

ВЛИЯНИЕ ХРОМА И БЕНЗОЛА НА ГИСТОСТРУКТУРУ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ЖИВОТНЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

На светооптическом и электронномикроскопическом уровнях получены и проанализированы новые факты о сочетанном влиянии хрома и бензола на диапазон гистобластических и органотипических свойств паренхиматозных органов (печень, почки) экспериментальных животных. Установлен существенный вклад центрального (гипоталамического) звена нейроэндокринной системы в реализацию исследованных жизненно важных органов в поддержании клеточного и тканевого гомеостаза животных, подверженных токсическому влиянию.

Известно, что загрязнение среды обитания хромом и бензолом наряду с их токсическими эффектами, является причиной формирования злокачественных новообразований (Иванов, Токарев, Куликова, 1993). Кроме того, хром характеризуется и мутагенным действием (Gilani, Marano, 1979; Рудных, 1986).

Особую актуальность в этой связи представляют данные об особенностях биологического действия на организм хрома и бензола в дозах малой интенсивности. Хроническая интоксикация бензолом протекает с преимущественным поражением гемопоэза и нервной системы, а также изменениями в печени, нарушением стероидной функции надпочечников (Измеров, 1996). Острое отравление бензолом вызывает значительное повышение функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (Бахтизина, 1979).

При введении в организм животных хрома и бензола в разных дозах отмечена реакция адаптации со стороны гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГТАКС). В паренхиматозных органах, осуществляющих элиминацию токсикантов, при этом наблюдаются существенные морфофункциональные изменения.

Материалы и методы исследования

При изучении комбинированного действия хрома и бензола при пероральном поступлении животным использовался шестивалентный хром в бихромате калия ($K_2Cr_2O_7$) и бензол (C_6H_6), растворенные в питьевой воде.

Токсикологические и морфологические исследования проводились на клинически здоровых, половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Перед выполнением экспериментов животные содержались в карантине в течение 1 месяца с обязательным клиническим обследованием и выбраковкой подозрительных на заболевание особей. Животные содержались на общепринятом рационе вивария [1].

Эксперимент проведен на 105 белых крысах самцах линии Wistar массой 180-200г. Всего проведено две серии опытов, в каждой из которых было три группы по 15 животных. Контрольную группу составили 15 интактных животных. Дозы токсикантов были рассчитаны на основании данных литературы и были в несколько раз ниже LD_{50} для каждого вещества. В первой серии опытов пер-

вая группа животных получала бензол в дозе 0,12 мл/кг массы тела, вторая - получала хром в дозе 5,0 мг/кг массы тела, третья - получала сочетание бензола и хрома в вышеуказанных дозах. Во второй серии опытов первая группа животных получала бензол в дозе 0,6 мл/кг, вторая - получала хром в дозе 20,0 мг/кг, третья - получала бензол в сочетании с хромом в указанных дозах. Все животные получали хром и бензол перорально с питьевой водой. Контрольная группа получала питьевую воду. Забой экспериментальных животных проводился декапитацией под эфирным рауш-наркозом.

Патоморфологические исследования проводились с использованием общепринятых морфометрических и гистологических методов исследования [2, 3, 4, 5, 6].

Весь полученный экспериментальный материал (гипоталамус, нейрогипофиз, надпочечники, печень, почки) был подвергнут однотипной гистологической обработке на светооптическом и ультраструктурном уровнях.

Для гистологического исследования материал фиксировали в 12% водном растворе нейтрального формалина, спирт-формоле, жидкости Буэна и затем дегидратировали в спиртах возрастающей крепости и заливали в блоки целлоидина-парафина. Депарафинированные срезы толщиной 5-6 мкм, изготовленные на ротационном микротоме, окрашивали гематоксилином Майера и эозином по Ван-Гизон, нуклеиновые кислоты выявляли по методу Браше, суммарный белок по Мак-Манусу, липиды - суданом черным с постановкой соответствующих энзиматических контролей (Пирс, 1962).

Материал, предназначенный для ультрамикроскопического изучения, последовательно фиксировали в охлажденном (+4°C) 2,5% растворе глутарового альдегида и 1% растворе четырехоксида осмия по Millonig (1961), обезвоживали в ацетоне возрастающей концентрации и заливали в смолу ЭПОН-812.

