

УДК 615.917:616-018:616.36-002.2

Е.А. Карпова ¹, О.Г. Щукина ², В.В. Бенеманский ², О.П. Ильина ¹**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ПРЕПАРАТА НАНО-СЕЛЕНА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ**¹ ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия» (Иркутск)² ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия» (Ангарск)

В статье представлены сравнительные результаты морфологических и гистохимических исследований внутренних органов при токсическом поражении четыреххлористым углеродом и при их коррекции нанокмозитным препаратом селена. Показано, что препарат наноселена, полученный на матрице арабиногалактана, обладает гепатопротекторными свойствами, что проявляется в защитном действии гепатоцитов от токсического повреждения тетрахлорметаном. При этом сохраняется активность ферментов, гликогена, уменьшается содержание липидов.

Ключевые слова: тетрахлорметан, дистрофия, нано-селен, гепатопротектор

**PATHOMORPHOLOGICAL ESTIMATION OF BIOLOGICAL INFLUENCE
OF NANO-SELENIUM UNDER THE TOXIC AFFECTION OF LIVER**Е.А. Karpova ¹, O.G. Shchukina ², V.V. Benemanskiy ², O.P. Iljina ¹¹ Irkutsk State Agricultural Academy (Irkutsk)² Angarsk State Technical Academy (Angarsk)

The article presents the comparative results of morphological and histochemical studies of internal at the toxic affection caused by CCl_4 and at their correction by nanocomposite selenium. It was showed that nanoselenium obtained on the arabinogalactan matrix had hepatoprotective features that develop in the protective effect of hepatocytes from the toxic carbon tetrachloride damage. The activity of enzymes and glycogen remains, the lipid contents decreases.

Key words: carbon tetrachloride, dystrophy, nanoselenium, hepatoprotector

ВВЕДЕНИЕ

В создании лекарственных препаратов особое внимание уделяют размеру частиц. Диспергирование во многом изменяет фармакологическое действие препаратов. Привлекает особое внимание создание препаратов на основе токсичных веществ, которые бы в итоге обладали равной активностью, но со значительно меньшим повреждающим или токсическим действием. Так, известно, что селен является эссенциальным микроэлементом с узкими границами между терапевтической и токсической дозами.

Селен входит в активный центр фермента глутатионпероксидазы, участвует в антиоксидантной защите организма. Помимо этого, селен играет фундаментальную роль во многих метаболических функциях. Он участвует в поддержании иммунной системы [9, 12], улучшает подвижность сперматозоидов [10], активирует гормоны щитовидной железы [13, 14]; дефицит селена связан с повышенной заболеваемостью раком [11, 15]. Сочетание введенной дозы и химической формы селена играют важную роль в определении его токсичности [7].

Известен целый ряд неорганических и органических производных селена, однако проблема оптимальной обеспеченности организма этим микроэлементом ещё далека от разрешения. Особенно этот вопрос актуален в условиях Иркутской области – геохимическая провинция с низким содержанием селена и, как следствие недостаточное его содержание в организме животных и человека,

где этот микроэлемент выполняет ряд важных физиологических функций.

В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского получены и наработаны лабораторные партии оригинальных нанобиокмозитов – элементный селен/ арабиногалактан, перспективных для визуальной флуоресцентной диагностики и лечения в биомедицине [5]. Изучение действия на организм животных данного нанобиокмозита явилось целью нашего исследования.

Применение методов оценки состояния различных органов и тканей, а следовательно, и целостного организма при действии CCl_4 , требует глубокого понимания множества физиологических процессов, направленных на поддержание гомеостаза. Как правило, характер ответной реакции напрямую связан с морфофункциональным состоянием той или иной ткани организма.

Для более детального исследования ответной реакции организма на действие CCl_4 и введения нано-Se была выбрана печень. Этот орган способен накапливать скрытые повреждения, которые проявляются в ближайшие или отдаленные сроки. Повреждающее действие на печень проявляется в повышении активности печеночных ферментов (сукцинатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы), гипогликемии, а морфологически – в развитии жировой, белковой, гидрической дистрофии и гибели гепатоцитов.

