тому що він міг викликати зайві ускладнення у роботі серцевого м’яза та викликати інтоксикацію, яка змінить стан судин селезінки.

Тому було вирішено застосувати цервікальну дислокацію, що не спричиняло токсичний вплив на селезінку як у випадку ефірної

наркотизації. Подальший порядок маніпуляцій із твариною був наступним:

1. Тварину клали у ємкість для операцій (рис 2.2), яка була застелена серветками, що мали вбирати вологу.

Рис 2.2. Препарування миші для вилучення селезінки

2. У зафіксованої миші видалявся шкірний покрив з грудної клітини, після чого з’являвся доступ до черевної порожнини.
3. Розрізається черевна стінка і по грудині розрізається грудна клітина і розсуваються та підіймаються ребра. Таким чином, селезінка стає доступною для маніпуляцій.
4. Після цього вона захоплювалася великим та вказівними пальцями лівої руки і обережно підтягувалася вентрально і вниз, а ножицями перерізали магістральні судини. На селезінці залишали значний відрізок артерії [30 із доповненнями].

Після цервікальної дислокації, видаляли селезінку зі збереженням крупних судин. На селезінці залишали значний відрізок аорти. Після виділення селезінки ми клали її до холодного перфузійного розчину, температура якого складала 2-4 °С та проводили її «масажування» для видалення крові та заміною її на перфузійний розчин. Час маніпуляцій з селезінкою не був більше 3 хвилин з моменту виділення селезінки та до початку перфузії, що є важливою вимогою для збереження властивостей селезінкової артерії [9].

Під час маніпуляцій з тваринами дотримувалися Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 року).

Після припинення скорочень, артерію селезінки захоплювали двома пінцетами і вводили канюлю з перфузійним розчином, яким перевіряли точність її введення, пропускаючи кілька разів через селезінкову артерію той самий перфузійний розчин. Навколо канюлі накладали вільну лігатуру за допомогою шовкової нитки і затягували її так, щоб запобігти перерізанню артерії. Далі канюля кріпилась до штативу перфузійного апарату. Протягом 10 хвилин, після початку перфузії, відбувалася стабілізація роботи ізольованої селезінки. З неї вимивалася залишкова кров, після чого вона доходила до повної нормалізації. Далі вихідний перфузійний розчин ставав дедалі чистішим. Його можна повертати до перфузійної системи і працювати за режимом рециркуляції.

2.4. Методика фарбування зразків гематоксилін-еозином

Приготування гістологічних мікропрепаратів (рис 2.3.). Важливою умовою для отримання якісних гістологічних препаратів є мінімальна травматизація тканини та адекватна її фіксація. Найбільш оптимальна площа шматочків тканини складає 2-3 см, товщина 5-7 мм. Фіксація органів забезпечує стабілізацію тканинних структур та їх ущільнення –

механізм дії фіксаторів ґрунтується на коагуляції білків і стабілізації ліпідів [13].

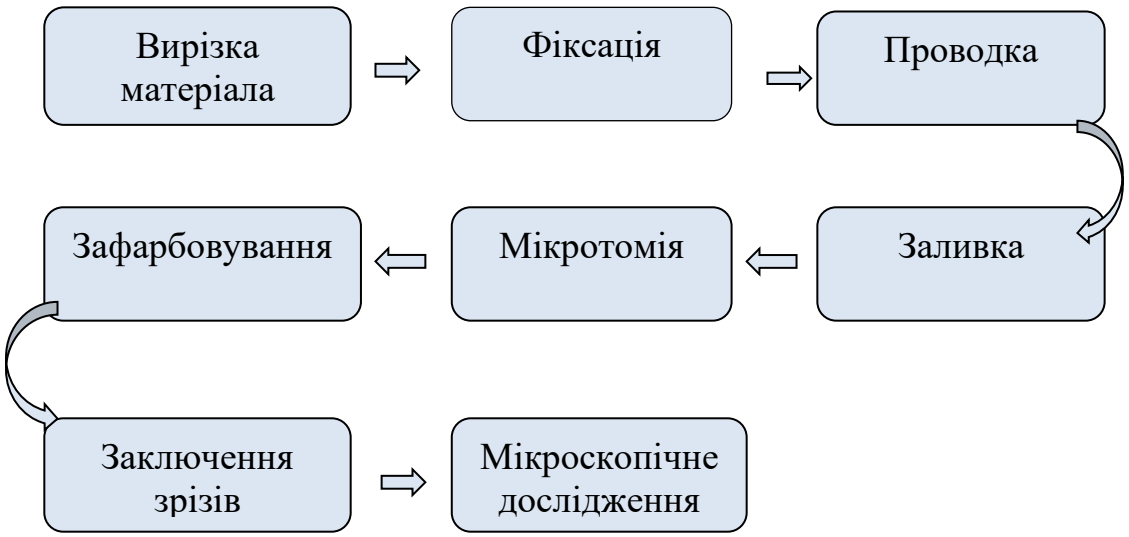


Рис. 2.3. Схема приготування гістологічних мікропрепаратів

Тканини фіксували наступним чином. Із 40% розчину формальдегіду готували нейтральний (забуферений до pH 7,0) 10-12% формалін. Для цього до 40% розчину формаліну додавали карбонат кальцію із розрахунку 100 г на 1 л формаліну. Для отримання 10% нейтрального формаліну через 24 години до 1 частини 40% нейтрального формаліну додавали 9 частин водопровідної води. Тривалість фіксації 24-48 год. при 20 С. Після фіксації, для якої застосовувався формалін, шматочки промивали у проточній воді (12 год).

Перед заливкою матеріалу у парафін, його зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, починаючи з 70%. Використовували послідовність, яка складається з двох порцій 96% і двох – 100% етилового спирту у середньому 48 годин у залежності від якості матеріалу (вміст жиру у тканині) і розміру шматочків.

Для отримання тонких (5-7 мкм) гістологічних зрізів фіксований і промитий матеріал заливали у парафін (рис 2.4.) за схемою Меркулова [22].

Фіксація: Формалін 10% 24 год.

Зневоднення: Спирт 96% I 24 год.

Спирт 96% II 2 год.

Спирт 100% I 24 год.

Спирт 100% II 2 год.

Заливка у парафін: Спирт+ксилол (1:1) 1-3 год.

Ксилол I 1 год.

Ксилол II 1 год.

Ксилол+парафін (1:1 – «каша») 37 С 1-2 год.

Парафін I 56 С 3 год.

Парафін II 56 С 3 год.

Парафін III 56 С 3 год.

Приготування парафінових блоків. Просочені парафіном шматочки тканини викладали у спеціальні формочки і заливали розплавленим у на водяній бані при 60 С парафіном, у який додавали 3% воску. Викладання шматочків у формочки і їх орієнтування швидко виконували теплим пінцетом. Парафін повинен на 3-4 мм виступати над поверхнею блока, якщо його монтують на дерев'яний брусок (рис 2.5.). Вилучення надлишкового парафіну та монтаж блока на дерев'яні бруски здійснювали підігрітим на спиртівці металевим шпателем або скальпеля.

Приготування парафінових зрізів здійснювали за допомогою санного мікротома (рис 2.6.). Зрізи наклеювали на предметне скло безпосередньо з ножа. Для цього їх переносили у чашку Петрі з теплою водою (35-40° С), а потім викладали на предметне скло, яке попередньо знежирювали і натирали білком з гліцерином. Потім зрізи просушували у термостаті при температурі 37 С впродовж 6-12 год.

Рис 2.4. Заливка промитого матеріалу у парафін

Рис 2.5. Монтування парафінових блоків на дерев’яні бруски

Рис 2.6. Приготування парафінових зрізів за допомогою санного мікротома

Парафінові зрізи перед забарвленням вивільняли від парафіну (рис.2.7.) за допомогою розчинника (ксилол) за схемою:

Ксилол I	10-15 хв.
Ксилол II	3-5 хв.
Спирт 100% I	1-2 хв.
Спирт 100% II	ополоснути.
Спирт 96% I	ополоснути.
Спирт 96% II	ополоснути.
Дистильована вода 2 зміни	ополоснути.

Депарафіновані зрізи готові до забарвлення, після короткочасного просушування на повітрі [15].

Рис 2.7. Депарафінування зрізів

Зафарбовування. Фарбували гематоксилін-еозином за схемою:

Фіксація в суміші Нікіфорова	15 хв.
Спирт етиловий 70^0	2-3 хв.
Спирт етиловий 50^0	2-3 хв.
Дистильована вода	1 хв.
Фарба гематоксиліну (по Ерліху)	7-20 хв.
Водопровідна вода	3 хв.
Наносять 1% розчин HCl у 70^0 спирті	1 с (до побуріння препарату)
Висушити	
Спирт етиловий 70^0	1 хв.
Спирт етиловий 90^0	1 хв.
Спирт етиловий 96^0	1хв.
1% спиртовий розчин еозину	1-2 хв.
Спирт етиловий 96^0	10-20 с.

