

УДК 615.099

В.В. Захаренков ¹, Л.Г. Горохова ¹, О.И. Бондарев ², М.С. Бугаева ²**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРЕПАРАТАМИ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВОГО РЯДА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)**¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (Новокузнецк)² ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Минздравсоцразвития РФ (Новокузнецк)

В эксперименте изучены морфологические изменения тканей и органов при субхронической интоксикации белых крыс синтетическими лекарственными препаратами ряда 1,4-бензодиазепинов: алпразоломом, мезапамом, диазепамом и нозепамом. Выявлены патоморфологические изменения тканей печени, почек, головного мозга, репродуктивной системы, которые могут привести к развитию производственно обусловленных заболеваний у работающих при производстве бензодиазепинов.

Ключевые слова: 1,4-бензодиазепины, хроническая токсичность, производственно обусловленная патология

MORPHOLOGICAL CHANGES IN ORGANS AND TISSUES AT SUBCHRONIC INTOXICATION WITH BENZODIAZEPINE MEDICATIONS (EXPERIMENTAL RESEARCHES)V.V. Zakharenkov ¹, L.G. Gorokhova ¹, O.I. Bondarev ², M.S. Bugaeva ²¹ Research Institute of Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases SB RAMS, Novokuznetsk² Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk

Morphological changes in tissues and organs at subchronic intoxication of white rats with 1,4-benzodiazepines synthetic medications (alprazolame, mezapame, diazepam, and nozepam) are studied in an experiment. Pathomorphological changes in tissues of liver, kidneys, brain and reproductive system that can lead to the development of industrially caused diseases in the employees of benzodiazepines production are revealed.

Key words: 1,4-benzodiazepines, chronic toxicity, industrially caused pathology

Работники фармацевтических предприятий относятся к специфической группе риска, испытывающей двойную нагрузку внешних неблагоприятных факторов: в условиях среды обитания и в процессе трудовой деятельности [1]. Наиболее часто причиной профессиональных хронических отравлений является длительная работа в условиях относительно невысоких концентраций вредных веществ. Медико-биологические исследования влияния химических соединений на организм включают большой диапазон показателей и оценок, но среди них обязательным является доклинический этап выявления хронического действия, определение органов-мишеней и получение данных о функциональной целостности различных систем организма. Важным является не только адекватное приближение изучаемой модели к патологии человека, но и представление о характере и глубине действия, токсикологических особенностях используемых химических веществ, информативность, доступность методов диагностики. Морфологические аспекты проблемы хронической интоксикации лекарственными препаратами в условиях производства могут дать основание для разработки оптимальных методов лечения, диагностики и прогнозирования патологических процессов, протекающих на фоне интоксикации.

В большой группе синтетических лекарственных препаратов особое место занимают соединения бензодиазепинового ряда, среди которых найдено много биологически активных веществ. Бензодиазепины вошли в медицинскую практику почти полвека назад. Они эффективны при широком спектре заболеваний, безопасны в комбинации с другими препаратами и при передозировке, поэтому по сей день остаются наиболее широко применяемыми во всем мире [8, 10]. Спектр их фармакологической активности, кроме специфического анксиолитического эффекта, включает другие проявления действия – противосудорожное, седативное, миорелаксантное [3, 5, 7, 9]. Многократное и длительное воздействие данных соединений в условиях химико-фармацевтического производства может быть причиной формирования производственно обусловленных и профессиональных заболеваний. В задачу нашей работы входило сравнительное изучение морфологических особенностей и тканей и органов в условиях интоксикации препаратами бензодиазепинового ряда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования был взят ряд производных бензодиазепина: 8-хлор-1-метил-6-фенил-4Н-5-триазоло[4,3-а][1,4]-бензодиазепин (Алпразолом); 7-хлор-2,3-дигидро-1-метил-5-фенил-

1Н-1,4-бензодиазепин (Мезапам); 7-хлор-1-метил-5-фенил-1,3-дигидро-2Н- 1,4-бензодиазепин-2-он (Диазепам); 7-хлор-1,3-дигидро-3-окси-5-фенил-2Н-1,4-бензодиазепин-3-он (нозепам).