Целью настоящего исследования явились комплексное изучение морфофункционального

состояния регенерирующей и интактной печени крыс после токсического поражения печени CCl_4 и её коррекция препаратом наноселена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования были проведены на крысах породы Вистар массой 180–220 г, разводимых в виварии отдела токсикологии Ангарской государственной технической академии (ветеринарное удостоверение 238 № 0018942 от 22 ноября 2011 г.), в осенне-зимний период.

Животные были разделены на 4 группы. Токсическое поражение печени воспроизводили четыреххлористым углеродом, который вводили в 50% масляном растворе подкожно в объеме 0,4 мл/100 г массы крысы в течение 4 дней [8]. Первой группе воспроизводили только поражение печени. Второй группе арабиногалактан (АГ) вводили перорально с помощью зонда в дозе 20 мг/100 г массы животного [1]. Третьей группе нано-Se вводили также перорально с помощью зонда в дозе 2 мг/100 г массы животного (исходя из информации о содержании селена и эффективных доз селенита натрия) (табл. 1). Материал для исследования забирали на 7-е и 14-е сутки. Контролем служили интактные крысы, выращенные в тех же условиях вивария. Введение изучаемых веществ осуществляли за 1 час до применения гепатотоксина [8].

Таблица 1

Дизайн эксперимента

Воздействие на животных	Число особей (n)
CCl_4	10
CCl_4 + АГ	10
CCl_4 + НаноSe	10
Интактные животные	10

После декапитации животных брали образцы печени, мозга для гистологического и гистохимического исследования. Органы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина для последующей гистологической обработки. Для гистохимического исследования образцы нефиксированной ткани печени замораживали в криостате и готовили срезы. В органах определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по Нахласу, щелочной фосфатазы (ЩФ) методом азосочетания, содержание гликоген по методу Шифф-йодной реакции, липидов – окраской суданом черным. Исследования проводили в Ангарской государственной технической академии, согласно применяемым техникам окраски [3, 4, 6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При микроскопическом исследовании на 7-й день эксперимента в группе CCl_4 в печени отмечены проявления выраженной жировой дистрофии гепатоцитов в области центральных вен, что подтверждается гистохимическими исследованиями. Гепатоциты увеличены в размере, с округлыми вакуолями различных размеров со смещением ядра

к клеточной мембране. Большинство гепатоцитов с практически опустошенной цитоплазмой, пикнотичными и гиперхромными ядрами, что свидетельствует о состоянии паранекроза. По периферии этих очагов гепатоциты были меньшего размера с гиперхромным ядром (рис. 1А). На 7-й день эксперимента в группе нано-Se в печени отмечается средне- и мелкокапельная жировая инфильтрация вокруг центральных вен (рис. 1Б). Размер гепатоцитов практически соответствовал интактным животным. Встречаются лишь отдельные гепатоциты в состоянии паранекроза с опустошенной цитоплазмой и гиперхромным пикнотичным ядром. Биллиарный эпителий не был изменен, воспалительных инфильтратов не отмечено, также не отмечено застойного полнокровия в магистральных сосудах и капиллярах.

На 14-й день эксперимента в группе животных нано-Se гепатоциты без выраженной зернистой дистрофии имеют более менее мономорфные размеры с хорошо выраженным ядром и равномерно распределенным хроматином (рис. 1Г). Гепатоциты с гиперхромным ядром очень редки. Магистральные сосуды и синусоиды свободны от элементов крови.

Также выявленное скопление липидов было подтверждено гистохимическим исследованием (рис. 2А, Б). На 7-е сутки эксперимента при исследовании на общие липиды в группе CCl_4 – очаги ярко-выраженной жировой инфильтрации. При введении нано-Se – очаги инфильтрации липидов значительно меньших размеров и не так явно выражены. Содержание общих липидов на 14-е сутки (рис. 2Б) – выраженное отсутствие образования липидов в клетках печени при коррекции препаратом нано-Se токсического поражения печени (рис. 2Б (2)).

На 7-е сутки эксперимента в группе CCl_4 активность щелочной фосфатазы увеличена как в желчных капиллярах, так и в магистральных желчных протоках (рис. 2В (1)). В опытной группе активность ЩФ заметно снижена (рис. 2В (2)), на 14-й день эксперимента она сохраняется, но в норму приходит не полностью.

