

УДК 575.224.23:599.323.4

М.А. СУВОРОВА, Н.В. ПИЛИПЕНКО, Т.М. ШАЛАХМЕТОВА

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ В РАЗНЫЕ СРОКИ ИНГАЛЯЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПАРОВ НЕФТИ

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби)

По результатам проведенного морфологического и морфометрического анализа ингаляционное воздействие паров нефти на мышей оказывает повреждающее действие на печень животных. Выраженность патологических процессов в печени экспериментальных животных прямо пропорциональна продолжительности ингаляционного воздействия нефтью.

Загрязнение наземных и водных экосистем нефтью и нефтепродуктами остается одной из основных экологических проблем. Недавняя авария в Мексиканском заливе показала, что даже мощные, индустриально развитые государства не всегда могут справиться с последствием нефтяного загрязнения и тем более предотвратить его. Пока нефть остается основным источником топлива, избежать негативных экологических последствий нефтедобычи и нефтепереработки невозможно. Тем не менее необходимо стремиться минимизировать риск загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. В Республике Казахстан Атырауская область, где расположены большинство нефтяных месторождений, занимает особое место среди регионов и зон экологического бедствия страны. В этом ключе исследования, посвященные изучению эффектов влияния нефти на организм млекопитающих (и человека), должны способствовать накоплению знаний с последующим их применением в экологическом и гигиеническом нормировании. Несмотря на опасность, эффекты нативной нефти на организм млекопитающих изучены недостаточно. Это связано, в первую очередь, со сложностью проведения исследований по влиянию сложных, многокомпонентных смесей, какой является нефть. Гораздо лучше изучена токсичность отдельных компонентов нефти, например бенз(о)пирена, считающегося эталоном канцерогенности [1]. Многие компоненты нефти, в первую очередь ароматические углеводороды, проявляют наибольшую токсичность после прохождения метаболической детоксикации в печени. Состояние печени, как центрального органа метаболизма эндогенных и экзогенных соединений, существенно для способности организма сопротивляться негативным влияниям среды. С другой стороны, печень, где сосредоточены большинство ферментов детоксикации, первой реагирует на образование токсичных метаболитов патологическими либо компенсаторными изменениями паренхимы. Для изучения воздействия паров нативной нефти на печень млекопитающих были проведены лабораторные исследования на мышах. Целью данной работы явилось гистологическое и морфометрическое исследование (на светооптическом уровне) ткани печени мышей в разные сроки ингаляционного воздействия паров нефти.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В экспериментах были использованы белые лабораторные половозрелые мыши массой 15-20 г. Животные подвергались ингаляционному воздействию паров нативной тенгизской нефти (месторождение Биикжал) в дозе 7 мг/л по часу в день в течение 1, 7, 14 и 30 дней. Ингаляцию проводили в специальной вентилируемой камере объемом 70,7 л.

Каждой экспериментальной группе соответствовала контрольная группа. Для проведения гистологического анализа кусочки печени размером 0,5 × 0,5 см фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине. Гистологические препараты приготавливали по общепринятой методике и окрашивали гематоксилином и эозином для обзорного микроскопического исследования /2/. Микроскопирование и микрофотографирование окрашенных срезов проводили с помощью микроскопа Leica DM LB2 при разных увеличениях. Для более точной количественной оценки наблюдающихся повреждений ткани печени было проведено морфометрическое исследование долек печени экспериментальных животных. Морфометрическое исследование проводилось с использованием программы BioVision 3.0. Полученные результаты подвергались статистической обработке с помощью программы Microsoft Excel 2007 for Windows. Во всех случаях определяли среднее значение и границы доверительного интервала при 95% уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Признаки интоксикации парами нефти наблюдались у животных, начиная со второй недели воздействия. К 30 суткам воздействия периоды повышенной активности у животных сменялись периодами угнетения, шерстный покров имел грязный, неухоженный вид. Нарушения со стороны нервной системы являются, скорее всего, результатом токсического действия высоколетучих однокольцевых ароматических углеводородов, обладающих, кроме прочих, нейротоксическим эффектом /3/. При вскрытии печень этих мышей казалась слегка рыхлой и была более бледной, чем у контрольных животных. Результаты морфометрического исследования ткани печени контрольных и опытных животных представлены в таблице и на рисунке.