Полутонкие срезы (1мкм) окрашивали метиленовым синим и основным фуксином по прописи Sato, Shamoto (1973). Ультратонкие срезы, приготовленные на ультратоме LKB-5 (Bromma-Sweden) подвергали двойному контрастированию растворами уранилацетата и цитрата свинца по Reynolds (1963). Исследование и фотографирование ультратонких срезов производили в электронном микроскопе ЭМВ 100АК при увеличении от $\times 10000$ до $\times 40000$.

В результате реализации задач настоящей работы было проведено более 1000 морфологических и гистологических анализов.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с определением средней арифметической величины (M), средней ошибки (m) и среднеквадратического отклонения (s) (Мерков, Поляков, 1974; Schlesselman, 1982). Полученные в работе количественные морфометрические параметры были подвергнуты статистической обработке в соответствии с рекомендациями Рокицкого (1973) и Автандилова (1990).

Для выявления статистически значимых различий в сравниваемых группах были использованы параметрический метод (Rosner, 1982) и непараметрический ранговый метод (Siegel, 1957). Полученные данные считали достоверными при значениях $p < 0,05$.

Нами установлено, что при введении животным бензола или хрома в концентрации ниже ПДК в печени развиваются морфологические изменения, укладывающиеся в картину адаптивной реакции органа, обычно наблюдаемые при воздействии экстремальных факторов. Так, наблюдаются признаки гипертрофии и гиперплазии гепатоцитов. При этом возрастают размеры митохондрий, увеличивается протяженность канальцев шероховатого эндоплазматического ретикула, усиливаются процессы аутофагии в гепатоцитах, что сопровождается активизацией лизосомального аппарата (табл. 1.).

Мы особенно подчеркиваем то, что зонах локальной секвестрации цитоплазмы гепатоцитов присутствуют в большом числе свободные рибосомы (полисомы), что, безусловно, свидетельствует об активной внутриклеточной регенерации реактивно измененных клеток. На это же указывает возрастание числа двуядерных гепатоцитов, наблюдаемое через 42 суток эксперимента в 2,5 – 3 раза по сравнению с контролем). При этом, как при введении бензола, так и хрома, двуядерные гепатоциты главным образом определялись в периферических отделах долек печени.

Таблица 1. Поверхностно-объемная характеристика некоторых структур гепатоцитов на 14 сутки эксперимента, мкм^3

	Контроль	Группа I	Группа II	Группа III
Митохондрии	61,1 ± 5,1	72,1 ± 4,1	100,1 ± 6,1	45,1 ± 8,1
ШЭПР	29,2 ± 3,1	201,1 ± 22,0	310,1 ± 29,2	110,6 ± 22,1
Гликоген	37,1 ± 4,1	61,2 ± 4,6	35,1 ± 7,1	Н/о
Липосомы	46,0 ± 8,2	80,1 ± 7,8	98,7 ± 6,1	101,2 ± 8,8
Лизосомы	24,4 ± 4,0	58,8 ± 2,7	65,8 ± 3,2	78,8 ± 4,4

Примечания:

группа I – животные, получавшие бензол в дозе 0,12 мл/кг массы;

группа II – животные, получавшие хром в дозе 5,0 мг/кг массы;

группа III – животные, получавшие бензол в дозе 0,12 мл/кг в сочетании с хромом в дозе 5,0 мг/кг массы.

При сочетанном введении животным бензола и хрома было отмечено достоверное уменьшение удельного веса митохондрий среди других компарментов

печеночных клеток. В этой же серии не удалось определить в клетках включения гликогена. Можно предположить, что наблюдаемые изменения приводят к относительному дефициту энергетических субстратов в гепатоцитах при сочетанном введении токсических веществ. Вероятно, данный дефицит может покрываться переходом гепатоцитов на эндогенное питание за счет реутилизации продуктов лизосомального гидролиза (Pfeifer, Weder, 1998).

Описанные морфологические процессы протекают на фоне значительного возрастания васкуляризации печени (расширение синусоидных капилляров, центральных вен, междольковых и вокругдольковых кровеносных сосудов).