Поскольку арабиногалактан сам обладает мембранотропными свойствами и оказывает протективное действие на гепатоциты, представилось интересным сравнение действия чистого арабиногалактана на гепатоциты с действием препарата нано-Se, где элементный Se встроен в решетку арабиногалактана.

Содержание гликогена в печени в обеих группах на 7-й день эксперимента оставалось выше, чем в группе CCl_4 . В группе АГ и нано-Se отмечено диффузное снижение гликогена. На 14-й день эксперимента гликоген приходит в норму. В группе АГ все так же заметно его снижение, по сравнению с интактными животными. Однако в группе нано-Se содержание гликогена на 14-й день эксперимента даже значительно выше, чем у интактных животных (рис. 3А, Б).

Активность сукцинатдегидрогеназы заметно увеличена в группе АГ (рис. 3В (2)), по сравнению с группой CCl_4 (рис. 3В (1)).

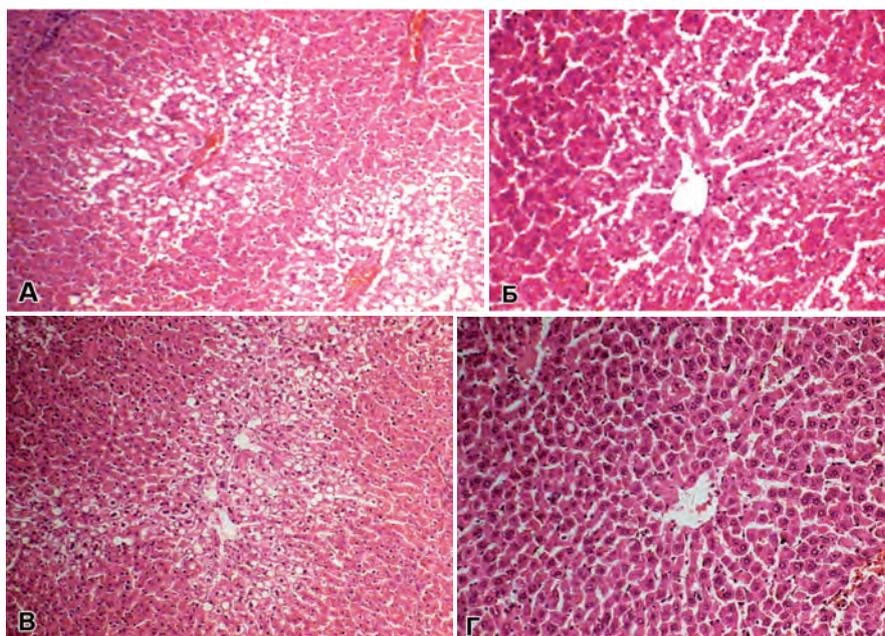


Рис. 1. Печень крысы: **А** – CCl_4 (7-е сутки эксперимента); **Б** – CCl_4 + нано-Se (7-е сутки эксперимента), небольшое расширение синусоидов, отсутствует гемодинамическое расстройство, в цитоплазме выявляются вакуоли (м.б. гидропическая дистрофия); **В** – CCl_4 (14-е сутки эксперимента); **Г** – CCl_4 + нано-Se (14-е сутки эксперимента). Окраска гематоксилин-эозином.