Заключення зрізів (рис 2.8.). Для цього використовували канадський бальзам [20].

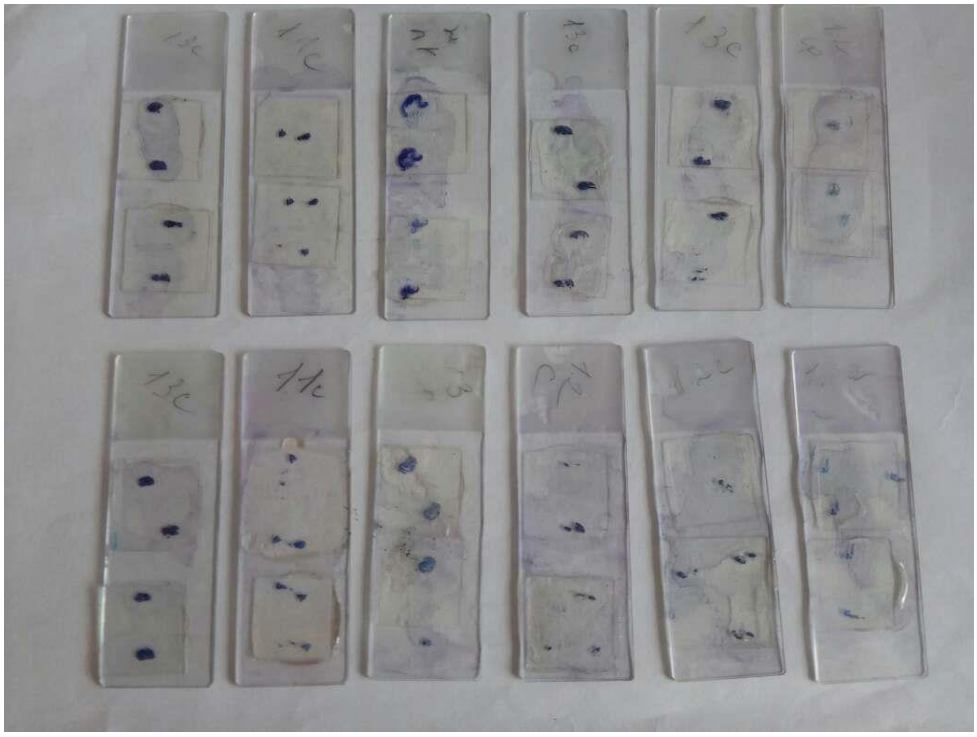


Рис 2.8. Зрізи, заключені в канадський бальзам

Подібна процедура необхідна для того, що захистити препарати від механічних пошкоджень та уникнути контакту з атмосферним повітрям (окиснення барвників).

2.5. Методика визначення серотоніну у сироватці крові

Даний спосіб дозволяє визначити серотонін в одній пробі біологічного матеріалу, здобуття якого не потребує інвазивних методів (слина, сеча, сльоза).

Спосіб здійснюють таким чином:

Серотонін екстрагують соляною кислотою та діетиловим ефіром. До ефірного екстракту додають соляну кислоту та після центрифугування в кислій фазі визначають серотонін з реакції з нингідрином, а в етиловій

фракції можна визначати мелатонін з реакції з ортофталевим ангідридом. Кількісне визначення мелатоніну та серотоніну проводять спектрофлюорометрично.

Приклад. До 0.1 мл сироватки, сечі або гомогенату тканини добавлять 3.0 мл бідистильованої води та 0.5 мл ефіру, струшують 5 хвилин (операцію проводять тричі).

Визначення серотоніну відбувалось наступним чином:

До отриманого розчину добавляють 2 мл 0.5М фосфатного буферу (pH 7.0) та струшують 5 хв.

Центрифугують 5 хв при 1000 об/хв. Водну фазу кількісно відбирають.

До ефірного екстракту добавляють 3.0 мл 0.1н HCl та струшують 5 хв та відбирають кислу фазу.

В кислій фазі визначають серотонін, завдяки додаванню 1.0 мл кислої фази та 1.0 мл 0.1М фосфатного буферу (pH 8.0) і 0.2 мл 0.1 М нингідрину.

Інкубують 30 хв. при 75°С, охолоджують.

Через 1 годину спектрофлюорометрують при хвилі збудження 360 нм та хвилі флюоресценції 480 нм [60].

2.6. Цитоморфологічне дослідження

Всі світлини зроблено в програмі ImageJ.

ImageJ (Image Processing and Data Analysis in Java) - програма спеціально розроблена для аналізу медичних і біологічних зображень.

Компанія по розробці ImageJ ініційована автором *Wayne Rasband в Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.*

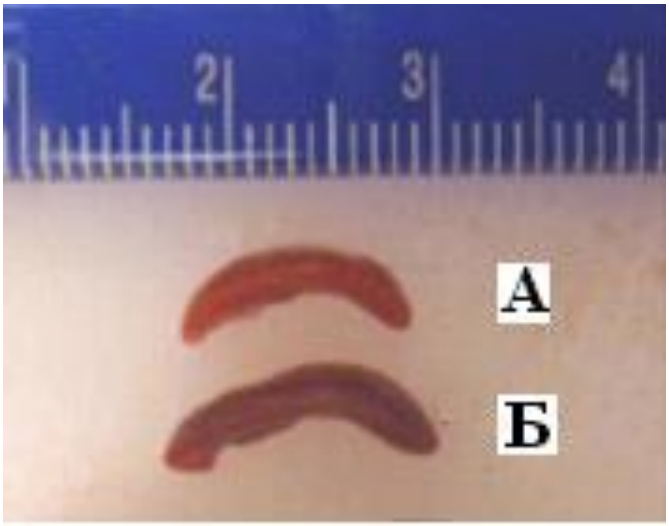
Для мікроскопічного опису препаратів ми керувалися такою схемою:

1. Стан капсули селезінки: не потовщена / потовщена / в стані лізису.
2. Селезінка не має / має чіткий поділ на червону та білу пульпи.
3. Багато / відсутні кровоносні судини.
4. Тканина густо заповнена лімфоцитами / взагалі не заповнена.
5. Присутні периартеріальні муфти з нерівномірним заселенням їх лімфоцитами.
6. Маргінальні зони та фолікули відсутні / присутні / не сформовані.
7. Наявність лімфоїдних вузлів.
8. Стан кровонаповнення червоної пульпи: дифузне / помірне кровонаповнення / слабке кровонаповнення знекровлення / вогнищеві крововиливи.
9. Кількість еритроцитів у червоній пульпі: немає / помірна / велика.
10. Відбувається чи ні проліферація лімфоцитів (особливо вона виражена під капсулою діафрагмальної поверхні селезінки).
11. Розташування лімфоцитів: ланцюжками / окремо
12. Стан білої пульпи: присутні / відсутні периартеріальні лімфоїдні муфти та лімфодні вузлики.
13. Стан лімфоїдних фолікулів: середньої величини / зменшені / в стані атрофії / збільшені і зливаються один з одним.
14. Присутні чи ні трабекулярні судини (артерії та вени).

РОЗДІЛ 3.
АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Біометричні показники селезінки експериментальних тварин

Було проведене дослідження деяких біометричних показників (вага, довжина, ширина, товщина) селезінок тварин, що перорально отримували L- триптофан у різних концентраціях та тварин контрольної групи (рис. 3.1).



3.1. Лінійні розміри селезінки експериментальних мишей

Примітки: А – селезінка миші контрольної групи; Б – селезінка миші, що перорально отримувала L- триптофан у концентрації 18 мг/кг

Протягом дослідження було з’ясовано, що в результаті впливу ендогенного серотоніну, індукованого надлишком триптофану збільшилися лінійні розміри селезінок та відповідно їх вага (табл. 3.1). Згідно з схеми експериментального дослідження тривале пероральне введення L- триптофану у концентрації 6 мг/кг отримували тільки миші експериментальної групи №1, що зумовило зміни лінійних розмірів досліджуваного органу. У експериментальної групи №2, яка перорально

отримувала L- триптофан у концентрації 18 мг/кг, лінійні розміри та вага селезінок значно відрізнялися від аналогічних показників контрольної групи та експериментальної групи №1, яка отримувала L-триптофан у нижчій концентрації.

