

МОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ ОДНОЧАСНОМУ ВВЕДЕННІ ГЛУТАРГІНУ І ПЕСТИЦИДУ 2,4-Д В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Г.Б.Кулинич

Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. – проф. С.Б.Герашенко) Івано-Франківського національного медичного університету

Резюме. В експерименті на білих щурах встановлено, що при одночасному введенні глютаргін та пестициду 2,4-Д через місяць спостерігається поступове зменшення токсичних проявів у гепатоцитах, площа ядер і клітин нормалізується. Через 2 місяці виявлено ознаки зриву стабільності гістологічної та морфометричної картини печінки: більша кількість гепатоцитів мала площу як у контролі, площа ядер не досягла контролю, ядерно-клітинне співвідношення порушилося, ядра деформувалися, повноцінної корекції стану печінки не настало.

Ключові слова: гепатоцити, морфометрія, пестицид 2,4-Д, глютаргін.

Пестициди широко використовуються в сільському господарстві. Без застосування пестицидів втрата врожаю може досягти 50% через хвороби рослин, наявність збудників і бур'янів [1]. Водночас діючі речовини пестицидів, які містяться в агрохімікатах, мають властивість кумулюватися в біологічних середовищах людини. Після використання вони надалі циркулюють у навколишньому середовищі, забруднюючи ґрунт, поверхневі водні ресурси, продукцію рослинництва і тваринництва [2]. Це значною мірою впливає на природні умови життя людей, підвищує рівень захворюваності населення, суттєво змінює якість довкілля [3].

Пестициди негативно впливають на гепатобіліарну систему [4]. Пестицид 2,4-Д викликає пошкодження цитоархітекtonіки печінки, має токсичний вплив на її гемомікроциркуляторне русло [5], порушує систему антиоксидантного захисту [4]. Це спонукає до пошуку гепатопротекторних засобів для можливого корегування пестицидіндукованих порушень морфофункціонального стану печінки. Одним з таких вітчизняних препаратів є глютаргін, що являє собою сіль двох амінокислот, має детоксикаційні та гепатопротекторні властивості і в клінічній практиці застосовується для лікування токсичних гепатитів [6-8].

Мета дослідження: вивчити морфометричні показники гепатоцитів (Гц) під впливом

пестициду 2,4-Д і можливості корегування пестицидіндукованих змін печінки глютаргінном.

Матеріал і методи. Експерименти проведені на 66 білих рандомбредних щурах-самцях (*Rattus Norvegicus L.*) масою 150-180 г. Тривалість експерименту становила 3-60 діб. Тварин поділили на 3 групи. Щурам першої (дослідної) групи (24 тварини) вводили пестицид 2,4-Д (амінну сіль) – комерційний препарат 2,4-Д 700 – ефективний гербіцид на основі 2,4-Д диметиламінної солі, внутрішньошлунково в дозі 1/10 DL50, за допомогою металічного зонда через день протягом 14 діб (7 введень). Другій групі (24 тварини) вводили внутрішньошлунково пестицид 2,4-Д та глютаргін одночасно: пестицид 2,4-Д – 7 введень через день і 14 щоденних введень глютаргін, глютаргін продовжували вводити до 30-ї доби досліді. Тварини третьої (контрольної) групи (18) отримували по 0,5 мл дистильованої води інтрагастрально за допомогою зонда через день протягом 30 діб.

Тримання щурів та маніпуляції, які з ними проводилися, відповідали "Загальним етичним принципам експериментів на тваринах" (Київ, 2001). Тварин виводили з експерименту шляхом передозування ефірного наркозу. Шматочки печінки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, зрізи фарбували гематоксилином і еозином. Морфометричне дослідження проводили з використанням аналізатора зображень.

Для вимірювання метричних показників застосовували програмне забезпечення *UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00)* в інтерактивному режимі з застосуванням об'єктива Ч40 і фотоокуляра Ч1,7. Зображення фрагментів печінки, отримані шляхом послідовного сканування зрізів, записували як окремі *.tiff-файли з наступною реконструкцією. В інтерактивному режимі вимірювали площу (Sh) Гц і його ядра (Sn). Обчислювали відношення Sn/Sh, коефіцієнти форми Гц (Fh) і його ядра (Fn) ($F = P^2/4\pi S$, де P – периметр, S – площа досліджуваного об'єкта). У кожному препараті вимірювали метричні показники всіх одноядерних Гц, які були зрізані строго поперечно. Для обчислення вимірних параметрів і коефіцієнтів використовували електронні таблиці *Microsoft® Excel 2000*. Статистичний аналіз проводили за допомогою комп'ютерної системи *STATISTICA for Windows®* методами кореляційного аналізу з використанням t-критерію Ст'юдента для оцінки вірогідності відмінностей між значеннями метричних показників попарно вибраних груп. Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$.

