

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», г. Иркутск² ИЛЦ ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия», г. Ангарск

В статье представлены сравнительные результаты морфологических и гистохимических исследований внутренних органов при токсическом поражении организма четыреххлористым углеродом и при их коррекции наноконкомпозитным 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 морфологически выявляется мелкокапельная жировая дистрофия на 7-й день эксперимента, которая полностью исчезает к 14 дню и гепатоциты имеют мономорфные размеры с хорошо выраженным ядром и равномерно распределенным хроматином. Сохраняется активность ферментов, гликогена, уменьшается содержание липидов. Наноконкомпозитный препарат селена в значительной степени снижает токсическое воздействие четыреххлористого углерода на гепатоциты.

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

ESTIMATE PATHOMORPHOLOGY OF NANO-SELENIUM BIOLOGY INFLUENCE UNDER THE POISONOUS ACTION TO THE HEPART

Е.А. Karpova ¹, O.G. Sh'ukina ², V.V. Benemansky ², O.P. Il'ina ¹¹ Irkutsk State Agricultural Academy, Irkutsk² Angarsk State Technical Academy, Angarsk

The result presents in the article of the morphological and histochemical studies of the liver on the model of experiment toxic hepatitis CCl₄ on rats and this correction nanopreparation of selenium. It has been shown that the drag of nanoselenium in the arabinogalactan matrix has hepatoprotective property. This is manifests in the protective effect of hepatocyte damage from the toxic carbon tetrachloride. On the seventh day of experiment ascertained atomized fatty degeneration, it will has disappear by fourteenth day of experiment, then hepatocytes has monomorphic sizes and well-marked nucleus and evenly distributed chromatin. The activity of enzymes and glycogen preserves, the lipid content reduce. The nanocomposite preparation of selenium reduces poisonous action to hepatocytes.

Key words: carbon tetrachloride, hepatocytes, dystrophy, nanoselenium, hepatoprotector

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

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 еще 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 нанобиоконкомпозитов элементный селен/арабиногалактан, перспективных для визуальной флуоресцентной диагностики и лечения в биомедицине [5]. Изучение действия на организм животных данного нанобиоконкомпозита явилось целью нашего исследования.

Применение методов оценки состояния различных органов и тканей, а, следовательно, и целостного организма при действии как токсических, так и лекарственных веществ, 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 CCl₄ и коррекции поражения нано-Se была выбрана печень. Этот орган способен накапливать скрытые повреждения, которые проявляются в ближайшие или отдаленные

Таблица 1

Дизайн эксперимента

Воздействие на животных	Число особей, n
CCl ₄	10
CCl ₄ + АГ	10
CCl ₄ + НаноSe	10
Интakтные животные	10

сроки. Повреждающее действие на печень проявляется в повышении активности печеночных ферментов (сукцинатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы), гипогликемии, а морфологически – в развитии жировой, белковой, гидропической дистрофии и гибели гепатоцитов.

Целью настоящего исследования явилось комплексное изучение морфофункционального состояния регенерирующей печени крыс после токсического поражения печени CCl₄ и коррекции поражения 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 и 14 суток. Контролем служили интактные крысы, выращенные в тех же условиях виварии. Введение изучаемых веществ осуществляли за 1 час до применения гепатотоксина [8].

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 гликогена по методу Шифф – иодной 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 CCl₄ 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

