

УДК: [616.36-092.9:615.916\*175]

В.М. Бобров, Я.А. Дубцова, Л.Ю. Островська  
ВДНЗУ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

### МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ У ТКАНИНАХ ПЕЧІНКИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ НАДХОДЖЕННІ ПРООКСИДАНТІВ ТА КОРЕКЦІЇ ЇХ ТІОТРИАЗОЛІНОМ

У експерименті на білих щурах моделювали хронічну інтоксикацію введенням пестицидів 2,4-ДА і ДЕДТК впродовж 30 і 50 діб. Введення пестицидів різних хімічних груп викликало активацію процесів ВРПО ліпідів у печінки. При морфологічних дослідженнях виявлене порушення структури та мікроциркуляторного русла гепатоцитів, яке має вільнорадикальний механізм. При корекції метаболічних порушень антиоксидантом тіотриазоліном виявлено, що препарат гальмує інтенсивність перекисного окислення ліпідів та попереджає ряд порушень на гістологічному рівні. Представлені дані свідчать про доцільність застосування препаратів антиоксидантної дії з метою фармакокорекції метаболічних та морфологічних порушень при тривалому надходженні пестицидів різних хімічних груп.

**Ключові слова:** амина сіль 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, дітєтилдитіокарбамат натрію, перекисне окислення ліпідів, антиоксиданти

*Робота є фрагментом планової наукової-дослідницької роботи „Дослідження специфічної фармакологічної активності біологічно-активних речовин рослинного походження; № держреєстрації 0101V001130».*

Впродовж останніх декількох десятиріч біосфера України підлягає значному антропогенному навантаженню. Збільшення кількості хімічних сполук, які використовуються в промисловості, сільському господарстві, медицині та побуту створює небезпечну екологічну ситуацію для людини [5, 17]. Серед важливіших задач сучасної медицини особливе місце займає проблема захисту людини від дії токсичних речовин, які порушують природну рівновагу навколишнього середовища. До небезпечних хімічних сполук докільця відносяться харчові домішки, лікарські засоби, промислові отрути, нафтопродукти та ін., але значне місце серед екологічних забруднювачів займають засоби хімічного захисту сільськогосподарських культур [1, 9, 14]. На даний час перелік пестицидів, які використовуються для захисту сільськогосподарських рослин нараховує декілька сотень сполук, що випускаються в вигляді тисяч препаративних форм [11]. При довготривалому контакті з токсикантами можуть виникати біохімічні та морфологічні зміни різних органів та систем, що, на думку деяких авторів, зумовлено активацією вільнорадикального перекисного окиснення (ВРПО) ліпідів [2, 4, 8, 12, 13, 15].

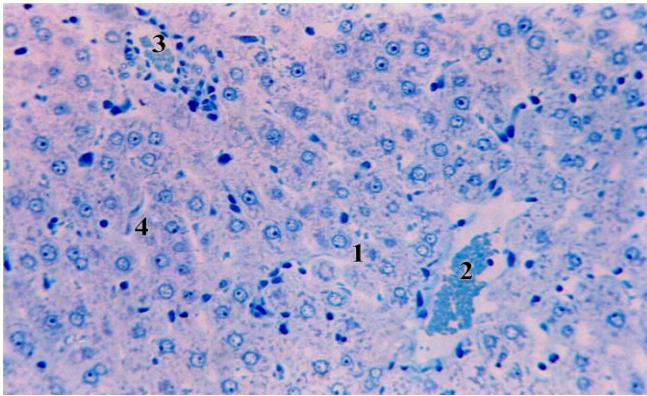
**Метою** роботи було вивчення впливу антиоксиданту (АО) тіотриазоліну на стан ВРПО ліпідів та морфологічні зміни у печінки щурів при хронічному надходженні пестицидів аміної солі 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-ДА) та N,N-діетилдитіокарбамату натрію (ДЕДТК).