Эксперименты выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 года № 755). Постановка опытов, питание и содержание животных соответствовали требованиям МУ ГН I.I.726-98 «Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населённых мест и воде водных объектов». Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и корму.

Нашими ранними исследованиями были установлены показатели острой токсичности производных бензодиазепина. На белых лабораторных крысах была определена средняя смертельная доза (LD_{50}) при введении в желудок. Все изучаемые соединения по величине LD_{50} являются умеренно токсичными [4]. Для оценки морфологических изменений в строении органов и тканей под воздействием изучаемых веществ проведен субхронический эксперимент. Исследования велись на 80 белых беспородных крысах (массой 180–250 г), имеющих вариативный спектр биохимических показателей, не выходящих за пределы физиологической нормы. Каждое вещество в количестве 0,1 LD_{50} в виде 20% масляного раствора в течение 4 недель вводилось опытным крысам, контрольные получали растворитель (масло) в такой же дозе. Для изучаемых веществ эта доза составила: 160 мг/кг — для алпразолама, 223,5 мг/кг — для мезапама, 560 мг/кг и 220 мг/кг — для диазепам.

В соответствии с «Морфофункциональными исследованиями в гигиене» [2, 6] изучались следующие органы экспериментальных животных: головной мозг, сердце, легкие, печень, почки, селезенка, желудок, поджелудочная железа, щитовидная железа. Кусочки фиксировали 12% нейтральным формалином и проводили в парафине. Готовили срезы толщиной 5–7 мкм. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии на «Nicon Eclipse E 200», с передачей цифрового изображения на монитор и обработкой с помощью программы «Bio Vision 4.0»

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологические исследования ответной реакции на токсическое действие лекарственных препаратов класса 1,4-бензодиазепинов показали органоспецифические изменения морфологического состояния разной степени выраженности. У крыс после окончания подострого отравления мезапамом отмечено достоверное увеличение коэффициентов массы печени в 1,5 раза (опыт — $40,3 \pm 1,98$; контроль — $29,0 \pm 1,5$), при этом ткань имела дряблую консистенцию желто-коричневого

цвета. Отмечено увеличение размеров щитовидной железы. При морфологическом исследовании органов животных после окончания подострого эксперимента с диазепамом выявлено достоверное увеличение коэффициентов массы почек в 1,7 раза ($9,0 \pm 0,8$ — опыт и $5,2 \pm 0,04$ — контроль) и уменьшение коэффициента массы селезенки в 2 раза ($1,85 \pm 0,09$ — опыт; $3,67 \pm 0,06$ — контроль). Коэффициенты массы печени и почек животных, получавших алпразолам, были увеличены в 1,2 и 1,3 раза соответственно, по сравнению с контролем. Коэффициенты массы внутренних органов у животных, получавших нозепам, не отличались от контроля.

Печень занимает ключевые позиции в поддержании гомеостаза организма, особенно в условиях хронической интоксикации. При микроскопическом исследовании на срезах ткани **печени** опытных крыс всех 4 групп наблюдалось сохранение балочного и долькового строения. Содержание гликогена в цитоплазме печеночных клеток уменьшено по сравнению с контролем. Гепатоциты с резко выраженными дистрофическими изменениями различной степени: зернистыми и баллонными, с оптически пустой расширенной цитоплазмой и пикноморфными ядрами. В отдельных участках печени животных, затравленных алпразоламом, имеются мелкофокусные мультифокальные некрозы, которые захватывают группы гепатоцитов в количестве 5–7. Зоны некроза характеризуются отсутствием ядра, разрушением цитоплазмы, наличием «клеток-теней», а также немногочисленных зернистых лейкоцитов (рис. 1).

На отдельных участках в ткани четкие признаки пролиферации клеток ретикуло-гистиоцитарной системы (клетки Купфера) как проявление компенсаторно-приспособительной реакции организма на действие токсикантов. В портальных трактах наблюдалась инфильтрация, умеренно выраженный фиброз. Все это свидетельствует о развитии умеренно выраженного токсического стеатогепатоза.