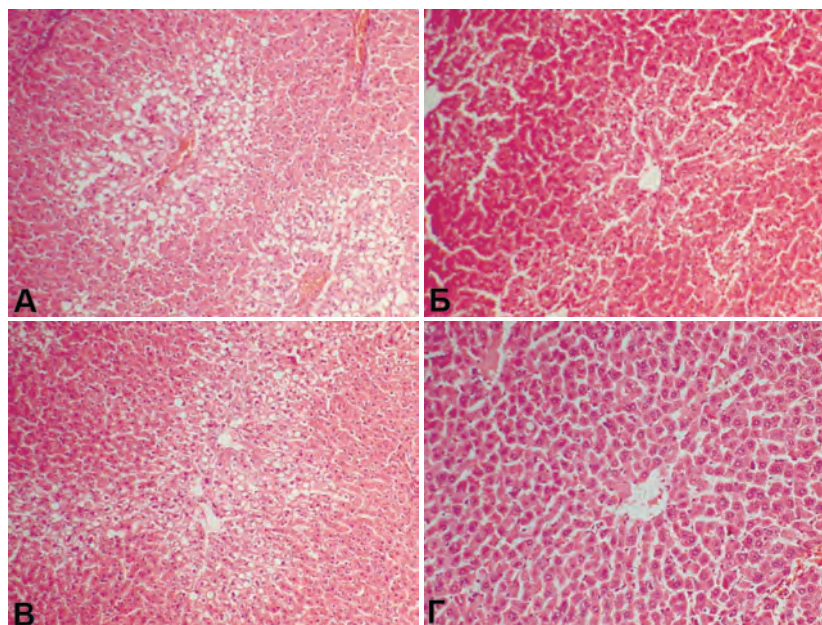


Рис. 1. Печень крысы. **А** – CCl₄ (7-е сутки эксперимента); **Б** – CCl₄ + нано-Se (7-е сутки эксперимента) небольшое расширение синусоидов, отсутствует гемодинамическое расстройство. В цитоплазме выявляются вакуоли (м.б. гидропическая дистрофия); **В** – CCl₄ (14-е сутки эксперимента); **Г** – CCl₄ + нано-Se (14-е сутки эксперимента). Окр. Гематоксилин-эозин.

размера с гиперхромным ядром (рис. 1А). На 7-й день эксперимента в группе nano-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 nano-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 свободные 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 nano-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 nano-Se токсического поражения печени (рис. 2Б).

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

Поскольку арабиногалактан сам обладает мембранотропными свойствами и оказывает протективное действие на гепатоциты, представилось интересным сравнить действие чистого арабиногалактана на гепатоциты, в сравнение с препаратом nano-Se, где элементный Se встроен в решетку арабиногалактана.

Содержание гликогена в печени в обеих группах на 7 день эксперимента оставалось выше, чем в группе CCl_4 . В группе АГ и nano-Se отмечено диффузное снижение гликогена. На 14-й день эксперимента гликоген приходит в норму. В группе АГ все также заметно его снижение по сравнению с интактными животными. Однако в группе nano-Se содержание гли-

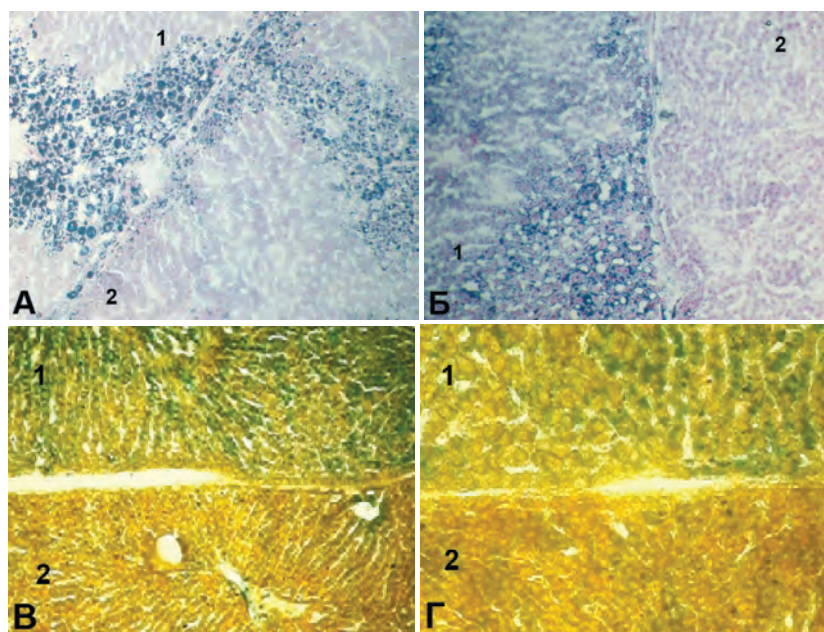


Рис. 2. 1 – группа CCl_4 ; 2 – опытная группа nano-Se. **А, Б** – выраженное скопление липидов в области центральных вен на 7-е и 14-е сут. эксперимента соответственно. Окраска суданом черным. **В, Г** – определение активности ЩФ на 7-е и 14-е сут. эксперимента соответственно. Окр. методом азосочетания.