Реактивные изменения гистоструктур печени у животных, которым вводили бензол и хром в концентрациях соответствующим ПДК, также укладывались в картину компенсаторно-приспособительных реакций, с той лишь разницей, что они носили более интенсивный характер. Вместе с тем, через 28 суток при введении хрома в периферических участках долек печени появлялись гнездные полиморфно-клеточные инфильтраты, представленные гематогенными элементами, эндотелиоцитами и макрофагами. В ряде участков печени портальная строма диффузно инфильтрировалась лимфоцитами и макрофагами с примесью плазматических клеток, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов. Число таких инфильтратов значительно возрастало у животных, получавших бензол в сочетании с хромом на уровне ПДК уже через 14 суток опыта. Через 28 суток, и, особенно, 42 суток у этих животных элементы полиморфно-клеточных инфильтратов выходят из перипортальной стромы, проникают в паренхиму периферических и центральных участков долек печени, разрушая реактивно-измененные гепатоциты. Это в свою очередь приводит к появлению многочисленных мелкоочаговых перипортальных некрозов. Данные изменения имеют место на фоне резко расширенных синусоидных и желчных капилляров, а также центральных вен долек печени, в просветах которых определяются сладжированные эритроциты и деструктивно измененные гепатоциты.

Ультраструктурный анализ показал, что при этом мембраны гепатоцитов подвергаются существенным повреждениям, что нередко приводит к высвобождению субклеточных структур (в том числе и лизосом) в межклеточные пространства. Электронномикроскопически было установлено (стадия 42 суток опыта), что в местах мелкоочаговых некрозов гепатоцитов появлялись колагеновые фибриллы, в том числе и в перисинусоидальных пространствах Диссе. В этих участках сохранные гепатоциты находятся в состоянии гидропической дистрофии. При этом доля гипертрофированных и двуядерных гепатоцитов существенно уменьшалась. В местах локальной секвестрации их цитоплазмы свободные рибосомы не обнаруживались. Это свидетельствует о лимитировании регенераторных потенциалов паренхимы печени, испытывающей в данных условиях эксперимента процессы лизиса цитоплазматических структур и значительное возрастание

численности аутофаголизосом. Вполне очевидно, что изменение соотношения интенсивности аутолитических и регенераторных процессов на субклеточном уровне является немаловажным фактором, определяющим прогноз морфофункционального состояния печени у животных, подвергнутых сочетанному воздействию бензола и хрома в данной концентрации.

Анализируя результаты светооптических и электронномикроскопических исследований почек, мы пришли к заключению, что в основном структурно-функциональная реорганизация паренхимы и стромы органов носила сходный характер с большей степенью выраженности в той группе экспериментальных животных, которые получали бензол и хром в дозах, соответствующих ПДК.

Было установлено, что преимущественно поражаются проксимальные извитые канальцы нефроцитов (дистрофические изменения и разрушение апикальной части нефроцитов, их десквамация, повреждение базальной мембраны). Установлено венозное полнокровие в органе, но с другой стороны определялся спазм клубочковых гемакапилляров в определенной группе гломерул. Локальный некроз канальцев определяет возможность неадекватной реабсорбции, а также поступление клубочкового ультрафильтрата в почечный интерстиций. Это способствует нарастанию интерстициального оте-

ка. Десквамация и деструкция нефроцитов в канальцах приводит к их закупорке детритными массами. Отмечается сплаживание и микротромбоз вен, геморрагии и периваскулярная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами (ПЯЛ), макрофагами, эпителиоидными клетками. Следует особо подчеркнуть, что во всех вариантах экспериментов уже через 14 суток нами выявлены существенные ультраструктурные изменения в области фильтрационного барьера и реабсорбционных структур почек.

Отмечены выраженный отек подоцитов, утолщение и фрагментация базальной мембраны, стаз эритроцитов в гемакапиллярах, ультраструктурные повреждения эндотелиоцитов.

Одновременно, в проксимальных извитых канальцах выявлены ультраструктурные признаки, свидетельствующие о гидropическом отеке и локальной секвестрации цитоплазмы в области базальной части клеток. При этом митохондрии, локализованные между инвагинатами цитомембраны, резко набухали, кристы их разрушались, матрикс просветлялся.

Сочетанное введение бензола и хрома через 42-е сутки приводило к локальным мелкоочаговым некротическим повреждениям тубулярных структур почки, протекающим на фоне отека паренхиматозных и стромальных элементов органа и лимфоидной инфильтрации.

Список использованной литературы:

1. Лоскутова З.Ф. Виварий. - М.: Медицина, 1980. - 186 с.
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. - М.: Медицина, 1990. - 280 с.
3. Гуцол А.А., Кондратьев Б.Ю. Практическая морфология органов и тканей. - Томск, 1988. - 186 с.
4. Карташова О.Я., Максимова Л.А. Функциональная морфология печени. - Рига, 1979. - 240 с.
5. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. - Л.: Медицина, 1976. - 383 с.
6. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. - Л.: Медицина, 1971. - С.60-120.