**Матеріал та методи дослідження.** Об'єктом дослідження є патологічні зміни в тканинах печінки щурів при інтоксикації пестицидами та при їх корекції АО. Експеримент проведено на 5 групах щурів-самців лінії Вістар вагою 170-200г. Всі дослідження на щурах проводились під наглядом комісії з біоетики Вищого державного навчального закладу України, «Української медичної стоматологічної академії», м. Полтава (протокол №74 від 15.09.09р.). 20 щурів склали інтактну групу, яка протягом експерименту утримувалася в умовах віварію по 5 тварин в клітках (1 група). 2 та 4 групи включали по 20 щурів-самців, яким протягом 30 діб вводили внутрішньошлунково пестицид 2,4-ДА в дозі 120мг/кг; при цьому тварини 4 групи додатково отримували внутрішньошлунково АО тіотриазолін у дозі 100 мг/кг. Тварини 3 та 5 груп вводили ДЕДТК у дозі 20 мг/кг один раз у дві доби протягом 50 днів. Препарати вводили внутрішньошлунково за допомогою зонду. Доза препаратів відпрацьовано у науковій Лабораторії біохімії і фармакології антиоксидантів ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» з урахуванням мети дослідження – відтворення метаболічних та морфологічних порушень, характерних для хронічної інтоксикації та оцінки ефективності застосування цих препаратів з лікувальною та профілактичною метою.

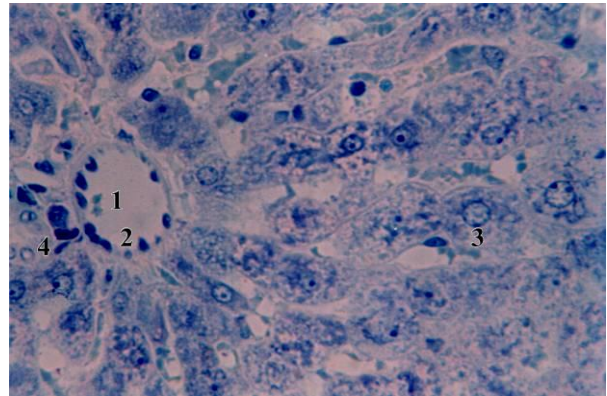
Евтаназію щурів здійснювали під гексеналовим наркозом (50мг/кг маси тіла) шляхом забору крові з серця до його зупинки. Рівень ВРПО ліпідів оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів [3], принцип метода базується на їх властивості поглинати світлове випромінювання в ультрафіолетовому відрізку спектра. В тканинах печінки досліджували рівень ВРПО – продуктів, що реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реаканти) [5]. Принцип оснований на здібності маленового діальдегіду реагувати с ТБК с утворенням триметинового комплексу, який має рожеву окраску, інтенсивність окраски пропорціональна концентрації ТБК-реакантів. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента. Взаємозв'язок

між показниками визначали за коефіцієнтом кореляції. Для морфологічних досліджень експериментальним тваринам розкривали черевинну порожнину та за допомогою леза відділяли шматочки печінки. Зразки послідовно фіксували в 2% розчині глутарового альдегіду та 1% розчині  $OsO_4$ , зневоднювали та поміщали в епон-812. Зі полімеризованих блоків виготовляли полутонкі зрізи за допомогою ультрамікротому УМТП-4 [6]. Потім їх фарбували метиленовим синім та досліджували за допомогою мікроскопу МБІ-15.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Аналіз біохімічних показників свідчить, що у тварин при введенні пестицидів – 2,4-ДА та ДЕДТК достовірно зріс рівень проміжних продуктів ВРПО ліпідів: рівень дієнових кон'югатів склав  $10,06 \pm 1,02$  ммоль/л у тварин 2-ї групи ( $p_{1-2} < 0,001$ ) та  $19,8 \pm 2,8$  ммоль/л у тварин 3 групи ( $P_{1-3} < 0,001$ ), у тварин інтактної групи –  $3,8 \pm 0,56$  ммоль/л; рівень ТБК-реактивів у тканинах печінки склав  $191,0 \pm 18,4$  нмоль/г ( $p_{1-2} < 0,001$ ) та  $183,2 \pm 15,1$  нмоль/г ( $p_{1-3} < 0,001$ ) відповідно, в той час як у інтактних тварин він дорівнює  $79,5 \pm 5,7$  нмоль/г.