Почки как основной эффектор системы регуляции водно-солевого обмена включаются в патогенез хронических отравлений на самых ранних стадиях и именно поэтому крайне подвержены повреждающему воздействию ксенобиотиков. В **почках** животных всех групп изменения были однотипными. Клубочки с резко выраженным полнокровием капиллярных петель. Просвет капсул Шумлянско-го — Боумена расширен, спаек и шварт не выявлено. Наблюдалась слабо выраженная реакция клеток мезангиума. Межуточная строма с расширенными полнокровными сосудами микроциркуляторного русла (МЦР), в которых отмечено явление стаза эритроцитов (рис. 1). Сосуды мелкого калибра с утолщенными стенками за счет плазморрагии. Отмечено набухание эпителия канальцев почек и наличие в просвете рыхлых белковых масс. Канальцы с диффузными, местами дистрофическими изменениями нефроэпителия. На срезе прослеживались пикнотичные ядра со слабым окрашиванием, часть

ядер не прокрашивалась. Апикальная поверхность клеток фестончатая с разрушениями.

Бензодиазепины гематогенным путем попадают в головной мозг, молекулярный механизм центрального действия препаратов определяется взаимодействием молекул со специфическими бензодиазепиновыми рецепторами в субсинаптической мембране нейронов. В тканях **головного мозга** всех экспериментальных групп обнаружены диффузно-дистрофические изменения нейронов (нейронофагия), зональное выпадение отдельных нейронов, глиальные рубцы, гиперхроматоз части нейронов, пикноз отдельных ядер и рексис отдельных клеток. В тканях отмечалось неравномерно выраженное полнокровие сосудов МЦР, признаки периваскулярного и перичеллюлярного отека. Отмечались признаки отека мягко-мозговых оболочек (рис. 2). Оболочки мозга отечные, с резко выраженным полнокровием сосудов венозного и артериального типа. Воспалительных инфильтраций и других патологических изменений в оболочке не выявлено.

Расстройства функции сердечно-сосудистой системы могут быть связаны как с непосредственным токсическим действием на ее звенья, так и с нарушением деятельности других органов и систем. В строении **сердца** крыс, затравленных препаратами ряда 1,4-бензодиазепинов прослеживались изменения различной степени выраженности. Кардиомиоциты тонкие с подчеркнутой исчерченностью, с явлениями фрагментации и нечетко выраженных «лестничных изломов». На отдельных участках в миокарде встречаются зоны метаболического повреждения в виде метахроматозии групп кардиомиоцитов, патологической извитости отдельных волокон и кариолизиса части ядер в отдельных волокнах.

Межмышечные пространства несколько расширены с резко выраженным полнокровием сосудов микроциркуляторного русла (рис. 2). Сосуды с утолщенными стенками за счет гипертрофии клеток мышечного слоя, единичной инфильтрации лимфоидными элементами. В просвете сосудов – скопление эритроцитов с признаками стаза и