Гистологически, структура печени контрольных животных не отличалась от описанной нормы /4/. Ингаляционное воздействие парами нефти в течение суток не приводит к изменениям в строение ткани печени. Морфометрическое исследование параметров стромы и паренхимы печени крыс этой группы также не выявило достоверных различий с контрольными показателями. Воздействие на крыс парами нефти в течение недели приводило к проявлению в печени крыс изменений, которые можно рассматривать как стереотипную реакцию ткани на токсическое воздействие. Достоверно увеличивалась площадь ядер гепатоцитов и ядерно-цитоплазматическое отношение паренхиматозных клеток, что является доказательством повышения функциональной активности клеток. Отмечена также гиперплазия и гипертрофия элементов ретикулоэндотелиальной системы. По результатам морфометрического анализа, количество элементов РЭС в ткани увеличивается на 16% ($P < 0.001$) (таблица 1). При световой микроскопии визуально сложно различить эндотелиоциты и клетки Купфера – резидентные макрофаги печени. Принято считать, что клетки Купфера обладают большей фагоцитарной активностью, чем эндотелиальные клетки /5/. Активация элементов РЭС сопровождается реакцией со стороны микроциркуляторного русла – расширением синусоидов и более крупных сосудов. Так, площадь синусоидов увеличивается на 31% ($P < 0.01$), просвет центральных вен расширяется на 8% ($P < 0.05$) (таблица 1) по сравнению с контролем, просвет желчных протоков достоверно не изменяется, но визуально наблюдается гиперплазия эпителиоцитов желчных протоков. Воздействие паров нефти в течение 14 дней приводит к усилению напряженности компенсаторных процессов в паренхиме и строме печени и нарастанию деструктивных изменений в ткани органа. Отмечены усиление миграции воспалительных клеток, преимущественно в перипортальные отделы долек. Визуально в просвете синусоидов лимфоцитов становится больше, на 34% увеличивается количество ретикулоэндотелиоцитов ($P < 0.001$), их ядра становятся округлыми, проявляется цитоплазма. Количество макрофагов в

печени увеличивается за счет притока моноцитов из кровяного русла в ответ на выделение активированными макрофагами монокинов и гибель гепатоцитов /6/.

В паренхиме печени интактных животных деструктивные клеточные формы встречаются относительно редко. Ингаляция парами нефти в течение двух недель приводит к увеличению числа поврежденных клеток на 83% ($P < 0.001$) (таблица 1), соответственно более чем в два раза возрастает площадь некроза гепатоцитов ($P < 0.001$) (рисунок 1). Индекс альтерации гепатоцитов составляет $20,12 \pm 2,8$ против $9,16 \pm 3,2$ в контроле (рисунок 1). Небольшие очаги некроза гепатоцитов расположены преимущественно в интермедиарной и центрлобулярной зонах дольки. Во многих сохранившихся гепатоцитах отмечалась грубая зернистость, полиморфизм ядер, для гибнущих клеток паренхимы печени характерны вакуолизация цитоплазмы, кариолизис. Гепатоциты с сильно эозинофильной цитоплазмой и пикнотичными ядрами встречаются довольно редко. При этом балочное расположение гепатоцитов в дольке в принципе сохранялось. Площадь синусоидов увеличивалась на 41% ($P < 0,001$), просвет желчных протоков – на 22% ($P < 0,05$), просвет центральных вен – в среднем на 21% ($P < 0,001$) (таблица 1).

Наряду с деструктивными происходили и регенераторные процессы, характеризующиеся гипертрофией гепатоцитов, возрастанием размеров их ядер, увеличением количества двуядерных клеток. Патологические изменения в печени крыс в данном эксперименте были наиболее выражены на 30 сутки ингаляции парами нефти. В гепатоцитах выявлялись зернистая, гидропическая дистрофии – цитоплазма таких клеток выглядит оптически пустой, ядра прозрачные, водянистые. Индекс альтерации гепатоцитов увеличивается почти в 5 раз ($P < 0,001$) (рисунок).