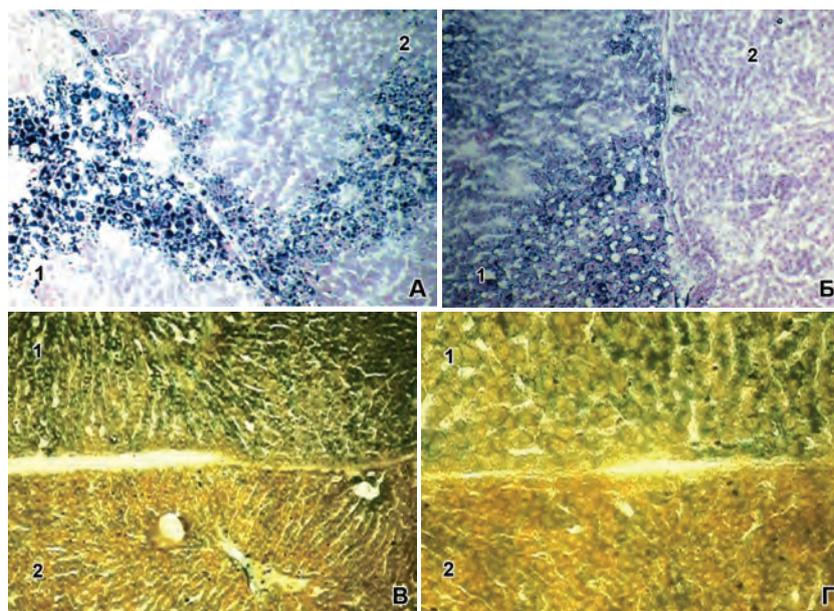


Рис. 2. Выраженное скопление липидов в области центральных вен на 7-е (**А**) и 14-е (**Б**) сутки эксперимента, окраска суданом черным; определение активности ЩФ на 7-е (**Б**) и 14-е (**Г**) сутки эксперимента, окраска методом азосочетания. **1** – группа CCl_4 ; **2** – опытная группа нано-Se.

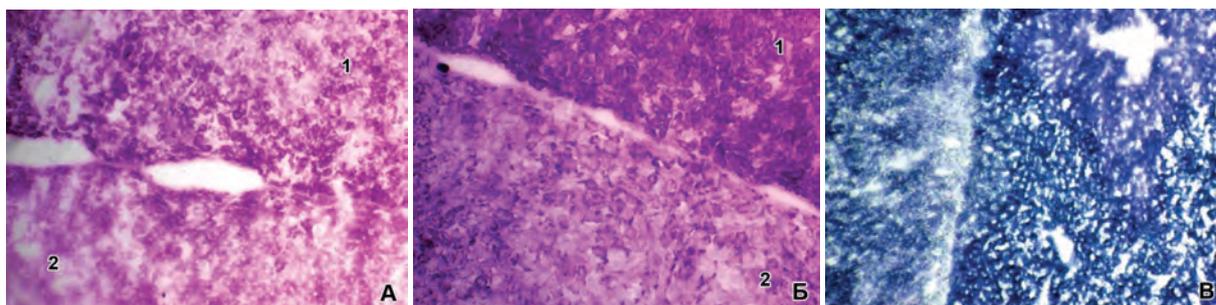


Рис. 3. Гликоген на 7-е (**А**) и 14-е (**Б**) сутки, окраска методом Шиффа: **1** – действие нано-Se; **2** – действие арабиногалактана. Определение СДГ по Нахласу (**В**): **1** – выраженное снижение активности сукцинатдегидрогеназы в печени при воздействии CCl_4 ; **2** – АГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, рассматривая особенности течения патологического процесса в организме при интоксикации CCl_4 , следует отметить выраженность дегенеративных процессов в печени и головном мозге [2], что было подтверждено в нашем опыте. CCl_4 вызывает изменения ткани печени, наибольшей чувствительностью к повреждающему действию токсического агента обладают гепатоциты. Некротические и дистрофические процессы в них наиболее выражены на 1–3-е сутки эксперимента после отравления, это отражается в изменении ультраструктуры и морфологии клеток печени, резком снижении содержания гликогена, увеличении синтеза нейтрального жира и развитии жировой инфильтрации.

Под влиянием CCl_4 угнетается пролиферация гепатоцитов и последующая их цитодифференцировка, образуются многочисленные атипичные митозы, замедляется формирование печеночных балок [8]. В то же время при профилактическом введении АГ и в большей степени – препарата nano-Se отмечается значительный положительный эффект как на уровне метаболических процессах (нормализация активности ферментов в печени: СДГ, ЩФ и содержание гликогена и липидов), так и в морфоструктуре гепатоцитов. При данном токсическом воздействии печень является наиболее чувствительным к повреждению органом, определяющим дальнейшую патологию организма. В связи с этим профилактическое и лечебное применение АГ и, в большей степени, nano-Se улучшает морфофункциональное состояние печени.

ВЫВОДЫ

1. АГ снижает токсическое воздействие CCl_4 на печень и на организм в целом.

2. Nano-Se в значительной степени снижает токсическое воздействие CCl_4 на печень, что проявляется в меньшей степени дегенерации гепатоцитов, уменьшении жировой дистрофии и нормализации активности ферментов в цитоплазме гепатоцитов.