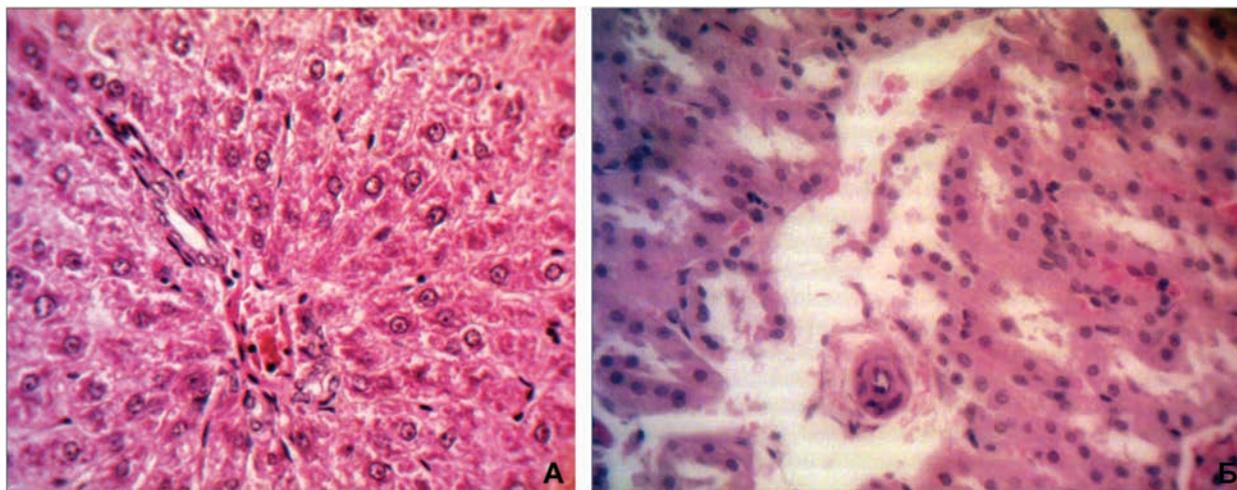


Рис. 1. Влияние затравки алпразоломом на морфологические изменения печени (А) и почек (Б) крыс через 4 недели эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; ув. × 20. Световая микроскопия, «Nicon Eclipse E 200».

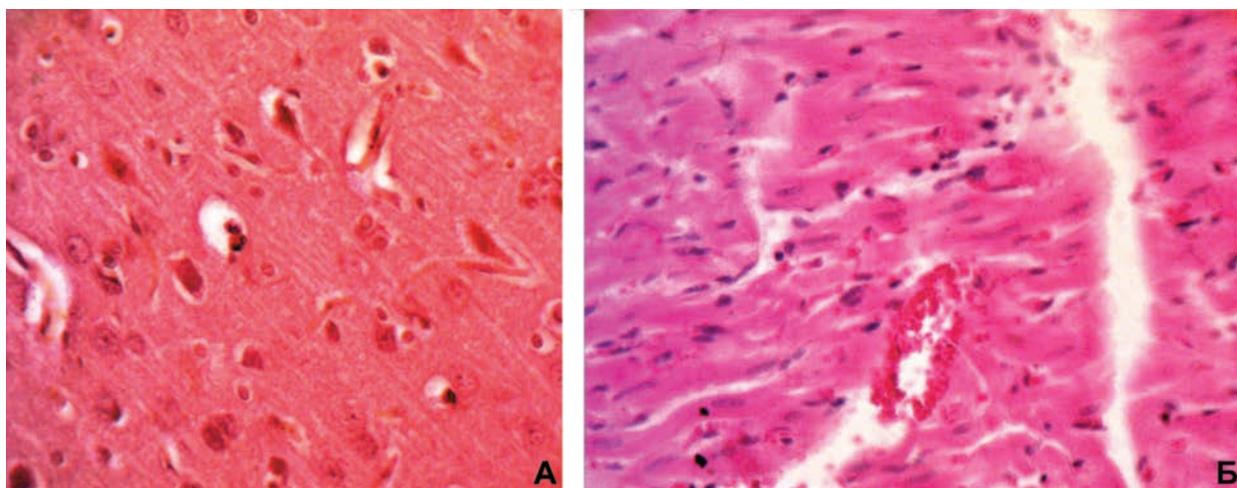


Рис. 2. Влияние затравки алпразоломом и диазепином на морфологические изменения тканей головного мозга (А) и сердца (Б) крыс на 20-е сутки подострого эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; ув. × 20. Световая микроскопия, «Nicon Eclipse E 200».

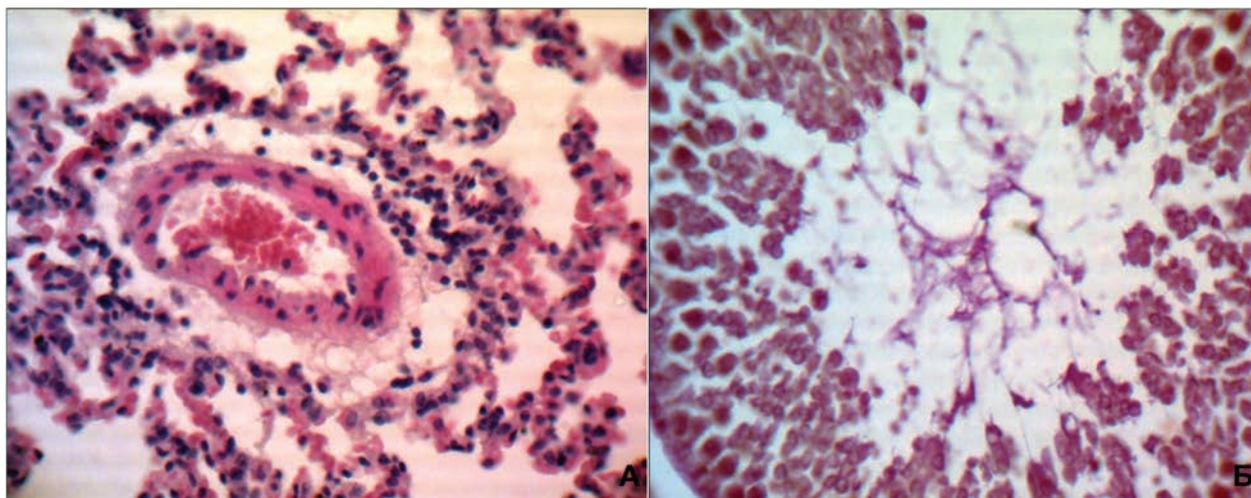


Рис. 3. Влияние затравки алпрозоламом и диазепином на морфологические изменения ткани легких (А) и яичка (Б) крыс на 20-е сутки подострого эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; ув. $\times 20$. Световая микроскопия, «Nicon Eclipse E 200».

сладжа. Часть сосудов с явлениями вазодилатации и периваскулярными кровоизлияниями.

В ткани **легких** встречалось неравномерно выраженное полнокровие сосудов МЦР с участками ателектазов и дисателектазов. Межальвеолярные перегородки утолщены за счет пролиферации гистиоцитарных элементов, расширения и полнокровия сосудов и лимфоцитарной инфильтрации серозного характера. В отдельных ацинусах отмечается наличие «гемморагических» отеков, затрагивающих до 2–3 ацинарных структур. На отдельных участках в части сегментов в просвете альвеол имелось значительное количество макрофагов (рис. 2). В периваскулярных пространствах — четко выраженный периваскулярный отек, умеренно выраженный фиброз; встречается очаговая лимфоплазмоцитарная инфильтрация.

Бронхи — с неровной фестончатой поверхностью. Бронхиальный эпителий высокий, цилиндрический с бокаловидными клетками. В просвете бронхов — слизь, макрофаги и незначительное количество лимфоидных элементов. В стенке бронхов встречались умеренно выраженный фиброз, гиперплазия средней оболочки бронха, диффузно очаговая лимфоцитарная инфильтрация с формированием мелких фолликулоподобных структур. В перибронхиальных пространствах — наличие признаков дезорганизации коллагена. Среди коллагеновых волокон встречаются клетки иммунной системы в виде зрелых лимфоидных элементов и немногочисленных эозинофилов.

Многие ксенобиотики могут вызвать временную или постоянную потерю способности к оплодотворению вследствие нарушения сперматогенеза, подвижности и транспорта сперматозоидов по протокам, консистенции спермы и т.д. В тканях **яичка** при отравлении алпрозоламом наблюдались признаки гипофункционального состояния (рис. 3). Семенные канальцы различной формы, выстланы клетками сперматогенного эпителия, которые увеличены в размерах, с гиперхромными

ядрами, формируют 2–3 ряда. Внутренний слой представлен клеточным некротическим детритом без признаков активного сперматогенеза и зрелых сперматозоидов, с белковым экссудатом. Между канальцами отмечено наличие соединительнотканых прослоек с расширенными сосудами. Стенки сосудов утолщены, склерозированы. В части сосудов — явления ангиоспазма (фестончатый просвет, утолщенная базальная мембрана, гипертрофия медиального слоя).

В **селезенке** опытных крыс, переживших отравление бензодиазепинами, встречались крупные лимфоидные фолликулы с наличием светлых реактивных центров (лимфоидные элементы зрелого типа). Красная пульпа резко полнокровная. Капсула, фиброзные тяжи и сосуды — утолщены, гиалинизированы.

В срезах **слизистой желудка** отмечалась диффузная лимфоцитарная инфильтрация. Слизистая не уплощена, желудочные валки тонкие, покровно-ямочный эпителий кубический, с оксифильной цитоплазмой и ровным апикальным краем. Стратификация слоев сохранена. Мышечный слой без воспалительной инфильтрации, пучки структурированные, четко прослеживаются.

Таким образом, при хронических интоксикациях препаратами ряда 1,4-бензодиазепинов возможен риск развития производственно-обусловленной патологии, прежде всего гепатorenальной системы, несмотря на то, что бензодиазепиновые соединения являются умеренно токсичными веществами, согласно ГОСТ 12.1.007-76. Длительное поступление данных соединений, даже в малых дозах, в организм работающих в химико-фармацевтическом производстве может вызывать клинически значимые необратимые поражения печени и почек, нарушения репродуктивной функции. Поэтому необходимо свести к минимуму контакт с данными веществами на предприятиях фармацевтической промышленности. Полученные сведения о токсичности изученных веществ могут

быть использованы для контроля за качеством производственной среды с целью создания безопасных условий труда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников И.И., Лойт А.О., Савченков М.Ф. Экологическая токсикология. — Иркутск: Изд-во Иркутского университета, 1991. — 61 с.

2. Бонашевская Т.И., Беляева Н.Н., Кумпан Н.Б., Панасюк Л.В. Морфофункциональные исследования в гигиене. — М.: Медицина, 1984. — 160 с.

3. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Экспериментальное изучение препаратов с транквилизирующим (анксиолитическим) действием // Вед. фарм. комитета. — 1998. — № 2. — С. 19—24.

4. Горохова Л.Г., Мартынова Н.А. Биохимический профиль сыворотки крови крыс при интоксикации бензодиазепиновыми соединениями // Влияние окружающей и производственной среды на здоровье человека. Пути решения проблемы: Мат. XLVII науч.-практ. конф. «Гигиена, организация

здравоохранения и профпатология». — Кемерово: Примула, 2012. — С. 106—108.

5. Данилов Д.С. Применение клозапина при лечении шизофрении. — М. — Новокузнецк: Органика, 2010. — 48 с.

6. Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. — СПб.: Кроф, 2005. — 48 с.

7. Точилов В.А. Анксиолитики — недостающее звено в терапии психозов // Психиатрия и психофармакотерапия. — 2006. — № 4. — С. 54—59.

8. Четвериков В.П. Алпразолам в лечении пограничных нервно-психических расстройств // Врач. — 2003. — № 5. — С. 45—47.

9. Fedoroff I.C., Taylor S. Psychological and pharmacological treatments of social phobia: a metaanalysis // J. Clin. Psychopharmacol. — 2001. — Vol. 21, N 3. — P. 311—324.

10. Pollack M.H. Optimizing pharmacotherapy of generalized anxiety disorder to achieve remission // J. Clin. Psychiatry. — 2001. — Vol. 62, Suppl. 19. — P. 20—25.

Сведения об авторах

Захаренков Василий Васильевич — доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел.: 8 (3843) 71-63-75)

Горохова Лариса Геннадьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (тел.: 8 (3843) 71-63-75; e-mail: ponomarikova@mail.ru)

Бондарев Олег Иванович — кандидат медицинских наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией патологической анатомии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Минздравсоцразвития РФ (654005, г. Новокузнецк, пр. Строителей, 5; тел.: 8 (3843) 45-56-41)

Бугаева Мария Сергеевна — научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патологической анатомии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Минздравсоцразвития РФ (тел.: 8 (3843) 45-56-41)