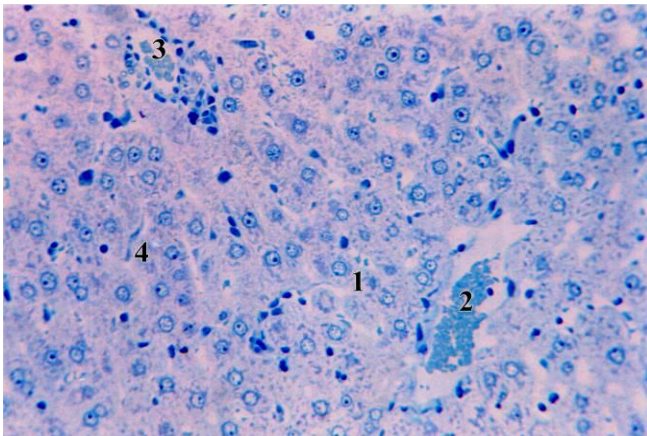


а) об  $6,3^x$  ок.  $10^x$  1 - гепатоцит; 2 – еритроцити у просвіті вени; 3 – порталний тракт; 4 – ядра ретикулярних клітин.

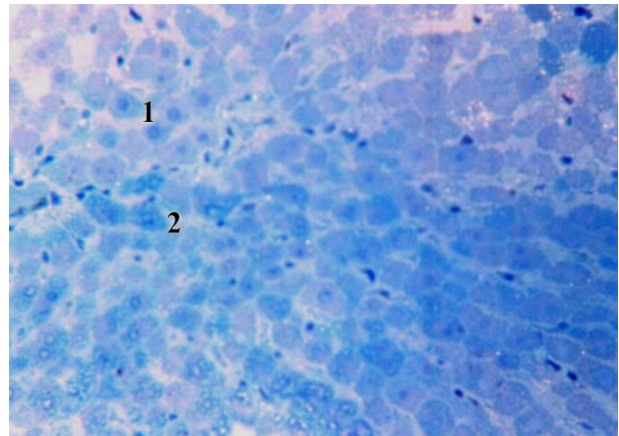


б) об  $20^x$  ок.  $10^x$  1- центральна вена; 2 - ендотеліоцит; 3 - гепатоцит; 4- макрофаг.

Рис. 1. Гістоструктура печінки інтактних шурів (а) та при впливі 2,4-ДА (б). Напівтонкій зріз. Забарвлення метиленовим синім.



а) об  $6,3^x$  ок.  $10^x$  1 - гепатоцит; 2 – еритроцити у просвіті вени; 3 – порталний тракт; 4 – ядра ретикулярних клітин.



б) об.  $9^x$  ок.  $10^x$ ; 1 - гепатоцити; 2 – вакуольна дистрофія гепатоцитів

Рис. 2. Гістоструктура печінки інтактних шурів (а) та при впливі ДЕДТК (б). Напівтонкій зріз. Забарвлення метиленовим синім.

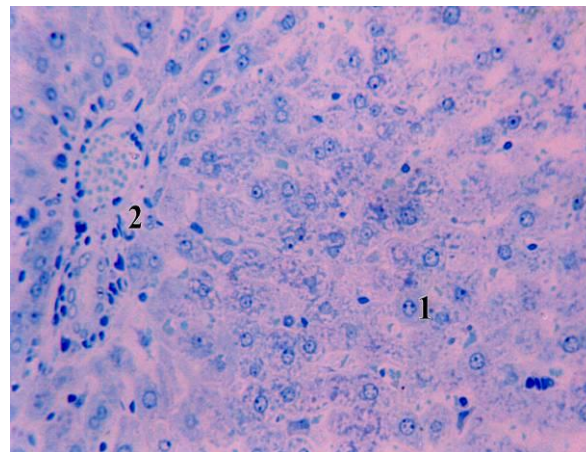
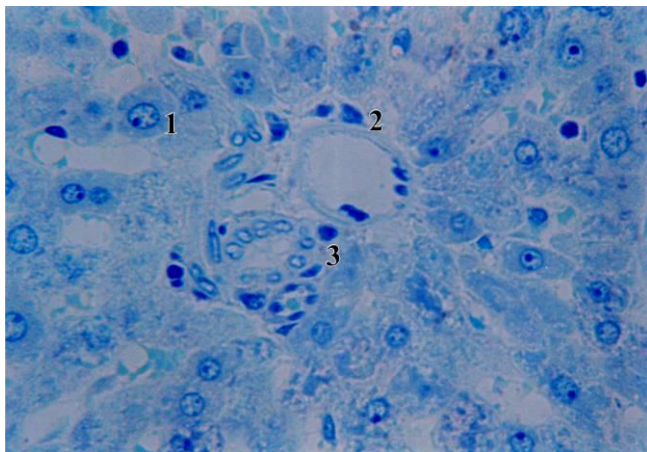
Введення тваринам 2,4-ДА протягом 30 діб (2 група) спостерігаються значні порушення гістоструктури у порівнянні з тваринами інтактної групи: цитоплазма гепатоцитів має сітчастий або зернистий вигляд, ядра окремих гепатоцитів значно відрізняються за розмірами, вміщують по 1-2 ядрця. В окремих випадках границі між гепатоцитами чітко виражені, за рахунок чого порушується типова структура печінкових балок (рис. 1).

У синусоїдах спостерігаються явища повнокров'я, значна кількість ретикулоендотеліоцитів, малочислені лімфоцити. На фоні різкого повнокров'я з явищами стаза та сладжа еритроцитів відмічалось розпушування цитозоля гепатоцитів, що супроводжується зниженням чіткості клітинної мембрани та свідчить за інтрацелюлярний набряк. Навколо центральних вен спостерігається скупчення лімфоцитів, просвіт центральних вен вільний, ендотеліальні клітини з явищами набряку, місцями відшаровуються від базальної мембрани. В деяких випадках реєструються явища вакуольної дистрофії гепатоцитів. Дослідження структури печінки у тварин 3-ї експериментальної групи (введення ДЕДТК) показало, що у дольках печінки розвиваються суттєві структурні зміни: у просвіті розширених капілярів – сладж еритроцитів, признаки утворення мікротромбів. Закупорка печінкових синусоїдів супроводжується розвитком зонального некробіозу та послідовного некрозу гепатоцитів і сполучнотканинних клітин (рис. 2)

Порушення гістоструктури можуть мати вільнорадикальний механізм та виникати внаслідок гепатотоксичної дії пестицидів, що підтверджується тісними кореляційними зв'язками між показниками ВРПО ліпідів та ступеню



порушення структури гепатоцитів. Так, існує тісний прямий кореляційний зв'язок між рівнем ТБК-реактивних у тканинах печінки та дистрофічними змінами гепатоцитів  $r=+0,82$ ; рівень дієвих кон'югатів корелює з порушенням кровообігу  $r=+0,85$ . Тварини 4-ї та 5-ї груп на тлі тривалого введення пестицидів (відповідно, 2,4-ДА та ДЕДТК) додатково отримували тіотриазолін. Тварини добре переносили введення препарату. На тлі введення препарату рівень дієвих кон'югатів у тварин цих груп достовірно знизився до  $5,7 \pm 1,2$  ммоль/л у тварин 4 групи ( $p_{2,4} < 0,01$ ) та  $6,1 \pm 1,2$  ммоль/л ( $p_{3,5} < 0,01$ ) у тварин 5 групи. У тканинах печінки також знизився рівень ТБК-реактивних та складає у 4-ї та 5-ї групах  $106,8 \pm 9,5$  ммоль/г ( $p_{2,4} < 0,002$ ) та  $103,1 \pm 7,2$  ммоль/г ( $p_{3,5} < 0,002$ ) відповідно у порівнянні з даними тварин контрольних груп. Введення тіотриазоліну (група 4 та 5) попередило розвиток патологічних змін у паренхімі та стромі печінки, які спостерігаються при інтоксикації 2,4-ДА та ДЕДТК (рис. 3).



а) Об  $20 \times$  ок.  $10 \times$ . 1-гепатоцит; 2-лейкоцити; 3-портальний тракт

б) об  $20 \times$  ок.  $10 \times$  1-гепатоцит; 2-портальний тракт.

Рис. 3. Гістоструктура печінки щурів, які отримували тіотриазолін на тлі тривалого впливу 2,4-ДА (а) та ДЕДТК (б). Напівтонкій зріз. Забарвлення метиленовим синім.

При аналізі мікрофото гепатоцити мають неправильну багатокуту форму, розміри їх відрізняються. Цитоплазма гепатоцитів має сітчастий вигляд, але ядра окремих гепатоцитів мають округлу форму, незначно відрізняються за розмірами, вміщують по 1-2 ядерець, розташованих, в основному, на периферії. Границі між гепатоцитами нечітко виражені, на відміну від показників контрольної групи, лише у деяких ділянках спостерігається порушення типової структури печінкових балок з чітким розмежуванням гепатоцитів. Явища повнокров'я спостерігаються лише у окремих синусоїдах, значна кількість ретикулоендотеліоцитів займають пристінкове положення або розташовані у їх просвіті; присутня незначна кількість лімфоцитів. Просвіт центральних вен вільний, містить помірну кількість еритроцитів; на відміну від даних тварин контрольної групи явищ набряку та відшарування ендотеліальних клітин від базальної мембрани не спостерігається. Жовчні протоки незначно розширені, не містять оптично щільних жовчних пігментів; зони некрозу паренхіматозного і стромального компонентів печінки не спостерігаються.

#### Висновок

Проведені морфологічні дослідження свідчать, що тривале введення прооксидантів - пестицидів 2,4-ДА та ДЕДТК призводить до активації процесів ВРПО ліпідів (підвищення рівня дієвих кон'югатів у крові та ТБК-реактивних у тканинах печінки) і порушення гістоструктури у тканинах печінки: порушення кровообігу, дистрофічних змін гепатоцитів та виникнення мікроосередків лімфоцитарних інфільтрацій навколо портальних трактів. Ці процеси пов'язані з активацією процесів ВРПО ліпідів у тканинах печінки внаслідок гепатотоксичної дії пестицидів різних хімічних груп, за що свідчать кореляційні зв'язки між показниками ВРПО ліпідів та ступеню порушення структури гепатоцитів.

Застосування АО тіотриазоліну призводить до зниження інтенсифікації процесів ВРПО ліпідів та морфологічних змін в різних структурних елементах печінки у порівнянні з контрольною групою тварин: у гепатоцитах нормалізується кількість ядер, зменшується прояви руйнування структури печінкових балок, знижується ступінь лімфоцитарної інфільтрації, проліферація клітин фібробластичного ряду.

**Перспективи подальших досліджень у даному напрямку.** Отримані результати є основою для можливого подальшого дослідження застосування препаратів АО різних фармакологічних груп для корекції патологічних змін на біохімічному та гістологічному рівні при тривалому надходженні прооксидантів.

#### Література

1. Бобирьов В.М. Показники вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у щурів при хронічному надходженні пестициду – аміної солі 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти / Бобирьов В.М., Цветкова Я.А. // Актуальні проблеми сучасної медицини. – Полтава. – 2005. - №1-2. – С. 6-9.
2. Вознюк В. В. Причини розвитку гострих отруєнь гербіцидом 2,4-Д, їх основні клінічні прояви та принципи медикаментозної та дієтотерапії / В. В. Вознюк // Проблеми харчування. – 2006. - № 4. – С. 23-31.

3. Гаврилов В. Б Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль // Вопросы мед. химии. – 1987. – Т. 33, № 1. – С. 188-122.
4. Гончарук Є. Г. Вільнорадикальне окислення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля / Є. Г. Гончарук, М. М. Коршун // Журнал АМН України. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 131-150.
5. Забруднення питної води залишками пестицидів, нормування, методи контролю, оцінка ризику / М. Г. Проданчук, О. П. Кравчук, І. В. Лепьошкін [та ін.] // Проблеми харчування. – 2007. – № 2. – С. 12-21.
6. Костиленко Ю. П., Ковалев Е. В. Методы работы с полутонкими эпоксидными срезами в гистологической практике. // Арх. анат. -1978. -№12. -с. 68-72.
7. Курляндский Б. А. Основные направления международной деятельности по медицинским проблемам химической безопасности и возможность их реализации в Российской Федерации / Б. А. Курляндский // Токсикологический вестник. - 2001. - № 6. - С. 2-5.
8. Леоненко О. Б. Процеси вільнорадикального перекисного окислення ліпідів в механізмі дії пестицидів: автореф. дис. на здоб. наук. ступ. докт. біол. наук: спец. 14.03.11 «токсикологія» / О. Б. Леоненко. – К., 1997. – 45 с.
9. Лунев М. И. Количественная оценка взаимодействия токсикантов при комплексном загрязнении почв / М. И. Лунев // Гигиена и санитария. – 2004. - № 2. – С. 34-36.
10. Методы диагностики метаболических нарушений при атеросклерозе и дифференцированное применение противоатеросклеротических средств: [метод. рекоменд. / О. М. Воскресенский, В. А. Дельва, М. А. Дудченко та ін.]. – Полтава.: ПМСИ, 1982. – 26 с.
11. Островская Г.Ю. Активность системы антиоксидантной защиты в условиях хронического поступления диэтилдитиокарбамата при разных уровнях антиоксидантной обеспеченности организма / Г.Ю. Островская, В.Н. Бобырев // Современные проблемы токсикологии. – 1999. - №1. – С. 50-52.
12. Острое групповое отравление гербицидом Диканит-600 на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и меры профилактики / Балан Г.М., Сергеев С.Г., Мымренко Т.В. [и др.] // Соврем. проблемы токсикол. – 2003. - №3. – С. 52-58.
13. Раковский В. Н. К вопросу о патогенезе воздействия фенокси соединений на организм теплокровных / В. Н. Раковский, Е. Г. Чхвиркия, Е. Б. Попова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124, № 5. – С. 461-467.
14. Черных А. М. Угрозы здоровью человека при использовании пестицидов / А. М. Черных // Гигиена и санитария. - 2003. - № 5. – С. 25-28.
15. Le Hong Thom. Health related war dioxin in Vietnam today, methodological approach in evaluation / Thom Le Hong, Manh Hung Tran. // Organohalogen compounds. – 2004. – Vol. 66. – P. 3708-3714.

Резюме

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ ПРООКСИДАНТОВ И ИХ КОРРЕКЦИИ ТИОТРИАЗОЛИНОМ**

**Бобирьев В.М., Цветкова Я.А., Островська Г.Ю.**

В эксперименте на белых крысах моделировали хроническую интоксикацию введением пестицидов 2,4-ДА и ДЭДТК на протяжении 30 и 50 суток. Введение пестицидов разных химических групп вызвало активацию СРПО липидов в тканях печени. При морфологических исследованиях выявлено нарушение структуры и микроциркуляторного русла гепатоцитов, которое имеет свободнорадикальный механизм. При коррекции метаболических нарушений антиоксидантом тиотриазолином выявлено, что препарат тормозит интенсивность перекисного окисления липидов и предупреждает ряд нарушений на гистологическом уровне. Представленные данные свидетельствуют о целесообразности применения препаратов антиоксидантного действия для фармакокоррекции метаболических и морфологических нарушений при длительном поступлении пестицидов разных химических групп.

Ключевые слова: аминная соль 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, диэтилдитиокарбамат натрия, перекисное окисление липидов, антиоксиданты

Стаття надійшла 24.02.2011 р.

**MORPHOLOGICAL CHANGES IN TISSUES OF LIVER OF EXPERIMENTAL RATS AT THE PROTRACTED RECEIPT OF PROOXIDANTIV AND CORRECTION OF THEM TIOTRYAZOLINE**

**Bobyrev V.N., Cvetkova Y.A., Ostrovska G.Y.**

In an experiment on white rats designed chronic intoxication introductions of pesticides of 2,4-DA and DEDTK during 30 and 50 days. Introduction of pesticides of different chemical groups caused activating of processes of free-radical peroxide lipid oxidization in livers. At morphological researches found out violation of structure and microcirculatory river-bed of hepatocytes, which has a free-radical mechanism. At the correction of metabolic violations it is discovered the antioxidant of tiotriazoline, that preparation brakes intensity of free-radical peroxide lipid oxidization and warns the row of violations at histological level. The data presented indicate the practicability of the using of preparations with antioxidative activity for prevention of metabolic disorders in chronic intoxication of pesticides of different chemical groups.

Key words: 2,4-DA, N,N-diethylthiocarbamate Na, free radical peroxidation of lipids, antioxidants.