Таблица 1

Результаты морфометрического анализа долек печени экспериментальных мышей

Показатель	Контрольные животные	Продолжительность воздействия, сут			
		1	7	14	30
Просвет желчных протоков, мкм	$18,3 \pm 1,0$	$19,4 \pm 0,9$	$20,82 \pm 0,5$	$22,52 \pm 0,7^*$	$15,28 \pm 0,4^*$
Численная плотность элементов РЭС	$52,4 \pm 0,9$	$54,3 \pm 0,45$	$61,18 \pm 0,8^{***}$	$70,22 \pm 0,9^{***}$	$78,44 \pm 2,2^{***}$
Площадь синусоидов, мкм ²	$15970,8 \pm 865,7$	$17360 \pm 921,8$	$20947,4 \pm 526,2^{**}$	$22657,0 \pm 825,9^{***}$	$26813,2 \pm 504,7^{**}$
Просвет центральных вен, мкм	$3013,54 \pm 80,3$	$3006,38 \pm 79,9$	$3265,3 \pm 73,2^*$	$3652,6 \pm 68,8^{**}$	$4370,1 \pm 100,1^{**}$
Ядерно-цитоплазматическое отношение гепатоцитов	$0,23 \pm 0,002$	$0,23 \pm 0,003$	$0,22 \pm 0,003$	$0,21 \pm 0,003$	$0,21 \pm 0,001$
Численная плотность, гепатоцитов	$31,62 \pm 0,6$	$31,4 \pm 0,7$	$29,0 \pm 0,4$	$26,74 \pm 0,6$	$23,46 \pm 0,5$
Количество деструктивных форм гепатоцитов	$2,92 \pm 0,6$	$3,34 \pm 0,6$	$3,78 \pm 0,1^*$	$5,36 \pm 0,3^{**}$	$9,58 \pm 0,4^{**}$
* различия достоверны при $P < 0,05$; ** различия достоверны при $P < 0,01$; *** различия достоверны при $P < 0,001$					

Лизис ядер и плазмоцитоллиз развиваются вследствие расщепления омертвевших зон клетки лизосомными гидролазами и приводят к гибели клеток. Паренхима печени повреждается неоднородно, парциальный некроз характерен в основном для централобулярной и интермедиарной зон долек. При морфометрическом исследовании площадь некрозов увеличивается почти в семь раз по сравнению с контролем ($P < 0,001$). Гибель клеток приводит к развитию воспалительной реакции – количество элементов ретикулоэндотелиальной системы увеличивается на 49%, подавляющее большинство клеток находится в активированном состоянии.

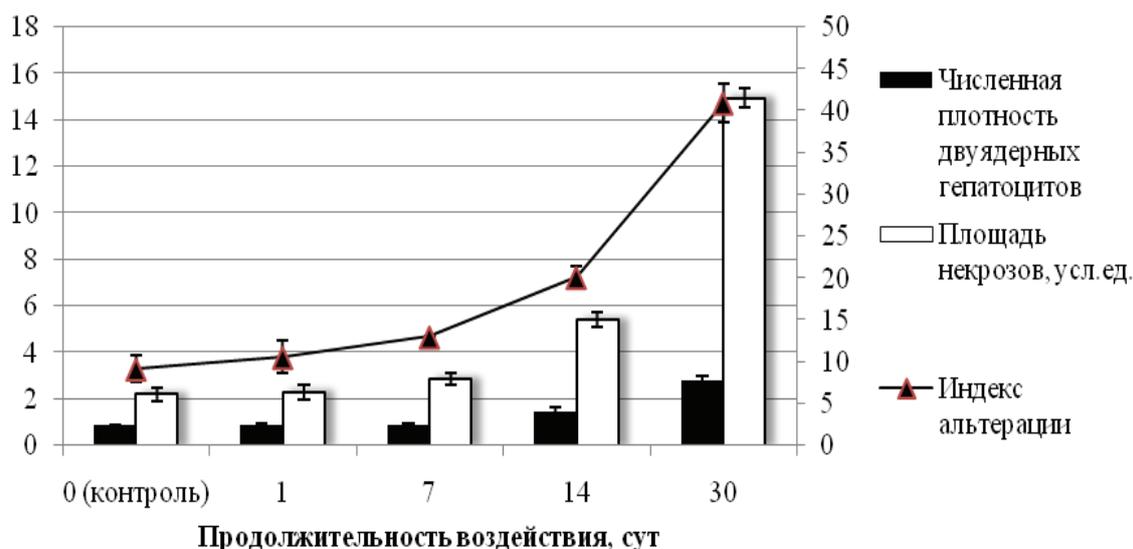


Рисунок 1. Степень повреждения паренхимы печени мышей при воздействии паров нативной нефти, $M \pm m$

В паренхиме обнаруживаются крупные воспалительные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов. В области портальных трактов выявлялись полиморфноцитарные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, макрофагов, единичные нейтрофилов, плазматических клеток и эозинофилов. Это свидетельствует о развитии воспалительных изменений в тканях печени, вовлечении в них клеточных элементов крови и рыхлой соединительной ткани.

Увеличение макрофагов в паренхиме печени происходит за счет притока моноцитов, привлеченных веществами, появляющимися в интерстициальном пространстве после гибели гепатоцитов. Макрофаги резорбируют остатки гепатоцитов и выделяют большое количество цитокинов и аттрактантов, способствуя постоянному притоку в печень моноцитов и лимфоцитов и поддерживая тем самым процесс воспалительной инфильтрации. С другой стороны, мононуклеары являются источником активных форм кислорода и оксида азота, которые способствуют нарастанию окислительного стресса при индуцированном токсикантами повреждении /7/.

В печени мышей этой группы наблюдались расширение, полнокровие междольковых артерий и вен, синусоидных капилляров, центральных и поддольковых собирательных вен. При количественном исследовании было выявлено увеличение просвета центральных вен при ингаляции нефтью в течение 30 дней на 45% по сравнению с контролем. Площадь синусоидов увеличивалась на 67%, одновременно отмечалось сужение просвета желчных протоков – на 16,6% ($P < 0,05$) (таблица 1). Сужение протоков препятствует оттоку желчи и способствует нарастанию деструктивных процессов в гепатоцитах /8/.

Чтобы компенсировать гибель части клеток паренхимы остальные клетки должны значительно повысить свою функциональную активность. При морфологическом исследовании наблюдаются гипертрофия гепатоцитов, морфометрически установлено достоверное увеличение площади ядер и ядерно-цитоплазматического соотношения в гепатоцитах. Отражением приспособительных сдвигов является увеличение количества двуядерных гепатоцитов на единицу площади. Истинная полиплоидия органа достоверно определяется только цитофотометрическим способом (по содержанию ДНК в ядре). Соотношение одно- и двуядерных гепатоцитов у животных значительно меняется в результате изменения функционального состояния органа при различных воздействиях /9/. Так, ингаляция паров нефти в течение 30 дней вызывала увеличение относительного количества двуядерных гепатоцитов до 2,8 (при 0,9 в контроле) ($P < 0,001$) (рисунок). Увеличение ядерно-цитоплазматического отношения гепатоцитов и увеличение процента двуядерных клеток по сравнению с контролем могут свидетельствовать об усилении функциональной нагрузки на орган или протекающих восстановительных процессах /10/.

Таким образом, токсическое воздействие нефти в дозе 7 мг/мл проявляется к 30 суткам ингаляционного воздействия в виде гидропической дистрофии гепатоцитов. Гидропическая (вакуольная) дистрофия гепатоцитов, различимая в световой микроскоп, является следствием набухания митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулума. Чрезмерное набухание клеточных органелл, их резкая вакуолизация свидетельствует об избыточном накоплении воды в клетках и этот эффект обуславливается в первую очередь нарушением функции энергозависимой K^+-Na^+ -АТФазы в клеточной мембране /11/. Как известно, приток K^+ , Na^+ и воды в клетку ведёт к «мутному» набуханию органелл. Исходом гидропической дистрофии является колликвационный некроз гепатоцитов, который и обнаруживался в печени крыс, подвергавшихся ингаляционному воздействию паров нефти в течение 30 дней. При исчерпании резервов вследствие повышенного функционирования клеток, органов и их систем восполнение их биоэнергетического и пластического потенциала обеспечивается процессами пролиферации и полиплоидизации, гиперплазии и гипертрофии, увеличивающими число и размеры клеток и внутриклеточных структур.

Токсическое действие нефти связано, в первую очередь, с действием в тканях ароматических углеводородов и их метаболитов. Ингаляция паров нефти является основным путём поступления в организм в естественных и промышленных условиях. На скорость проникновения компонентов нефти в кровь влияют несколько факторов: химический состав и свойства углеводородов, физическое состояние организма-мишени, пол, возраст, температура окружающей среды и т.д. Ароматические углеводороды довольно легко проходят через легкие в кровь, абсорбируются полнее, но также быстро метаболизируются /12/. Алифатические углеводороды метаболизируются медленнее, чем ароматические соединения того же молекулярного веса. Циркуляция углеводородов в крови приводит к их распределению между тканями организма. Большинство ароматических соединений метаболизируются в печени, причем их биотрансформация не всегда сопровождается снижением токсичности. Это справедливо, например, для бенз(а)пирена и нафтадена, метаболиты которых являются сильными цитотоксиками и канцерогенами. Наблюдаемое повреждение печени мышей при продолжительной ингаляции нефтью может быть результатом воздействия на гепатоциты токсичных компонентов нефти и их метаболитов, а также системным токсическим эффектом.