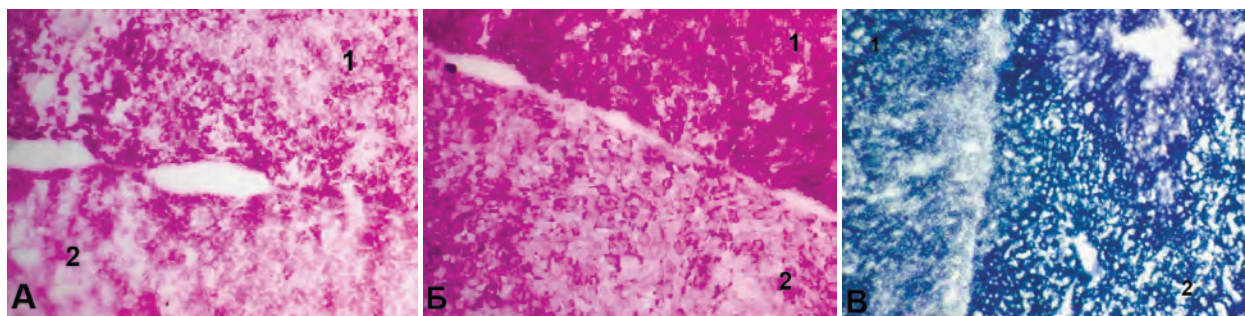


Рис. 3. 1 – действие nano-Se; 2 – действие арабиногалактана. **А, Б** – гликоген. Окр. методом Шиффа. **В** – определение СДГ по Нахласу. 1 – выраженное снижение активности сукцинатдегидрогеназы в печени при воздействии CCl_4 . 2 – АГ.

когена на 14-й день эксперимента даже значительно выше, чем у интактных животных (рис. 3 а, б).

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

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 7-е сутки эксперимента после отравления, это отражается в изменении ультраструктуры и морфологии клеток печени, в 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 атипические митозы, замедляется формирование печеночных балок [8].

В то же время при профилактическом введении АГ и в большей степени препарата нано-Se, отмечается значительный положительный эффект как на уровне метаболических процессов (нормализация активности ферментов в печени: СДГ, ЩФ и содержание гликогена и липидов), так и на 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 нано-Se улучшает морфофункциональное состояние печени.

ВЫВОДЫ

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

2. Нано-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. В восстановительном периоде (14-е сутки после воздействия) морфологически структура печени, а также метаболические процессы (активность СДГ, ЩФ, содержание гликогена и общих липидов) при введении нано-Se в незначительной степени отличались от интактных животных.

Гибель паренхимы при хроническом гепатите высокой степени активности проявляется некрозом клеток печени (рис. 1). Скопление апоптотических 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 углеводородов была слабо выражена или вовсе не выражена после дачи крысам нано-Se.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуцол Л.О. Патогенетическое обоснование применения арабиногалактана для коррекции нарушений в печени при интоксикациях фенилгидразином и этиленгликолем: Дис. ... канд. биол. наук: 14.00.16 / Л.О. Гуцол. – 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. – 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. проф., д.б.н. Н.Н. Ильинских // Естествознание и гуманизм. – Томск, 2006. – Т. 3. – Вып. 2.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
9. Corazza A. and Boffito C. Mercury dosing solutions for fluorescent lamps // Journal of Physics D-Applied Physics. – 2008. – Vol. 41. – P. 144007.
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. – Nov 15 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. – Jun 2007. – Vol. 115. – P. 841–847.
13. Hildenbrand V.D., Denissen C.J.M., Ajhp Van der Pol, Hendriks A.H.C. et al. Reduction of mercury loss in fluorescent lamps coated with thin metaloxide films // Journal of the Electrochemical Society. – Jul 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. – Aug 1, 2008. – Vol. 42. – P. 5772–5778.
15. Ralston N. Nanomaterials: Nano-selenium captures mercury // Nature Nanotechnology. – Sep 2008. – Vol. 3. – P. 527–528.

REFERENCES

1. Gucol L.O. Pathogenetic prove of use of arabinogalactine for correction of disorders in liver at the intoxications by phenylhydrazine and ethylene glycol: Dis. ... kand. biol. nauk: 14.00.16 / L.O. Gucol. – Irkutsk, 2006. – 165 s.

2. Djadik V.P., Bychkova V.I. Lipid peroxidation and their exchange at virus hepatitis // *Vrachebnoe delo*. – 1986. – № 11. – S. 114–117.
3. Merkulov G.A. Course of pathohistological technique. – 5-e izd. – L.: Medicina, 1969. – 424 s.
4. Basis of histology and histologic technique / pod red. V.G. Eliseeva, M.Ja. Subbotina i dr. – M.: Medicina, 1967. – 268 s.
5. Report of RAS: scientific achievements of RAS in 2011. – M.: Nauka, 2012. – S. 42.
6. Pirs Je. Histochemistry/ Pod. red. prof. V.V. Portugalova. – M.: Izd-vo inostrannoj lit., 1962. – 962 s.
7. Struev I.V., Simahov R.V. Selenium, its effect on the organism and using in medicine / Pod red. prof., d.b.n. N.N. Il'inskih // *Estestvoznaniye i gumanizm*. – Tomsk, 2006. – T. 3. – Vyp. 2.
8. Management on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / Pod obshhej redakciej chlena-korrespondenta RAMN, professora R.U. Habrieva. – 2-e izd., pererab. i dop. – M.: OAO «Izdatel'stvo «Medicina», 2005. – 832 s.
9. Corazza A. and Boffito C. Mercury dosing solutions for fluorescent lamps // *Journal of Physics D-Applied Physics*. – 2008. – Vol. 41. – P. 144007.
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*. – Nov 15 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.* – Jun 2007. – Vol. 115. – P. 841–847.
13. Hildenbrand V.D., Denissen C.J.M., Ajhp Van der Pol, Hendriks A.H.C. et al. Reduction of mercury loss in fluorescent lamps coated with thin metaloxide films // *Journal of the Electrochemical Society*. – Jul 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*. – Aug 1, 2008. – Vol. 42. – P. 5772–5778.
15. Ralston N. Nanomaterials: Nano-selenium captures mercury // *Nature Nanotechnology*. – Sep 2008. – Vol. 3. – P. 527–528.

Сведения об авторах

Карпова Екатерина Александровна – аспирант кафедры анатомии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия» (664038, Иркутская обл., п. Молодежный; факс: 8(3952) 29-09-75; e-mail: katerinka200488@gmail.com)

Щукина Ольга Геннадьевна – младший научный сотрудник ИЛЦ НИИ биофизики при ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия» (665830, Иркутская область, г. Ангарск, ул. Партизанская, 2, а/я 4380; тел.: 8 (3955) 95-70-74, факс: 8 (3955) 95-70-68; e-mail: olga.shhukina.81@mail.ru)

Бенеманский Виктор Викторович – доктор медицинских наук, профессор кафедры экологии и безопасности деятельности человека, ведущий научный сотрудник ИЛЦ НИИ биофизики 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» (664038, Иркутская обл., п. Молодежный, тел.: 8 (3952) 29-09-75, 8 (9025) 60-21-97; e-mail: dekanat.bwm@gmail.com)

Сведения об авторах

Karpova Ekaterina Aleksandrovna – post-graduate student of the department of anatomy and veterinary-sanitary expertise of Irkutsk State Agricultural Academy (Irkutsk region, Molodezhnyi village, 664038; fax: 8 (3952) 29-09-75; e-mail: katerinka200488@gmail.com)

Shchukina Olga Gennadjevna – junior scientific officer of Test Laboratory Center of Scientific Research Institute of Biochemistry of Angarsk State Technical Academy (Irkutsk region, Angarsk, Partizanskaya str., 2, P.O.B. 4380, 665830; tel.: 8 (3955) 95-70-74, fax: 8 (3955) 95-70-68; e-mail: olga.shhukina.81@mail.ru)

Benemanskiy Victor Victorovich – doctor of medical sciences, MD, professor of the department of ecology and life activity safety, leading scientific officer of Test Laboratory Center of Scientific Research Institute of Biochemistry of Angarsk State Technical Academy

Iljina Olga Petrovna – doctor of veterinary sciences, professor of the department of anatomy and veterinary-sanitary expertise, dean of the faculty of biotechnology and veterinary medicine of Irkutsk State Agricultural Academy (Irkutsk region, Molodezhnyi village, 664038; tel.: 8 (3952) 29-09-75, 8 (9025) 60-21-97; e-mail: dekanat.bwm@gmail.com)