Таблиця 3.1

Середньостатистичні біометричні показники селезінок експериментальних мишей

Група	Вага тварини, г	Вага селезінки, г	Розміри селезінки, мм		
			Довжина	Ширина	Товщина
Група, що отримувала - триптофан у концентрації 6 мг/кг	26,6±0,9	0,1±0,01*	14±0,5*	3,7±0,1	3,2±0,09
Група, що отримувала - триптофан у концентрації 18 мг/кг	26,2±0,8	0,19±0,01*	20±0,5*	5±0,1*	3,9±0,1*
Контрольна група, яка отримувала фізіологічний розчин	26,7±1,05	0,08±0,01	13±0,5	3±0,1	2,9±0,1

Примітка: * - достовірність відмінностей між показниками контрольної та експериментальних груп, при $p<0,05$

Було з’ясовано, що у мишей, які отримували триптофан у концентрації 6 мг/кг та 18 мг/кг показники ваги тварини не відрізнялися від ваги мишей контрольної групи (відповідно, 26.7 мг/кг, 26,6 мг/кг та 26.2 мг/кг).

Отже, ендогенний серотонін, індукований уведенням надлишкових доз триптофану не є фактором, який впливає на обмінні процеси та збільшує вагу тварини.

Показники ваги селезінки показали достовірні зміни, які виникли протягом експерименту. Так, вага селезінки мишей контрольної групи складала 0.08 г. У мишей, які отримували триптофан у концентрації 6 мг/кг вага селезінки в середньому складала 0.1 г, що на 20 % більше ніж у контрольної групи. У мишей, які отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг вага селезінки збільшилась сильніше і в середньому складала 0.19 г, що на 137 % більше ніж у контрольної групи. Порівнюючи показники ваги органа у мишей експериментальних груп з'ясовано, що приріст ваги у мишей, що отримували більшу концентрацію триптофану (а відповідно і більшу концентрацію серотоніну) склав 90 %.

Такі результати зміни маси органа можливі у двох випадках: за рахунок збільшення кількості зрілих клітин із органу та за рахунок притоку периферичної крові для забезпечення трофіки клітин. Також, можна стверджувати, що вплив серотоніну індукованого надлишком триптофану має дозозалежний характер.

Одночасно із вимірами ваги, ми визначили лінійні розміри селезінок, а саме їх довжину, ширину та товщину. З'ясовано, що разом із збільшенням ваги логічно змінювались лінійні розміри. Контрольна група мала довжину селезінок у середньому 13 мм, ширину 3 мм і товщину 2.9 мм. У мишей, які отримували триптофан у концентрації 6 мг/кг достовірно збільшилась довжина селезінки (14 мм), що на 8 % більше, ніж у контрольній групі. У мишей, які отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг довжина селезінки склала 20 мм, що на 54 % більше, ніж у контрольній групі.

Ширина селезінок також змінювалась, хоча зміни були не настільки помітними як у випадку довжини. У мишей, які отримували триптофан у концентрації 6 мг/кг приріст ширини склав 23 %, а у мишей, які отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг - 33 %. Порівнюючи ширину селезінок мишей експериментальних груп з'ясовано, що приріст

склав 8 %.

Товщина селезінок в ході експерименту також змінювалась. Ми зафіксували, що у контрольній групі вона складала 2.9 мм. У мишей, які отримували триптофан у концентрації 6 мг/кг приріст товщини склав 10 %, а у мишей, які отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг – 34 %. Порівнюючи товщину селезінок мишей експериментальних груп з'ясовано, що приріст склав 22 %.

Гістограми розмірів селезінок представлено на рис. 3.2.

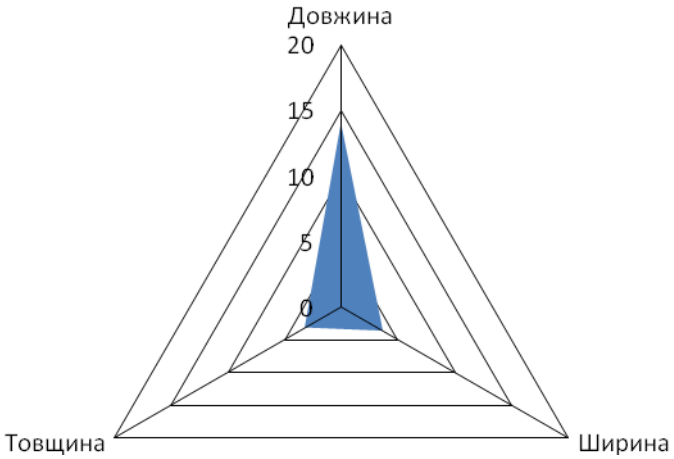
Приріст лінійних розмірів селезінок в процесі експериментального дослідження, ми вважаємо досить закономірним, адже збільшення ваги органа не може не відобразитись на його розмірах. Тож, збільшення кровонаповнення селезінок у результаті впливу ендогенного серотоніну, індукованого екзогенним триптофаном є фактором, який достовірно збільшує лінійні розміри досліджуваного органу. Вплив серотоніну індукованого триптофаном має дозозалежний характер.

Також, ми розрахували ваговий показник, який характеризує відношення ваги органа до ваги тіла (рис. 3.2).

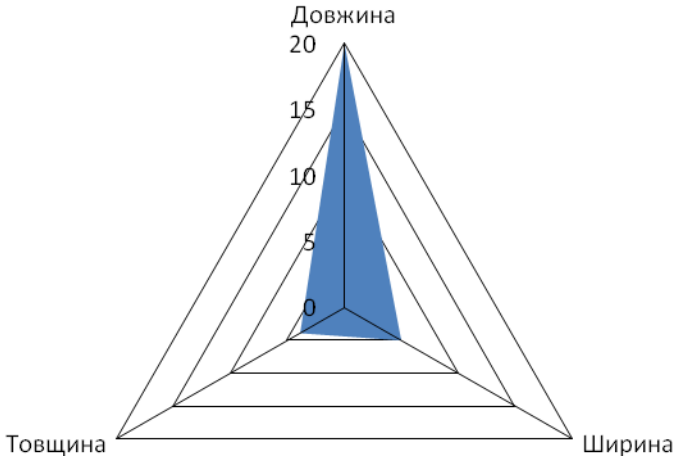
Такий показник розраховується для того, щоб довести, що зміни ваги органа не є наслідком загальної зміни ваги досліджуваної тварини, а є наслідком експериментальних впливів.

Отримані результати були такими: ваговий індекс селезінки мишей контрольної групи склав 0.002. Оскільки, ми не зафіксували достовірного зростання ваги тіла у мишей експериментальних груп, то показники вагового індексу у цих групах достовірно змінилися.

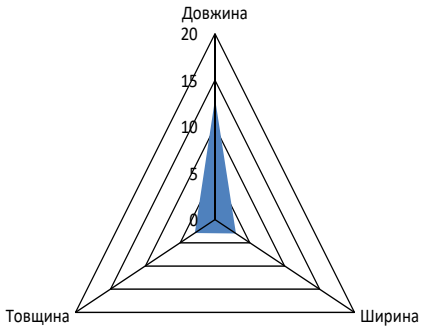
Так, у групі мишей, які отримували триптофан у концентрації 6 мг/кг ваговий індекс збільшився до 0.004, а у мишей, які отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг він зріз до 0.007. Відповідно, зростання склало 100 % та 250 %. Порівнюючи між собою показники експериментальних груп, таке зростання склало 75 %.



Інтактні



18 мг/кг



6 мг/кг

Рис. 3.2. Лінійні розміри селезінок досліджуваних тварин

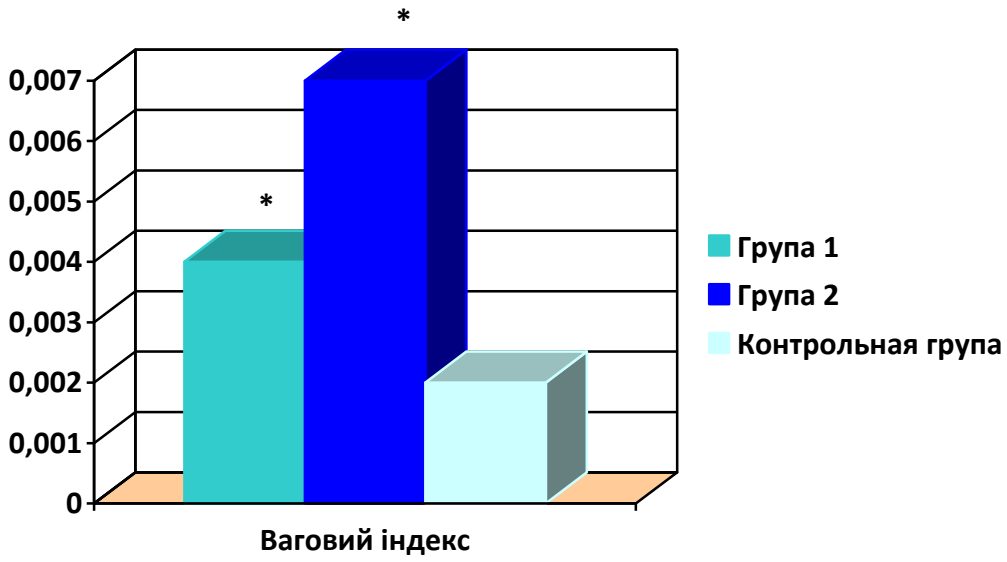


Рис. 3.3. Ваговий індекс селезінки експериментальних мишей в умовах дії ендогенного серотоніну, індукованого надлишком триптофану