Построение трендовой линии при графическом анализе данных позволяет рассчитать зависимость деструктивных изменений в печени мышей от продолжительности ингаляционного воздействия. Патологические изменения в печени, в первую очередь индекс альтерации и площадь некроза гепатоцитов, нарастают с продолжительностью ингаляционного воздействия парами нефти ($R^2 = 0,802$ и $R^2 = 0,696$ соответственно).

Негативные изменения в паренхиме сопровождаются параллельной реакцией со стороны микроциркуляторного русла и непаренхиматозных, стромальных, клеток печени. Состояние органа, при котором в равной степени отражены реакции повреждения и адаптационные процессы, обеспечиваемые рядом сложных механизмов в сохранных структурах, можно расценивать как адаптивное. Таким образом, поступление в организм мышей паров нативной нефти в течение 30 дней в дозе 7 мг/л приводит к повреждению части паренхимы печени и индуцирует формирование в печени комплекса защитно-приспособительных процессов, направленных на усиление функциональной активности гепатоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. «Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)» Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1996.
2. С., Роскин Г.И. Микроскопическая техника. – М. 1957.
3. Struwe, G., Knave, B., Mindus, P. Neuropsychiatric symptoms in workers occupationally exposed to jet fuel – a combined epidemiological and casuistic study // Acta Psychiatr. Scand. Suppl. – 1983. - № 303. – P. 55 – 67.
4. Безбородкина, Н.Н., Оковитый, С.В., Кудрявцев, Б.Н. Углеводный метаболизм при хронических поражениях печени. – СПб.: Синтез-Бук, 2008. – 176 с.
5. Маянский Д.Н., Кутина С.Н., И. Шимек. Резистентность печени к СС14 после стимуляции эндотоксином и продигозаном // Пат. физиология и эксп. терапия. - 1985. - №6. - С. 42 – 45.
6. Бонашевская, Т.И., Беляева, Н.Н. Гепатоцеллюлярные механизмы компенсаторных процессов при воздействии химических факторов окружающей среды // Гигиена и санитария. – 1991. - № 12. – С. 15 – 19.
7. Зоров, Д.Б., Банникова, С.Ю., Белоусов, В.В., Высоких, М.Ю., Зорова, Л.Д., Исаев, Н.К., Красников, Б.Ф., Плотников, Е.Ю. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. – 2005. – Т. 70, вып. 2. – С. 265 – 272.
8. Дядищева И.М., Мишнев О.Д., Щеголев А.И. Морфометрическая характеристика ацинусов печени собак при остром холецистите // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. - Том 135, №3. - С. 353 - 356.
9. Бродский, В.Я., Урываева, И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. – М.: Наука, 1981. – 259 с.
10. Бонашевская, Т.И. Пролиферация и полиплоидизация гепатоцитов как показатель регенерации печени при действии химических факторов окружающей среды // Гигиена и санитария – 1989. - № 3. – С. 48 – 52.
11. Зайчик, А.Ш., Чурилов, Л.П. Патохимия. Учебник для студентов медицинских вузов. – СПб.: ЭЛБИ – СПб, 2007 – 768 с.
12. Baldwin, C.M., Figueroa, A.J., Wright, L.S., Wong, S.S., Witten, M.L. Repeated aerosol-vapor JP-8 exposure affects neurobehavior and neurotransmitter levels in a rat model // J. Toxicol. Environ. Health A. – 2007. - № 70. – P. 1203 – 1213.

Жүргізілген морфологиялық және морфометриялық сараптама бойынша тышқанның бауырына мұнай буының әсері жануарлардың бауырын зақымдайтындығын көрсетті. Тәжірибеге алынған жануарлар бауырындағы аурудың кезеңдері өтетіндігі және мұнай буының әсері тікелей пропорциональды жалғасатындығы көрсетілді.

Obtained morphological and morphometric data showed that the inhalation exposure of mice to oil vapors lead to significant alterations in animal' liver. Intensity of pathological processes in liver of experimental animals is linear to exposure duration.