Результати дослідження. Надходження в організм тварин пестициду 2,4-Д викликало в печінці морфофункціональні зміни, які можна визначити як токсичний гепатит [9]. Через 3 доби після одночасного введення 2,4-Д і глутаргіну печінкові балки дезорганізовані, Гц у їх складі набрякли. В ядрах Гц простежувалися периферійні грудочки гетерохроматину. Морфометричний аналіз показав збільшення кількості дрібних Гц (Sh від 140 до 280 мкм²) і зменшення великих клітин, особливо це стосувалося Гц з площею понад 360 мкм². Гістограма розподілу Гц за величиною показника площі мала унімодальний характер. Пік гістограми припадав на клітини з Sh=200,01 – 240,00 мкм², тоді як під впливом пестициду 2,4-Д Sh=280,01-320,00 мкм². Подібну тенденцію спостерігали і в розподілі Гц за площею ядра. Зростав відсоток ядер з Sn 10,01-40,00 мкм² і зменшувався відсоток ядер з Sn від 40,01 мкм². Гістограма розподілу за площею ядра мала унімодальний тип. Її пік належав показнику Sn=30,01-40,00 мкм², тоді як під впливом пестициду 2,4-Д Sn=40,01-50,00 мкм². Вивчаючи кореляційні зв'язки між показниками Sn і Sh, ми встановили, що між ними існувала слабка позитивна залежність ($r=0,130$, $p < 0,05$).

При аналізі показника, який характеризував відношення між Sn і Sh, виявлено, що в цей термін досліду кількість клітин із співвідношенням Sn/Sh мало відрізнялася між групами з введенням окремо пестициду 2,4-Д і одночасно пестициду 2,4-Д та глутаргіну. Гістограма розподілу Гц за величиною Sn/Sh мала унімодальний тип і не відрізнялася від контролю. Кореляційний аналіз між показниками Sn/Sh до Sh у цей термін досліду виявив слабкий обернено пропорційний зв'язок між ними ($r=-0,257$, $p < 0,05$). Морфометричний аналіз коефіцієнта форми Гц не показав значних відхилень у розподілі клітин за цим показником між досліджуваними групами, за винятком збільшення кількості Гц з Fh=1,1-1,2 і зменшенням – Fh=1,31-1,40. Кореляційний аналіз виявив слабкий прямо пропорційний зв'язок між Fh і Sh ($r=0,093$, $p < 0,05$) на відміну від слабого обернено пропорційного зв'язку при окремому введенні пестициду 2,4-Д ($r=-0,032$, $p < 0,05$). Форма ядер, про яку ми судимо за показником коефіцієнта Fn, змінилася в бік їх округлення. Збільшилася кількість Гц з Fn від 1,11 до 1,20 і зменшилася – від 1,21. Характер гістограми зберігався унімодальним. Між показниками коефіцієнта форми ядра і площі його профілю визначався слабкий прямо пропорційний зв'язок ($r=1,128$, $p < 0,05$).

Через 7 діб у всіх зонах часточок Гц перебували в різному функціональному стані. У Гц центральної зони цитоплазма еозинофільна, зерниста, проміжної зони – дрібновакуольна, а периферійної – з вакуолями середніх та великих розмірів. Через набряк Гц у першій зоні переважно спостерігалася дисконкомплексация печінкових балок, траплялися Гц у стані паранекрозу та некрозу.

Морфометричне дослідження порівняно з попереднім терміном виявило значне зменшення кількості Гц з великою Sh (280 і більше мкм²). Водночас зменшувалася кількість Гц з Sn (від 35,01 мкм²). Між вищезгаданими показниками визначався слабкий позитивний зв'язок ($r=0,424$, $p < 0,05$). Відношення Sn/Sh виявило незначні коливання в кількості клітин з певною величиною цього відношення і зумовило слабкий негативний зв'язок між Sn/Sh і Sh ($r=-0,560$, $p < 0,05$). У цей термін досліду розподіл клітин за Fh показав збільшення кількості Гц з показником Fh=1,31-1,45 при відсутності з Fh понад 1,46,

що визначило слабкий негативний зв'язок між Fh і Sh ($r=-0,063$, $p<0,05$). Форма ядра не зазнала помітних змін. Кореляційний зв'язок між Fh і Sn мав слабку негативну залежність ($r=-0,104$, $p<0,05$).

14-та доба експерименту характеризувалася "мозаїчною" картиною морфологічних змін у структурі печінки. Цито- і ангіоархітектоніка окремих печінкових часточок збережена, інші містили деформовані печінкові балки. Гц мали нечіткі контури, їх цитоплазма була заповнена дрібними прозорими вакуолями, траплялися некротизовані клітини. На периферії часточок часто ідентифікувалися двоядерні Гц. У цей час виявлено подальші зміни в розподілі Гц за показником Sh. Помітно зменшилося число Гц з Sh до 280 мкм², натомість зросло з Sh від 280,01 і більше мкм². Гістограма розподілу Гц за Sh зберегла унімодальний характер, але змістилася вправо. У розподілі кількості ядер за показником Sn ми встановили зростання відсотка ядер з Sn до 40 мкм² і зменшення з Sn від 40,01 мкм², відсутність ядер з Sn понад 60 мкм² і зсув гістограми вправо. При цьому кореляційний зв'язок між показниками Sn і Sh наблизився до прямо пропорційного середньої сили ($r=0,499$, $p<0,05$). На тлі односпрямованих змін кількості Гц за Sh та Sn відношення Sn/Sh виявило незначні відхилення від попередніх термінів дослідження. Однак кореляційний зв'язок між показником Sn/Sh і Sh змінився від середнього обернено пропорційного на 7-му добу до меншого – на 14-ту ($r=-0,435$, $p<0,05$). Процентний розподіл клітин за Fh на 14-ту добу наблизився до контролю. Кореляційний зв'язок між показником Fh і Sh був сильний і позитивний ($r=0,950$, $p<0,05$; 7-ма доба – слабкий негативний). Коефіцієнт Fh зазнав іншого характеру змін: помірно збільшилася порівняно з тим самим терміном введення тільки пестициду 2,4-Д, кількість ядер з Fh=1,05-1,20 зменшилася в сукупності – з Fh від 1,21 і, зокрема, не виявлено з Fh понад 1,3. Кореляційний зв'язок між показниками Fh і Sn був слабкий обернено пропорційний ($r=0,170$, $p<0,05$).

Через 21 добу (7 діб після останнього введення пестициду 2,4-Д і продовження введення глутаргіну) часточкова структура печінки визначалася добре. Печінкові балки та синусоїди переважно мали типовий радіальний напрямок. Зберігалася їхня дисконкомплексція на периферії

часточок. У Гц контури нечіткі, цитоплазма забарвлена еозинофільно і містить базофільну зернистість. Траплялися Гц з дрібними вакуолями. У всіх зонах печінкової часточки ідентифікувалися двоядерні Гц. Результати морфометричного аналізу свідчили про те, що порівняно з таким самим терміном введення пестициду 2,4-Д зменшилася кількість Гц з Sh до 200 мкм², зростала – від 200,01 до 280,0 мкм² і в сукупності зменшилася кількість клітин з Sh від 280,01 до 360,00 мкм², відсутні клітини з Sh понад 360 мкм². Аналогічні тенденції були помічені щодо кількості Гц з різною Sn, з відсутністю великих (понад 50,01 мкм²) ядер. Завдяки рівномірному розподілу кількості клітин за Sn та їх Sh відношення Sn/Sh виявило стабільність змін компонентів Гц, що мало відхилялися від контролю. Починаючи з 7-ї доби і до кінця експерименту кореляційний зв'язок між показниками Sn/Sh і Sh був негативний ($r=-0,564$, $p<0,05$) і з 21-ї доби змінився від слабкого до середнього. Аналізуючи показник Fh, зауважимо, що кількість клітин з показником Fh=1,1-1,3 зростала, а з Fh=1,31-1,50 зменшилася за відсутності таких з Fh понад 1,51, порівняно з таким самим терміном введення пестициду 2,4-Д. У подальших термінах дослідження повторно зростала кількість великих за Sh клітин і зменшилася кількість великих за Sn Гц. Оцінюючи ступінь кореляційних зв'язків між показником Fh і його Sh, ми помітили, що в цей термін залежність була обернено пропорційною слабкою ($r=-0,015$, $p<0,05$), а між Fh і його Sn також слабкою і негативною ($r=-0,106$, $p<0,05$).

На 30-ту добу дослідження (14 діб після останнього введення пестициду 2,4-Д) межі між печінковими часточками простежувалися чітко. Гц печінкових балок щільно взаємопримикалися, їхня цитоплазма помірно вакуолізована і зерниста, ядра округлої форми, розташовані в центрі клітин. У всіх зонах печінкових часточок траплялися Гц з двома ядрами. Морфометричний аналіз поєднаного введення пестициду 2,4-Д і глутаргіну виявив загальну тенденцію до збільшення кількості Гц з невеликою Sh. Проте привертає увагу поява клітин з Sh понад 360 мкм². У розподілі Гц за Sn відбулися зміни в бік зменшення їх кількості з дрібними ядрами. Кореляційний зв'язок між показниками Sn і Sh виявився позитивним ($r=0,456$, $p<0,05$). Коефіцієнт Fh

також наблизився до контрольних цифр і зберігався таким до кінця експерименту. Кореляційний зв'язок між Fh і його Sh виявився слабким негативним ($r=-0,035$, $p<0,05$). Коефіцієнт Fh від цього терміну і в подальшому також нагадував гістограму коефіцієнта Fh у контролі. Кореляційна залежність між Fh і Sn мала слабо позитивну спрямованість ($r=0,016$, $p<0,05$).

Через 60 діб (45 діб після останнього введення пестициду 2,4-Д і 30 діб після останнього введення глутаргіну) у більшості печінкових часточок спостерігалось значне покращення цитоархітекtonіки: межі між печінковими часточками простежувалися добре, печінкові балки і синусоїди мали типовий радіальний напрямок. Форма та розміри Гц наближались до нормальних, траплялися двоядерні клітини. Цитоплазма Гц забарвлена еозинотильно, помірно зерниста. На периферії окремих часточок траплялися Гц, у їх цитоплазмі присутні дрібні прозорі вакуолі.

Морфометричний аналіз Гц на тлі корекції печінки глутаргіном показав наближення процентного розподілу клітин за Fh і Sh до контролю. Число клітин з Sh від 140 до 180 мкм² становило 22,02% (у контролі – 36%). У розподілі ядер Гц за Sn порівняно з контролем визначалася присутність збільшеної кількості ядер з Sn = 10,01-20,00 мкм², зменшеної – з Sn від 20,01 до 35,00 мкм² і збільшеної – з Sn від 35,01 до 50,00 мкм² та відсутність ядер з Sn понад 50,01 мкм². Кореляційний зв'язок між Sn і Sh був слабо позитивний ($r=0,474$, $p<0,05$). Найбільші відхилення від контролю виявлені в розподілі ядер за Fh: це зменшення кількості округлих ядер і збільшення деформованих. Спрямованість кореляційного зв'язку між Fh, його Sh

і Fh та його Sn визначалася слабкою негативною залежністю.

Висновки та перспективи наукового пошуку. 1. При одночасному введенні шурам глутаргіну з пестицидом 2,4-Д (до 14 діб одночасне введення і продовження введення глутаргіну до 30-ї доби) спостерігалось поступове зменшення токсичних проявів. Гістоструктура печінкової часточки характеризувалася стабілізацією і нормалізацією цитоархітекtonіки з поверненням до радіального розташування печінкових балок і синусоїдів. Кореляційна залежність між Sn і Sh досягла показника контролю, між Sn/Sh і Sh зменшилася, між Fh і Sh та Fh і Sn стала негативною. 2. Через 2 місяці від початку досліду на тлі нормалізації будови печінкових часточок виявлялися ознаки токсичного пошкодження Гц. Гістограма була зміщена вліво: число клітин з Sh від 140 до 180 мкм² становило 22,02% (у контролі – 36,00%). Площа профілю ядер не досягла контрольних показників, ядерно-клітинне співвідношення порушилося. Простежували тенденцію до нормалізації форми клітин (за показником Fh) на тлі збереження більшої, ніж у контролі, кількості деформованих ядер. 3. Застосування глутаргіну одночасно з пестицидом 2,4-Д для запобігання пошкодженню печінки не досягло поставленої мети – повноцінної корекції стану печінки не настало, а через 45 діб припинення внутрішньошлункового введення пестициду 2,4-Д і 30 діб – глутаргіну спостерігалися прояви зриву стабільності гістологічної і морфометричної картини печінки. 4. Перспективи пошуку в даному напрямку полягають у подальшому дослідженні гепатопротекторів для корекції токсичних ушкоджень, індукованих пестицидом 2,4-Д.

Література

1. Поліщук Д.І. Актуальні питання гігієни використання окремих піретроїдів для боротьби з шкідниками сільськогосподарських культур / Д.І.Поліщук, І.П.Козярин, Т.І.Мельниченко // *Довкілля та здоров'я*. – 2002. – № 2. – С. 62-65.
2. Онищенко Г.Г. Гигиенические аспекты обеспечения экологической безопасности при обращении с пестицидами и агрохимикатами / Г.Г.Онищенко // *Гигиена и санитария*. – 2003. – № 3. – С. 3-5.
3. Комбинированное действие детергентов и приоритетных загрязнений на организм и качество окружающей среды (обзор) / Н.Г.Проданчук, И.В.Мудрый, А.П.Кравчук [та ін.] // *Гигиена и санитария*. – 2004. – № 2. – С. 24-28.
4. Гурняк О.М. Вплив пестицидів на морфофункціональний стан печінки: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня к. біол. наук: спец. 03.11.11 / О.М.Гурняк. – К., 2005. – 20 с.
5. Яструб Т.О. Використання експозиційної моделі оцінки ризику в обґрунтуванні профілактичних заходів щодо зниження небезпечної дії пестицидів на працівників / Т.О.Яструб // *Укр. ж. з пробл. медицини праці*. – 2005. – № 2. – С. 28-32.
6. Бабак О.Я. Показники енергетичного метаболізму у хворих з хронічною патологією печінки невірусного генезу при лікуванні глутаргіном та холеноормом / О.Я.Бабак, В.М.Фролов // *Укр. мед. альманах*. – 2004. – Т. 7, № 5. – С. 12-14.

7. Вплив глутаргіну на функціональний стан печінки у жінок з гепатопатіями, які раніше застосовували оральну гормональну контрацепцію / І.П.Крохмаль, Н.О.Удовіка, А.Ю.Щербаков [та ін.] // Укр. мед. альманах. – 2003. – Т. 7, № 1. – С. 79-81. 8. Трофимова Т. Глутаргин: успех проекта predetermined заслуженную награду / Т.Трофимова // Провизор. – 2005. – № 20. – С. 24-26. 9. Геращенко С.Б. Морфофункціональний стан гепатоцитів під впливом пестициду 2,4-Д / С.Б.Геращенко, О.І.Дельцова, Г.Б.Кулинич // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2006. – Вип. 2. – С. 196-198.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ВВЕДЕНИИ ГЛУТАРГИНА И ПЕСТИЦИДА 2,4-Д В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме. В эксперименте на белых крысах установлено, что при одновременном введении глутаргина с пестицидом 2,4-Д через месяц происходит постепенное уменьшение токсических проявлений в гепатоцитах, площадь ядер и клеток нормализуется. Через 2 месяца наблюдались признаки срыва стабильности гистологической и морфометрической картины печени: большее количество гепатоцитов имело площадь как в контроле, площадь ядер не достигла контроля, ядерно-клеточное соотношение нарушилось, ядра деформировались, полноценной коррекции состояния печени не произошло.

Ключевые слова: гепатоциты, морфометрия, пестицид 2,4-Д, глутаргин.

MORPHOMETRIC CHANGES OF HEPATOCYTES WITH A SIMULTANEOUS INTRODUCTION OF GLUTARGIN AND PESTICIDE 2,4-D IN AN EXPERIMENT

Abstract. It has been established in an experiment on albino rats that a gradual decrease of toxic manifestations is observed in hepatocytes, the area of the nuclei and cells normalizes in case of simultaneous introduction of glutargin with pesticide 2-4-D in a month. In 2 months signs of a disturbance of stability of the histologic and morphometric picture of the liver is observed: a greater number of hepatocytes had the area like that of the control group, the area of the nuclei didn't reach the control value, the nuclear-cellular ratio disturbed, the nuclei deformed an adequate correction of the liver did not occur.

Key words: hepatocytes, morphometry, pesticide 2-4-D, glutargin.

National Medical University (Ivano-Frankivs'k)

Надійшла 14.11.2011 р.

Рецензент – проф. Л.Я.Федонюк (Тернопіль)