Примітка: Група 1 - Група, що отримувала - триптофан у концентрації 6 мг/кг; Група 2 - Група, що отримувала - триптофан у концентрації 18 мг/кг;

* - достовірність відмінностей між показниками групи 1, групи 2 з контрольною групою;

- достовірність відмінностей між показниками групи 1 та групи 2; при $p<0,05$

Отже, з наведеної діаграми можна бачити, що зміни вагового індексу зумовлені змінами саме органу, а не власне ваги тварини та залежить від концентрації біологічно активної речовини, яка уводилась тваринам.

Тож, ми припускаємо, що ендогенний серотонін, індукований надлишком триптофану, впливаючи на тонус судин, збільшує кровонаповнення та вагу селезінок досліджуваних тварин, а такий вплив має дозозалежний характер.

3.2. Вміст ендогенного серотоніну у досліджуваних тварин

Згідно мети кваліфікаційної роботи, нам було необхідно виявити ефекти впливу серотоніну на цитоморфологічну організацію селезінки. Оскільки, препарати серотоніну не є доступними, ми індукували вироблення серотоніну надлишковим пероральним уведенням L-триптофану.

Щоб переконатися, що вживаний триптофан є попередником та дійсно стимулює синтез ендогенного серотоніну, ми провели визначення рівня серотоніну у периферичній крові інтактних тварин, та тваринн, які отримували різні дози триптофану.

Отримані результати представлено на рис.3.

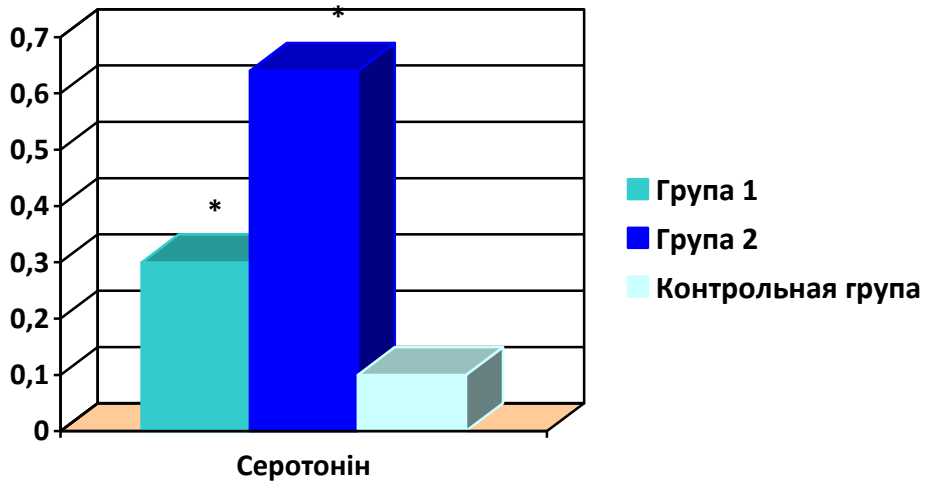


Рис 3.4. Вміст серотоніну у периферичній крові експериментальних мишей в умовах дії ендогенного серотоніну, індукованого надлишком триптофану, мкг/мл

Примітка: Група 1 - Група, що отримувала - триптофан у концентрації 6 мг/кг; Група 2 - Група, що отримувала - триптофан у концентрації 18 мг/кг;

* - достовірність відмінностей між показниками групи 1, групи 2 з контрольною групою;

- достовірність відмінностей між показниками групи 1 та групи 2; при $p<0,05$

З’ясовано, що у інтактних тварин вміст ендогенного серотоніну не змінився та складав 0.1±0,02 мкг/мл.

У тварин, які отримували триптофан у концентрації 6 мг/кг вміст ендогенного серотоніну зріс та складав 0.3±0,04 мкг/мл. Приріст вмісту серотоніну склав 200%.

У тварин, що отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг вміст ендогенного серотоніну зріс та складав 0.64±0,09 мкг/мл. Приріст вмісту серотоніну склав 540%.

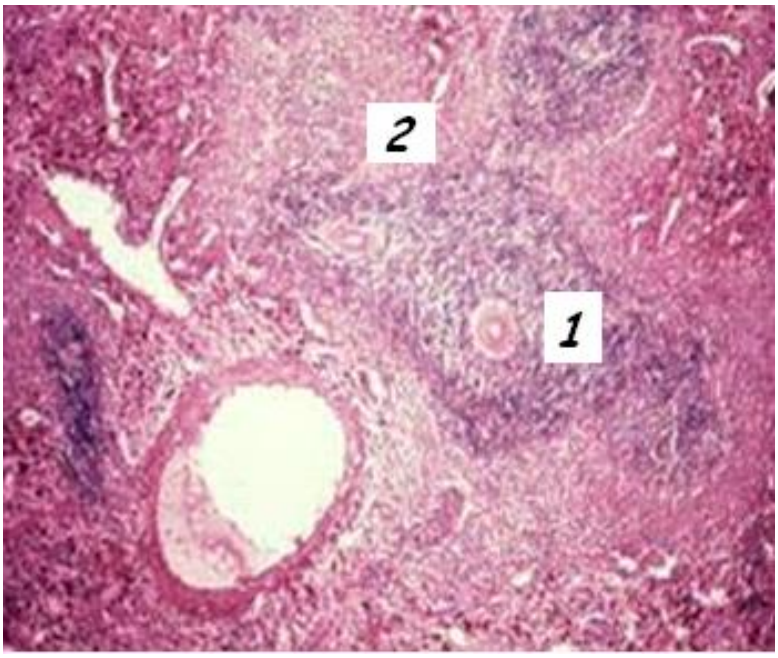
Отже, уведення триптофану як стимулятора синтезу ендогенного серотоніну є виправданим та може слугувати моделлю для вивчення впливу серотоніну на системи та органи.

3.3. Цитоморфологічна будова селезінки мишей досліджуваних груп

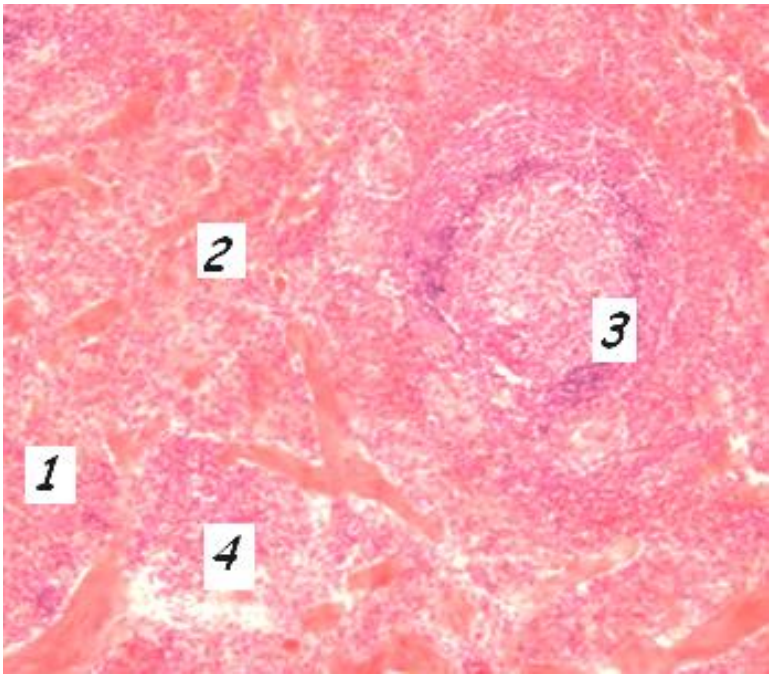
У контрольній групі гістологічна будова селезінки відповідала нормі (рис. 3.5. А та Б).

Капсула селезінки має рівні краї, без потовщень. Наявний чіткий поділ на білу та червону пульпи. Стан білої та червоної пульпи відповідає нормі. Селезінка мала тонку сполучнотканинну капсулу, з трабекулами, які від неї відходять. Ретикулярна тканина, що утворює строму червоної і білої пульпи, складалася з ретикулярних клітин, волокон і фібробластів. Біла пульпа була представлена сукупністю лімфоїдних периартеріальних муфт і лімфоїдних фолікулів правильної округлої форми. Периартеріальні муфти рівномірно заселені лімфоцитами. Кровонаповнення червоної пульпи дифузне, без вогнищевих крововиливів. Червона пульпа добре заселена еритроцитами. Розміри та стан лімфоїдних фолікулів відповідають нормі. У фолікулах добре видно всі зони: світлу, периартеріальну та мантійну зони. Добре видно трабекулярні судини.

Ми провели гістологічне обстеження селезінок мишей, які перорально отримували L – триптофан у різних концентраціях.



А



Б

Рис. 3.5. Будова селезінки інтактних мишей (гематоксилін-еозин)

Примітки: 1- трабекула; 2 - червона пульпа; 3 - лімфоїдний вузлик (біла пульпа); 4 – трабекулярна артерія.

На препаратах тварин, які отримували L-триптофан у концентрації 6 мг/кг ми побачили нерівні краї селезінки (рис. 3.6.). Паренхіма органу, а саме ретикулярна тканина неоднорідна, має помітні розриви. Ядра ретикулярних клітин видовжені. Наявний чіткий поділ на червону та білу пульпи. Червона пульпа розріджена, еритроцити в червоній пульпі розташовані ланцюжками. Біла пульпа представлена лімфатичними фолікулами, в якому відсутня мантійна зона.

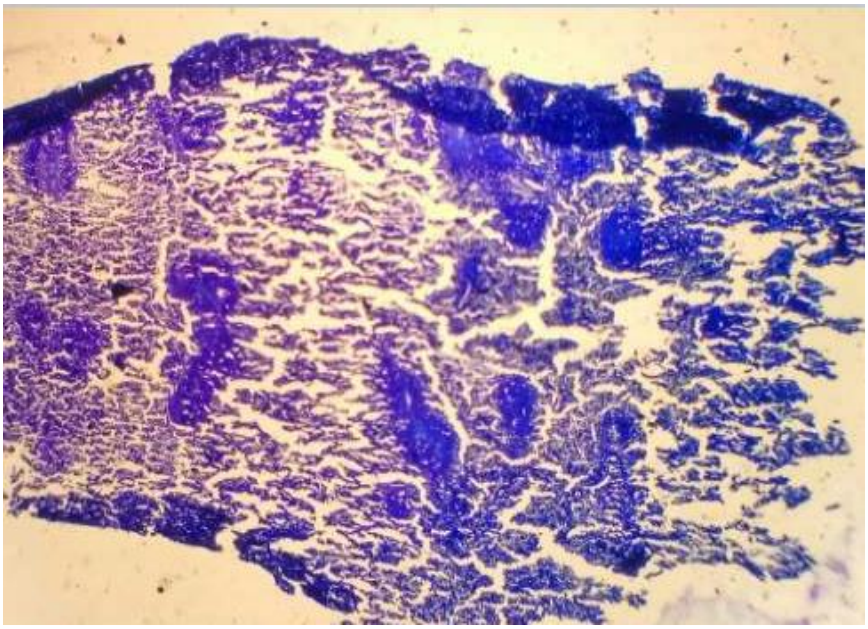


Рис. 3.6. Гістологічна будова селезінки тварин, які отримували L -триптофан у концентраціх 6 мг/кг(гематоксилін-еозин)

Також було проведено дослідження гістологічної будови селезінки у тварин, які отримували L – триптофан у концентрації 18 мг/кг. Ми аналізували будову селезінки на малому (рис. 3.7.) та великому збільшенні (рис. 3.8.). Показано, що сполучнотканинна капсула має не рівні краї, паренхіма селезінки має також великі розриви, які не можуть бути пояснені технічними помилками. Біла пульпа не має суттєвих змін, а в червоній пульпі еритроцити розташовані ланцюжками, підвищена кількість лейкоцитів (а саме еозинофілів та гранулоцитів) , біла пульпа відокремлена від червоної пульпи.

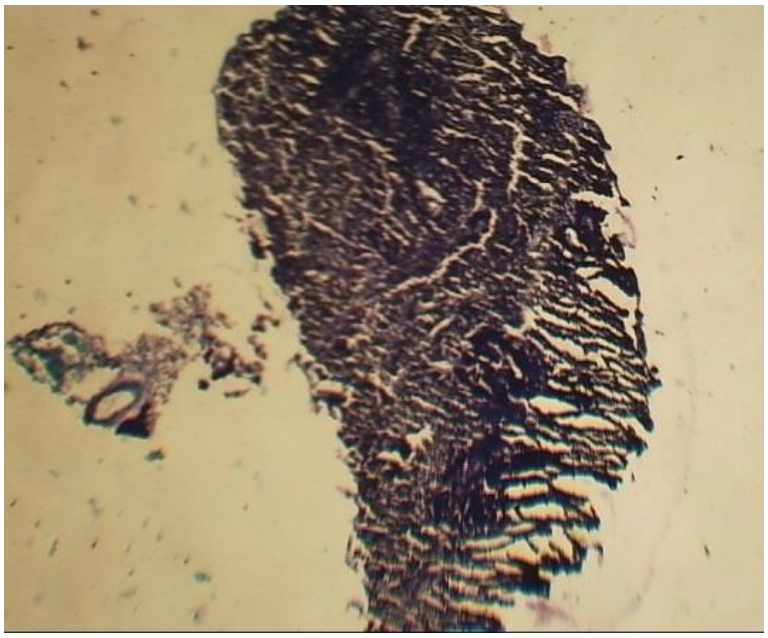


Рис. 3.7. Гістологічна будова селезінки тварин, які отримували L -триптофан у концентраціх 18 мг/кг на малому збільшенні (гематоксилін-еозин)

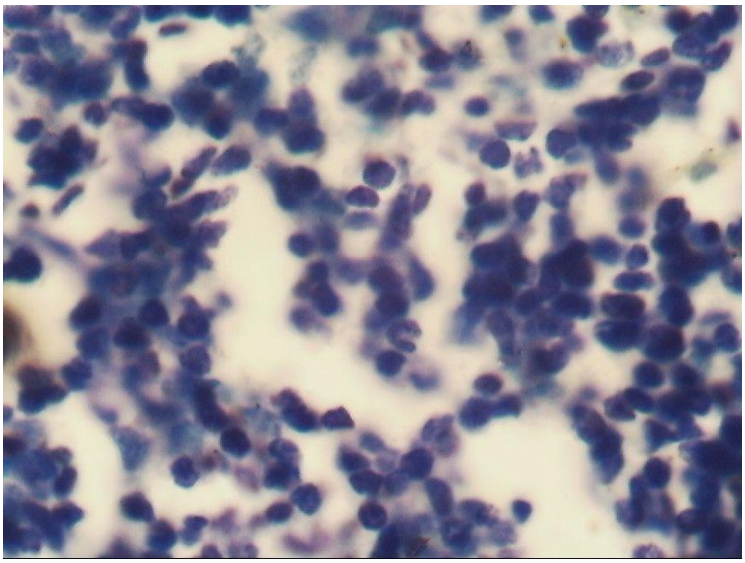
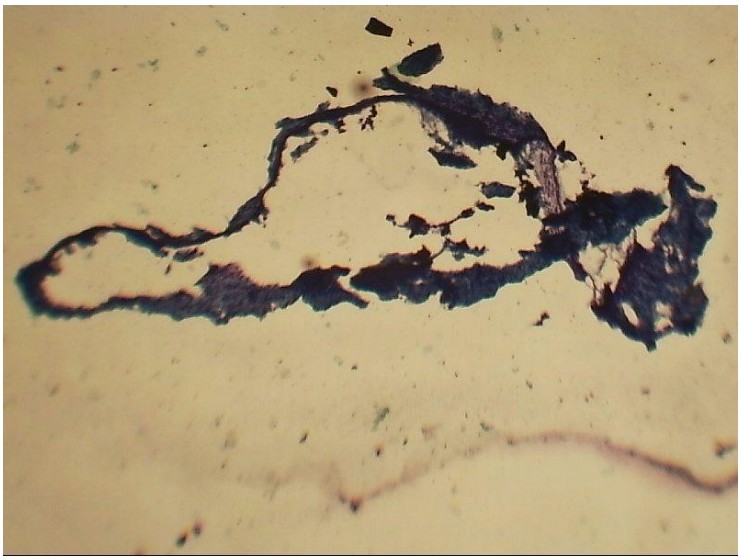


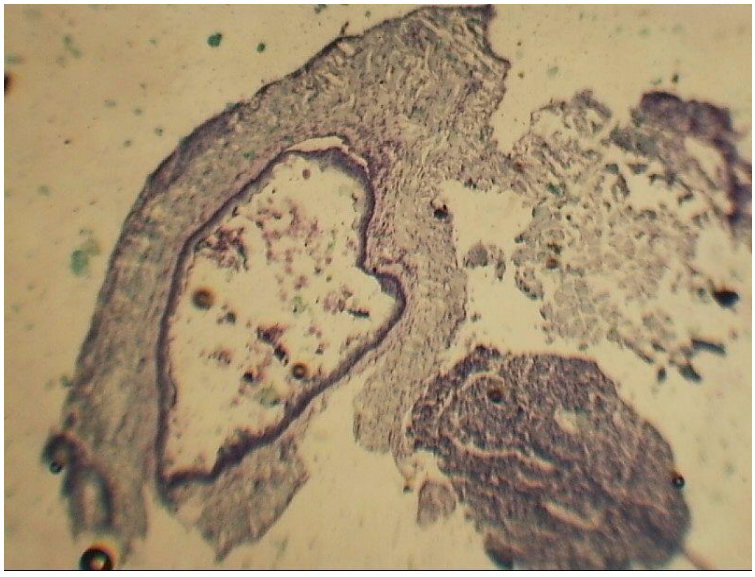
Рис. 3.8. Клітини селезінки тварин, які отримували L -триптофан у концентраціх 18 мг/кг на великому збільшенні гематоксилін-еозин)

Для додаткового уточнення впливу серотоніну на системи та органи також ми порівняли гістологічну будову аорти у тварин, які отримували триптофан у різних концентраціях (рис. 3.9.).

Ми побачили, що у тварин, які отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг середня еластична оболонка аорти набагато збільшена. Ядра клітин збільшені та видовжені, просвіт судини звужений, порівняно з інтактними тваринами.



А



Б

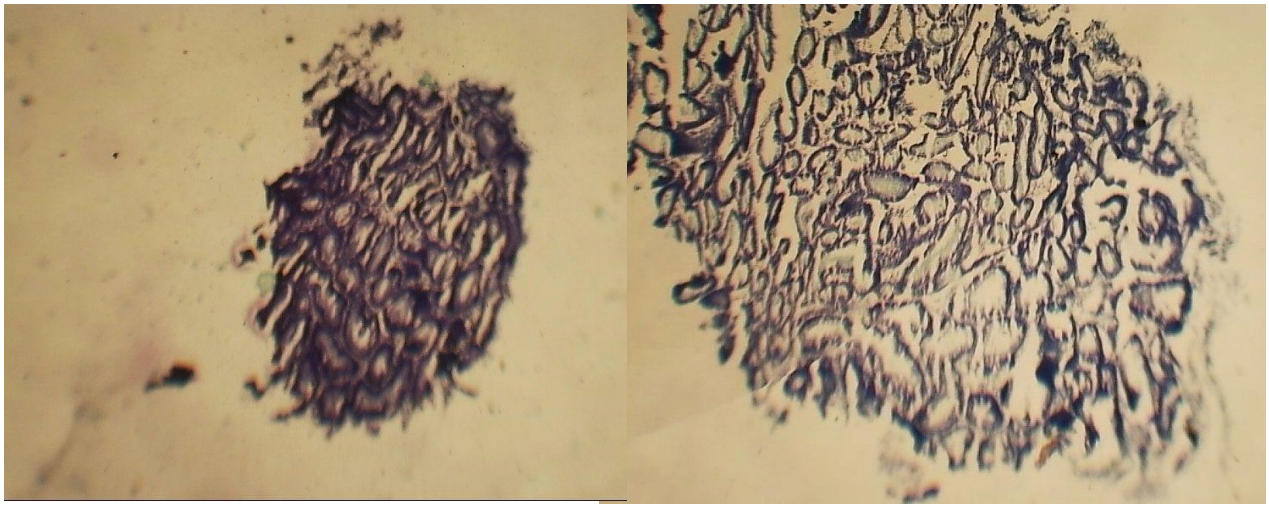
Рис. 3.9. Гістологічна будова аорти досліджуваних тварин (гематоксилін-еозин)

Примітки: А - група, що отримувала - триптофан у концентрації 6 мг/кг; Б - група, що отримувала - триптофан у концентрації 18 мг/кг

Для мікроскопічного опису препаратів лімфатичного вузла ми керувалися такою схемою:

1. Стан купсули : не потовщена / потовщена / в стані лізису.
2. Трабекули: потовщені, відсутні.
3. Стан паренхіми органа: наявні / відсутні лімфоцити.
4. Стан коркової речовини: наявність/ відсутність лімфоїдних фолікулів.
5. Наявність/ відсутність зон в лімфоїдному фолікулі.
6. Стан мозкової речовини: сформовані / відсутні мозкові тяжі.

У мишей, які отримували L-триптофан у концентрації 6 мг/кг ми побачили такі зміни: лімфатичний вузол покритий тонкою капсулою. В корковій речовині присутні округлі утворення – лімфоїдні фолікули. Мозкова речовина не виражена. Мозкові тяжі відповідно не сформовані. Паракортикальна зона присутня (рис. 3.10.).

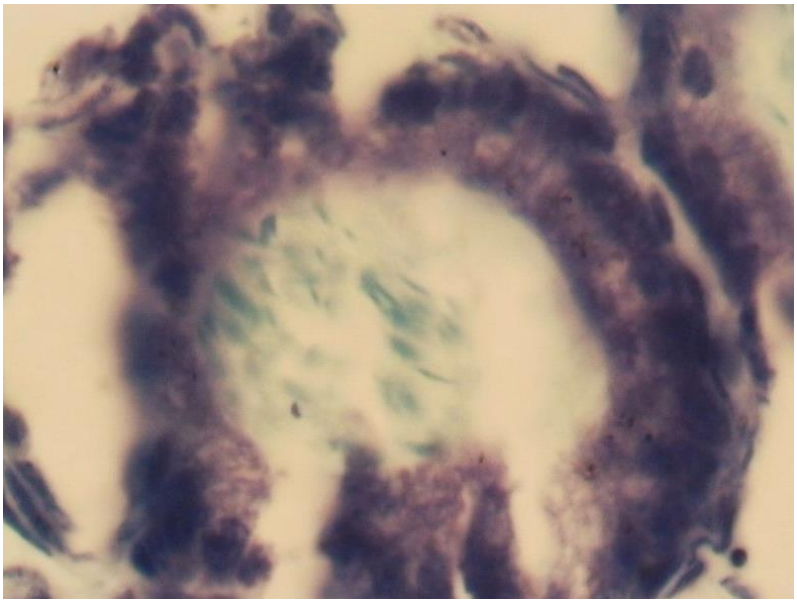


А Б

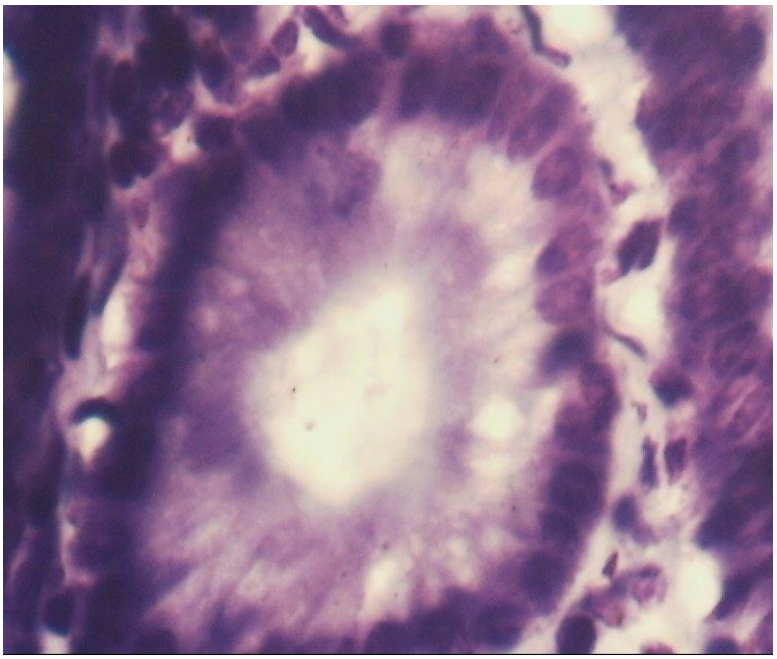
Рис. 3.10. Гістологічна будова лімфатичного вузла досліджуваних тварин на малому збільшенні (гематоксилін-еозин)

Примітки: А- група, що отримувала - триптофан у концентрації 6 мг/кг; Б - група, що отримувала - триптофан у концентрації 18 мг/кг

У мишей, які отримували L-триптофан у концентрації 18 мг/кг коркова речовина лімфатичного вузла має розриви, округлі утворення - лімфатичні фолікули дифузно розташовані, пара кортикальна зона погано виражена, у мозкові тяжі у мозковій речовини розташовані не по центру (рис. 3.11.).



А



Б

Рис. 3.11. Гістологічна будова лімфатичного вузла досліджуваних тварин на великому збільшенні (гематоксилін-еозин)

Примітки: А- група, що отримувала - триптофан у концентрації 6 мг/кг; Б група, що отримувала - триптофан у концентрації 18 мг/кг

Отже, проведене дослідження показало, що серотонін є фактором, що впливає на стан лімфоїдних органів (селезінка та лімфатичні вузли), збільшуючи кровонаповнення та лінійні розміри вище зазначених органів. Також ми відмітили, що ендогенний серотонін індукований триптофаном має вплив на судинну стінку (аорта), роблячи її більш товстою. Тож, можливим напрямком подальших досліджень буде вивчення впливу серотоніну на судинну стінку.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено модель для дослідження впливу ендогенного серотоніну на лімфоїдні органи. Секреція серотоніну була стимульована тривалим пероральним уведенням піддослідним тваринам надлишкової кількості амінокислоти триптофану, який є попередником для синтезу ендогенного серотоніну.
2. Для досягнення мети дослідження та підтвердження гіпотези про вплив ендогенного серотоніну, індукованого триптофаном на стан лімфоїдних органів і, зокрема, селезінки ми модифікували методику перфузії ізольованого серця за методом Langendorff для ізольованої селезінки миші. Також була проведена апробація даного метода відповідно мети та завдань кваліфікаційної роботи.
3. Визначити рівень серотоніну в сироватці крові досліджуваних тварин та з’ясували, що у тварин, які отримували, триптофан у концентрації 6 мг/кг приріст вмісту серотоніну склав 200%, а у тварин, які отримували триптофан у концентрації 18 мг/кг приріст вмісту серотоніну склав 540%.
4. З’ясували, що у результаті впливу ендогенного серотоніну, індукованого екзогенним триптофаном у мишей експериментальних груп, що отримували більшу концентрацію триптофану (а відповідно і більшу концентрацію серотоніну) приріст ваги склав 90 %, а приріст вагового індексу склав 75 %. Припускаємо, що ендогенний серотонін, індукований надлишком триптофану, впливаючи на тонус судин, збільшує кровонаповнення та відповідно морфометричні параметри селезінок досліджуваних тварин, такий вплив має дозозалежний характер.
5. В результаті дослідження мікропрепаратів, з’ясовано, що існує виражений вплив ендогенного серотоніну, індукованого

надлишком триптофану на цитоморфологічну організацію селезінки. З’ясували, що тривале введення триптофану збільшує кількість клітин та кровонаповнення селезінки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бибик Е. Ю. Изменения морфометрических показателей селезенки после длительного избыточного потребления пальмового масла и фармакокоррекции мелатонином / Е. Ю. Бибик, Н. В.Шипилова // Медицинский альманах. - 2017. - N 14(4). - С. 144-146.
2. Вишневская Т.Я. Селезенка собаки и ее артерии / Т. Я. Вишневская, С.Т. Ильгеев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета - 2004. - N 4. - С. 150-151.
3. Галеева Э. Н. Особенности анатомии и топографии селезенки человека в раннем плодном периоде онтогенеза [Текст] / Э. Н. Галеева, Л. М. Железнов // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. - N 2. - С. 278-282.
4. Горячева А. А. Воздействие экзогенного серотонина на системные реакции живого организма// А. А. Горячева, В. Н. Морозов, Е. М. Пальцева [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. - 2007. - №3. - С. 28-30.
5. Досаев Т. М. Сравнительная анатомия перифолликулярной и маргинальной зоны селезенки человека и крысы / Т. М. Досаев, С. Н. Романюк, А. А. Балапанова // Клініч. та эксперим. патологія. - 2014. - Том13, N1. - С. 30-32.
6. Зайцев В. Б. Морфометрические особенности структуры селезенки человека / В. Б.Зайцев, Н. С.Федорская, Л. М.Железнов // Вестник новых медицинских технологий. – 2018 – Т. 25, № 3. – С. 153–159.
7. Зайцев В. Б. Морфофункциональные характеристики селезенки человека/ В. Б. Зайцев, Н. С. Федоровская, Д. А. Дьяконов, А. М. Федоровский, Е. В. Коледаева, Л. В. Дорох, И. Н. Гамулинская // Вятский медицинский вестник. – 2011.- № 3-4. - С.3-6.

8. Зайченко Г. В. Серотонін: від нейромедіатору до лікарського засобу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова // Вісник проблем біології і медицини. - 2017. - Вип. 3(1). - С. 49-56.
9. Западнюк П. И. Лабораторные животные, Разведение, содержание, использование в эксперименте: учебное пособие [Текст] / И.П. Западнюк, И. В. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк – 3-е изд. перераб. и доп. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.
10. Золотухин М. М. Эффекты триптофана, вводимого в темновую фазу, на содержание метаболитов гидроксилазного пути обмела триптофана в плазме крови и в головном мозге крыс / М. М. Золотухин, Е. М. Дорошенко, В. Ю. Смирнов // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2008. - № 3. - С.57-61.
11. Кащенко С. А. Особенности гистологического строения белой пульпы селезенки крыс в разные периоды постнатального онтогенеза в условиях экспериментальной иммуносупресии / С. А. Кащенко, И. В. Бобрышева // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2014. - № 1(45). - С.51-54.
12. Ковалев И. А. Эндотелийзависимая вазодилатация и вазоконстрикция у больных ИБС и у лиц с отягощенной по атеросклерозу наследственностью / И. А. Ковалев, Г. И. Марцинкевич // Бюл. СО РАМН. - 2006. - № 2. - С. 86-92.
13. Коржевский Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э.Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
14. Кузнецов С. Л. Атлас по гистологии, цитологии эмбриологии / С. Л. Кузнецов, Н. Н. Мушкамбаров, В. Л.Горячкина - М.: Медицинское информационное агентство, 2002. – 374.с.
15. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М.:Мир, 1969. - 643 с.

16. Лычкова А. Э. Пролактин и серотонин / А. Э. Лычкова, А. М. Пузиков // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. - №69(1-2). – С. 38-45.
17. Майстер А. Биохимия аминокислот / А. Майстер; пер. с англ.: Г. Я. Виленкина [и др.]; под ред. и с предисл. А. Е. Браунштейн . – М. : Иностр. лит., 1961. – 530 с.
18. Макалиш Т. П. Морфофункциональные особенности селезенки при воздействии на организм факторов различного ґенеза / Т. П. Макалиш // Таврический медико-биологический вестн. - 2013. - Т. 16, № 1. - С. 265-269.
19. Макурина Г.И. Клиническое значение нарушения обмена серотонина у пациентов с псориатической болезнью / Г.И.Макурина // Дерматологія та венерологія.- 2016. - № 1 (71) – С. 34-42.
20. Манько В. В. Основи техніки лабораторних робіт у фізіологічних дослідженнях.[навчальний посібник]/ М.О. Гальків, М.Ю Клевець – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2005. – 133 с.
21. Маркова Е. Ю. Перспективы применения селективных блокаторов серотониновых 5-НТ2-рецепторов в офтальмологии / Е. Ю. Маркова, Е. Г. Полунина, В. В. Куренков, М. Л. Гадаева // Офтальмология: ежеквартальный научно-практический журнал. - 2015. – Т. 12, № 1. - С. 76-82.
22. Меркулов Г. А. Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов Третье издание. — Л.: Медгиз, 1956. — 263 с.
23. Меркулова Л. М. Морфологические изменения селезенки в условиях экспериментального канцерогенеза / Л. М. Меркулова, Г. Ю. Стручко, О. М. Арлашкина, М. Н. Михайлова // Acta medica Eurasica. - 2016. - № 3. - С. 54-58.
24. Минасян С. М. Методика перфузии изолированного сердца крысы / С. М. Минасян, М. М. Галагудза, Д. Л. Сонин, Е. А. Боброва //

Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2009. - Т.8 №4(32). - С. 54-59.

25. Минигазимов Р. С. Рельеф поверхности брюшины, покрывающей селезенку / Р. С. Минигазимов, В. Ш. Вагапова // Медицинский вестник Башкортостана. - 2011. - № 4. - С. 100-104.
26. Модель работающего сердца [Электронный ресурс]: осмотр деятельности – Режим доступа: http://neurobotics.ru/assets/downloads/Working_Heart_Rus.pdf. – Название с экрана.
27. Моталов В. Г. Некоторые структурно - функциональные характеристики белой пульпы селезенки у детей / В. Г. Моталов // Журнал: «Российский медико-биологический вестник» имени академика И. П. Павлова. – 2001. - С. 65-66.
28. Нутини А. Интегративная информация в кости: перестройка в кости, дофамин и серотонин [Текст] / А. Нутини, Ф. Маццони // Российский журнал биомеханики. – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 84-91.
29. Овчаренко В. В. Будова селезінки інтактних щурів різних вікових груп / В. В. Овчаренко // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 1. – С. 189-192.
30. Перфузия изолированного сердца методами Лангендорф и Нилли: возможности применения в научных исследованиях [Электронный ресурс]: осмотр деятельности. – Режим доступа: http://kemcardio.ru/attaches/115/Perfuzia_serdca_old.pdf. – Название с экрана.
31. Петренко В. М. О топографии селезінки и почек у морской свинки и белой крысы / В. М. Петренко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 5. – С. 142-143.

32. Петренко В. М. Сравнительная анатомия почек и селезенки у грызунов / В. М. Петренко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 6-4. – С. 710-713;
33. Пономарев Б. Л. Эмбрио- и фитогенез структурных елементов стромы и эндотелиоцитов селезенки человека / Б. Л. Пономарев, Л. Е. Обухова, Ю. А. Высоцкий, Н. И. Барсукова, Т. М. Черданцева // Сибирское медицинское обозрение.- 2011. – № 2. – С. 32-42.
34. Попович Ю. А. Роль триптофана и его метаболитов в патогенезе атопического дерматита у больных различных возрастных групп / Ю. А. Попович, В. П. Федотов // Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология. - 2015. - № 1-2. - С. 16-19.
35. Рыжко П. П. Особенности обмена триптофана у больных псориазом с нарушенным микробиоценозом кишечника / П. П. Рыжко, О. В. Зайцева, Н. В. Жукова, Э. Н. Солошенко // Пробл. екології та медицини.- 2008.- Т. 12, № 1–2.- С. 22–24.
36. Смирнова Т. С. Строение и функции селезенки / Т. С. Смирнова, О. Д. Ягмуров // Морфология. – 1993. – Т.104, №5-6. – С. 142-159.
37. Ставинская О. А. Содержание серотонина в крови у жителей Ненецкого автономного округа и Архангельской области в сравнении с показателями иммунологической реактивности / О. А. Ставинская // Экология человека. – 2010. – № 10. – С. 53–57.
38. Стаценко Е. А. Современные представления об анатомии селезенки человека / Е. А. Стаценко // Український медичний альманах. – 2009. – Т. 12, №3. – С. 229-232.
39. Толстых М. П. Теоретическое обоснование применения серотонина в клинической практике / М. П. Толстых, С. В. Будневский, А. И. Гаджиев // Актуальные вопросы экстренной хирургии. - Москва. - 2006. - Т.XI. - С.133-138.
40. Торшин В. И. Влияние экзогенного серотонина на усиление вагусных реакций толстой кишки / В. И. Торшин, В. М. Смирнов, Д.

С. Свешников, А. В. Кучук, И. Л. Мясников // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2012. –№ 1– С. 5-9.

41. Федоров Г. Н. Роль селезенки в поддержании гомеостаза организма / Г. Н.Федоров, С. Д. Леонов // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2006.- С.64-68.
42. Фурс В. В. Некоторые показатели обмена триптофана при физиологически протекающей беременности / В. В. Фурс, Е. М. Дорошенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – № 4 (36). – С. 36-38.
43. Хирургическая анатомия живота / А. Н. Максименков. – Л.: изд-во «Мед-на», 1972. – 688 с.
44. Чистякова О. В., Влияние интраназального инсулина и серотонина на функциональную активность аденилатциклазной системы в миокарде, яичниках и матке крыс с пролонгированной неонатальной моделью сахарного диабета / О. В. Чистякова, И. Б. Сухов, Н. В. Шипилов, К. В. Деркач, А. О. Шпаков // Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. - 2013. - Т. 49, № 2. - С. 153-164.
45. Чулкова С. В. Селезенка – периферический орган иммунной системы. Влияние спленэктомии на иммунный статус / С. В. Чулкова, И. С. Стилиди, Е. В. Глухов и др. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2014. – Т. 25. – №1–2. – С. 21–25.
46. Шапкин Ю. Г. Селезенка и иммунный статус организма / Ю.Г. Шапкин, В.В. Масляков // Вестник хирургии. - 2009. - № 2.- С. 110–113.
47. Шилов Ю.Е. Новые методы определения метаболитов триптофана в тромбоцитах и плазме крови человека для лабораторной диагностики депрессивных расстройств: дис. на соискание ученой степени

кандидата биологических наук: 03.01.04 / Ю.Е.Шилов – Москва, 2014. – 91 с.

48. Юрина Н. А. Гистология: Учебник / Н. А.Юрина - М.: Медицина. 1995. - 256 с.
49. Akhmatova N.K Expression of Tolllike receptors in spleen and lymphatic nodes after immunization by mucosal routes / N.K Akhmatova, N. B. Egorova, E. A. Akhmatov, E. A. Kurbatova, I. B. Semenova, I. V. Chertov, B. F Semenov, V. V. Zverev - Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2010, No.1, P. 50—55. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Expression+of+Tolllike+receptors+in+spleen+and+lymphatic+nodes+after+immunization+by+mucosal+routes
50. Cesta M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen / M.F Cesta - Toxicol Pathol, 2006; 34(5) P. 455-65. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067939
51. Herr N. The Effects of Serotonin in Immune Cells / N. Herr, C. Bode, D. Duerschmied - Front. Cardiovasc. Med. 4:48. P. 1-11. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5517399/
52. Krieken J. H.The splenic red pulp; a histomorphometrical study in splenectomy specimens embedded in methylmethacrylate /van Krieken J. H, Te Velde, J. Hermans, J. Welvaart, K.- Histopathology. 1985 Apr;9(4) P. 401-16. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4007786
53. Lowe1 K. C. Retention of Perfluorochemicals in Rat Liver and Spleen / K. C.Lowe1, P. K. Bentley - Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol. – 1992. - Vol. 20, No. 2-4. - P. 1029-1031. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1391422

54. Mebius R. E. Structure and function of the spleen / R. E. Mebius, G. Kraal - Nature Reviews Immunology.- 2005. 5(8), P. 606-616. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056254

55. Palego L. Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans / L. Palego, L. Betti, A. Rossi, G. Giannaccini // J. Amino Acids 2016:8952520. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4737446/

56. Rittenhouse P. A. Evidence that ACTH secretion is regulated by serotonin2A/2C (5-HT2A/2C) receptors. / P. A. Rittenhouse, E. A. Bakkum, A. D. Levy, Q. Li, M. Carnes, van de Kar L.D. - J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994; 271. P. 1647–1655.
Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996480

57. Steiniger B. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration / B. Steiniger, P. Barth, A. Hellinger //Am J Pathol. 2001.-159(2).- P. 501-512. Електронний ресурс. Режим доступу:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Steiniger+B.+The+perifollicular+and+marginal+zones+of+the+human+splenic+white+pulp%3A+do+fibroblasts+guide+lymphocyte+immigration%3F

58. Veerman A. White pulp compartments in the spleen of rats and mice / A. Veerman // Cell Tissue Res.-1975.-¹156.-Ñ.417-441. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Veerman+A.+White+pulp+compartments+in+the+spleen+of+rats+and+mice+%2F+A.+Veerman+%2F%2F+Cell+Tissue+Res.-1975.-%C2%B9156.-%C3%91.417-441

59. Zvenigorodskaya L. A., Kucherenko T. V. [Eating behavior and hormones of eating behavior in metabolic syndrome patients]. Tipy pishchevogo povedeniya i gormony pishchevogo povedeniya u bol’nykh s

metabolicheskim sindromom. [Experimental & Clinical Gastroenterology]. Eksperimental’naya i klinicheskaya gastroenterologiya. 2007; 1 P. 24-27. (in Russ.).

60. Патент. Бєленічев І. Ф.Спосіб визначення серотоніну та мелатоніну в одній пробі біологічного матеріалу/ І. Ф.Бєленічев, О. В.Ганчева, Ю. М. Колеснік, І. Є. Сухомлінова. Електронний ресурс. Режим доступу: http://uapatents.com/2-6147-sposib-viznachennya-serotoninu-ta-melatoninu-v-odnijj-probi-biologichnogo-materialu.html