3. Восстановительном периоде (14-е сутки после воздействия) морфологически структура печени, а также метаболические процессы (активность СДГ, ЩФ, содержание гликогена и общих липидов) при введении nano-Se в незначительной степени отличались от аналогичных показателей у интактных животных.

4. Гибель паренхимы при хроническом гепатите высокой степени активности проявляется некрозом клеток печени (рис. 1). Скопление апоптических и атрофированных гепатоцитов с застоем в синусоидах также заметно снижалось при коррекции поражения нанопрепаратом. Метаболическая гетерогенность, которая наблюдается при зональных повреждениях печени при токсическом воздействии углеводов, была слабо выражена или вовсе не выражена после дачи крысам nano-Se.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуцол Л.О. Патогенетическое обоснование применения арабиногалактана для коррекции нарушений в печени при интоксикациях фенолгидрозином и этиленгликолем: дис. ... канд. биол. наук: 14.00.16. – Иркутск, 2006. – 165 с.
2. Дядик В.П., Бычкова В.И., Перикисное окисление липидов и их обмен при вирусном гепатите // *Врачебное дело.* – 1986. – № 11. – С. 114–117.
3. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники; 5-е изд-е. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.
4. Основы гистологии и гистологической техники / Под ред. В.Г. Елисеева, М.Я. Субботина и др. – М.: Медицина, 1967. – 268 с.
5. Отчетный доклад РАН: научные достижения РАН в 2011 году. – М.: Наука, 2012. – С. 42.
6. Пирс Э. Гистохимия / Под ред. проф. В.В. Португалова. – М.: Изд-во иностранной лит., 1962. – 962 с.
7. Струев И.В., Симахов Р.В. Селен, его влияние на организм и использование в медицине / Под ред. Н.Н. Ильинских // *Естествознание и гуманизм.* – Томск, 2006. – Т. 3. – Вып. 2.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; 2-е изд., перераб. и доп. / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
9. Corazza A., Boffito C. Mercury dosing solutions for fluorescent lamps // *J. Physics. D-Applied Physics.* – 2008. – Vol. 41.
10. Eckelman M.J., Anastas P.T., Zimmerman J.B. Spatial assessment of net mercury emissions from the use of fluorescent bulbs // *Environmental Science & Technology.* – 2008. – Vol. 42. – P. 8564–8570.
11. Engelhaupt E. Do compact fluorescent bulbs reduce mercury pollution? // *Environmental Science & Technology.* – 2008. – Vol. 42. – P. 8176–8176.
12. Griffiths C., McGartland A., Miller M.A. Comparison of the monetized impact of IQ decrements from mercury emissions // *Environ. Health Perspect.* – 2007. – Vol. 115. – P. 841–847.
13. Hildenbrand V.D., Denissen C.J.M., van der Pol A., Hendriks A.H.C. et al. Reduction of mercury loss in fluorescent lamps coated with thin metaloxide films // *J. Electrochem. Soc.* – 2003. – Vol. 150. – P. 147–155.
14. Johnson N.C., Manchester S., Sarin L., Gao Y.M. et al. Mercury vapor release from broken compact fluorescent lamps and in situ capture by new nanomaterial sorbents // *Environmental Science & Technology.* – 2008. – Vol. 42. – P. 5772–5778.
15. Ralston N. Nanomaterials: Nano-selenium captures mercury // *Nature Nanotechnology.* – 2008. – P. 527–528.

Сведения об авторах

Карпова Екатерина Александровна – аспирант кафедры анатомии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия» (664038, п. Молодежный; e-mail: katerinka200488@gmail.com)

Щукина Ольга Геннадьевна – младший научный сотрудник ИЛЦ НИИ биофизики при ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия» (665830, г. Ангарск, ул. Партизанская, 2; тел.: 8 (3955) 95-70-74; e-mail: olga.shukina.81@mail.ru)

Бенеманский Виктор Викторович – доктор медицинских наук, профессор кафедры экологии и безопасности деятельности человека, ведущий научный сотрудник ИЛЦ ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия»

Ильина Ольга Петровна – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры анатомии и ветеринарно-санитарной экспертизы, декан факультета биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия»