УДК 616.36+611-018+611-013+616-053.2

МОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ ГЕПАТОЦИТІВ ПІД ВПЛИВОМ ПЕСТИЦИДУ 2,4-Д ТА ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВІЙ КОРЕКЦІЇ ГЛУТАРГІНОМ

Г. Б. Кулинич

Івано-Франківський національний медичний університет;
76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2;
e-mail: histology@ifnmu.edu.ua

В експерименті на 22 білих щурах вивчали вплив пестициду 2,4-Д на будову печінки. У гепатоцитах виявили дистрофічні зміни. Протягом відновного періоду (до 60-ї доби) при внутрішньошлунковому введенні глутаргіну в 24 щурів спостерігали позитивні ефекти на будову і морфометричні показники (площа гепатоцита і його ядра, співвідношення площі гепатоцита до площі ядра, коефіцієнт форми гепатоцита і його ядра) печінки.

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

Вступ

Надмірне використання шкідливих і загрозливих для здоров'я людини різного роду хімічних сполук, у тому числі пестицидів, є однією з причин стійкого погіршення екологічної ситуації в Україні. Світовий досвід доводить, що застосування ксенобіотиків для захисту рослин у сільському господарстві призводить до несприятливого впливу даних речовин на здоров'я працівників і тому велика увага повинна надаватись умовам їхньої праці [1, 2]. Найчастіше пестициди потрапляють до організму людини (у 95%) із продуктами харчування [3, 4].

До найпоширеніших пестицидів, які використовуються в сільському господарстві, належать препарати на основі ДДТ, групи 2,4-Д та інші. Вищевказані речовини здатні викликати негативні наслідки, накопичуючись навіть у невеликих кількостях, маючи високу біологічну активність [5, 6]. Окремі питання щодо токсичного впливу пестициду 2,4-Д на морфофункціональний стан печінки залишаються мало вивченими.

Метою дослідження було встановлення морфометричних особливостей печінки при токсичній дії пестициду 2,4-Д.

Матеріал та методи дослідження. В експерименті на білих рандомбредних щурах моделювали вплив на печінку пестициду 2,4-Д, який вводили внутрішньошлунково в дозі 1/10 DL_{50} протягом 14 діб через день. У 1-й групі (22 тварини) вивчали структурні і морфометричні зміни гепатоцитів після введення пестициду. Тваринам другої групи (24 щури) вводили 2,4-Д (14 діб) глутаргін (таблетована форма) у дозі

1,6 мг/кг маси щура внутрішньошлунково протягом одного місяця, щодня після останнього введення пестициду. Препарат вводили внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда по 0,7 мл даного водного розчину кожній тварині протягом 30 діб. Матеріал забирали через 3, 7, 14, 21, 30 і 60 діб після останнього введення пестициду.

Утримання тварин та маніпуляції проводилися у відповідності до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) та вимог Додатку 4 до «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин» (Наказ МОЗ №755, 1977 р.). Тварин виводили з експерименту передозуванням ефірного наркозу. Шматочки печінки для гістологічного (забарвлення гематоксиліном і еозином) і морфометричного дослідження забирали на 3-ю, 7-у, 14-у, 21-у, 30-у і 60-у доби досліду. Морфометричне дослідження проводили за допомогою аналізатора зображень на базі програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool®. Вимірювали площу профілю (Sh) гепатоцитів, зріз яких пройшов через ядерце; площу профілю ядра (Sn); коефіцієнт форми гепатоцитів (Fh) та їхніх ядер (Fn); визначали співвідношення між площею гепатоцитів та їхніх ядер Sh/Sn. Статистичний аналіз проводили за допомогою комп'ютерної системи STATISTICA for Windows® з використанням t-критерію Стьюдента для оцінки достовірності відмінності між значеннями показників попарно вибраних груп. Різницю вважали вірогідною при $p<0,05$.

Результати та їх обговорення. Через 3 доби від початку введення глутаргіну (після 14-денного введення пестициду 2,4-Д) межі між печінковими часточками диференціювалися чітко. Печінкові пластинки дезорганізовані. Гепатоцити мали великі округлі ядра з периферійною конденсацією гетерохроматину. Серед них траплялися двохядерні гепатоцити. Візуалізувалися частково деформовані печінкові клітини з великими круглими ядрами невеликих розмірів. Цитоплазма гепатоцитів містила дрібну синю зернистість і різні за розмірами вакуолі. Найбільші за розмірами гепатоцити локалізувалися в I зоні, їх розміри зменшувалися до III зони. Спостерігалися вогнищеві некрози, переважно в першій та другій зонах. Просвіти синусоїдних гемокапілярів і перисинусоїдних просторів Діссе нерівномірно розширені. У просвіті гемокапілярів наявні формені елементи крові. Між гепатоцитами часто виявлялися лімфоцити. У стінці мікрогемосудин спостерігалися клітини Купфера з видовженими, дещо неправильно овальними ядрами. Центральні вени були помірно розширені і оточені лімфоцитами. Сполучна тканина перипортальних трактів інфільтрована лімфоцитами, плазмоцитами і макрофагами. Розміри та форма судин та жовчної протоки, які їх формують, наближені до нормальних.

Морфометричний аналіз стану гепатоцитів у цей термін внутрішньошлункової корекції глутаргіном показав, що кількість гепатоцитів із

різною Sh змінилася. Так, стало більше клітин із Sh від 140,00 мкм^2 до 300,00 мкм^2, а менше великих гепатоцитів, особливо, із Sh понад 360,00 мкм^2, порівняно з 14-ю добою введення пестициду 2,4-Д, від якої почали вводити глутаргін. Гістограма розподілу гепатоцитів за їх Sh мала унімодальний асиметричний характер із піком показника Sh=200,1--240,0 мкм^2, на відміну від бімодальної на 14-у добу дії пестициду 2,4-Д (піки – Sh=280,01-320,00 мкм^2 і Sh понад 360,01 мкм^2). Водночас помірно зменшилася кількість ядер із Sn до 35,00 мкм^2 і від 40,01 мкм^2 до Sn=60 мкм^2 і більших. Натомість майже в 2 рази зросло число ядер із Sn=35,01-40,00 мкм^2. Гістограма розподілу за Sn мала унімодальний характер. У цей термін досліду (3-я доба) між показниками Sn та Sn виявлено слабий позитивний зв'язок.

Показник відношення Sn/Sh на 3-ю добу введення глутаргіну мало чим відрізнявся від такого на початок корекції. Обидві гістограми мали унімодальну майже симетричну спрямованість. Кореляційна залежність між показниками Sn/Sh і Sh мала обернено пропорційний характер середньої сили.

Гепатоцити мали різноманітну форму. Кількість клітин із коефіцієнтом Fh від 1,10 до 1,25 збільшилась до 61,74%, тоді як до початку введення глутаргіну кількість таких гепатоцитів налічувала 35,18%. Водночас число клітин із Fh більшим від 1,31 відповідно зменшилось. Ця спрямованість знайшла відбиток на гістограмі розподілу гепатоцитів за Fh зі збереженням унімодального типу кривої. Між показниками коефіцієнта Fh і його Sh виявлений дуже слабий прямопропорційний зв'язок. Це означає, що зі збільшенням Sh відповідно збільшувався Fh. Ця залежність була більшою на 14-у добу впливу пестициду 2,4-Д (початок введення глутаргіну), ніж на 3-ю добу корекції внутрішньошлунковим введенням глутаргіну.

Форма ядра цих же гепатоцитів зазнала таких змін: кількість ядер із Fn, яка наближалася до округлої (1,05-1,15), становила на 3-ю добу корекції глутаргіном 51,78%, тоді як під впливом пестициду 2,4-Д – 26,98%, із Fn=1,16-1,20 залишилася майже незмінною, зменшилась із Fn, більшим від 1,21. Гістограма розподілу клітин за Fn мала унімодальну спрямованість. Між Fn і Sn визначалась слаба обернено пропорційна залежність.

Через 7 діб внутрішньошлункової корекції глутаргіном межі печінкових часточок розрізнялися добре. При загальному огляді привертали увагу деформовані просвіти синусоїдних гемокапілярів. Уздовж капілярів спостерігалися локальні розширення перисинусоїдного простору. Ядра ендотеліоцитів ідентифікувалися чітко. Гепатоцити, які формували печінкові балки, різнилися своїми розмірами, містили округлі ядра неоднакові за розмірами. Траплялися гепатоцити з дрібними зморщеними ядрами. Частіше, порівняно з попереднім терміном досліду, спостерігалися двохядерні гепатоцити. У цитоплазмі гепатоцитів I і II зон виявля-

лися ознаки крупновакуольної дистрофії. Просвіт центральних вен часто розширений та деформований, хоча серед них траплялися й наближені до нормальних, і на відміну від попереднього терміну центральні вени не мали в оточенні клітин лімфоїдного ряду. Сполучна тканина портальних трактів містила фібробласти, макрофаги, лімфоцити, плазмоцити. Печінкові тріади представлені міжчасточковими артеріями, венами і міжчасточковими жовчними протоками, які розміщені всередині портальних трактів.

Гепатоцити мали різну площу профілю (Sh). Зокрема, зросла кількість клітин із Sh від 140,00 мкм^2 до 280,00 мкм^2 і зменшилась – із Sh від 300,01 мкм^2. Характер гістограми розподілу гепатоцитів за показником Sh в цей термін був бімодальним двохвершинним, як і за введення пестициду 2,4–Д. За тих же умов корекції глутаргіном показник Sn також виявив аналогічні відхилення, тобто збільшення кількості менших за розмірами ядер і зменшення числа великих ядер. Кореляційний зв'язок між Sn і Sh зберіг позитивну залежність, але став меншої сили. Аналізуючи відношення між показниками Sn до Sh, ми встановили, що кількість гепатоцитів за цим показником перерозподілилися таким чином: стало менше клітин із показником Sn/Sh від 0,05 до 0,15 і більше клітин – із Sn/Sh=0,16-0,20 і з Sn/Sh понад 0,20. Кореляційний зв'язок між Sn/Sh і показником Sh змінився мало і залишився оберненопропорційним середньої сили. Між 3-ю і 7-ю добами досліду мало змінились форма гепатоцита, при цьому стала меншою кількість гепатоцитів із Fh від 1,10 до 1,25 (31,57%). Позитивний кореляційний зв'язок між показниками Fn і Sh став більш вираженим. У коефіцієнті форми ядер гепатоцитів (Fn) відбулися такі зміни: зменшилась кількість ядер із Fn=1,05-1,15--51,78% на 3-ю добу і 39,31% – на 7-у добу, натомість, збільшилось число ядер із Fn понад 1,16. Кореляційна залежність між Fn і Sn стала дещо більшою, залишившись обернено пропорційною.

На 14-у добу у печінковій часточці виявлялися поліморфні морфологічні зміни. Центральні вени наближені до нормальних за розмірами та формою. Гепатоцити, які формували печінкові пластинки, мали різну форму та розміри. Ядра клітин округлі, різних розмірів. У I та II зонах печінкового ацинуса часто виявлялися двохядерні гепатоцити. Цитоплазма печінкових клітин даних зон містила різні за розмірами вакуолі. У гепатоцитах третьої зони вакуолі ідентифікувалися в меншій кількості. Синусоїдні гемокапіляри нерівномірно розширені, уздовж них траплялися видовжені ядра ендотеліоцитів. У просвітах синусоїдів спостерігалися формені елементи крові. Для цього терміну досліду характерною була помірна інтралобулярна та портальна лімфо-плазмоцитарна інфільтрація.

На 14-у добу досліду гепатоцити різнилися за розмірами і формою. Морфометричний аналіз показав, що відбувся зсув показників у бік зростання вмісту клітин із великою Sh і зменшення їх числа з малими роз-

мірами, що чітко прослідковувалось на гістограмі розподілу гепатоцитів за Sh. Подібні переміщення стосовно попереднього терміну досліду відбулися і в показнику Sn, що знайшло відбиток у відповідній гістограмі. Кореляційний зв'язок між показником Sn та Sh був позитивним і дещо збільшився за силою, порівняно з попередніми термінами досліду. Показник ядерно-клітинного відношення (Sn/Sh) залишився на рівні попередніх термінів досліду. Кореляційний зв'язок між Sn/Sh і Sh був прямопропорційним і характеризувався середньою силою. Розподіл гепатоцитів (у відсотках) за показником коефіцієнта Fh виявив збільшення кількості клітин у бік наближення до контролю з величиною Fh=1,10-1,35 і відповідного зменшення від Fh=1,36 і більшого, тобто протягом 14 діб ми спостерігали більш-менш постійну кількість гепатоцитів із різною Fh. Кореляційний зв'язок між Fh і Sh був слабим позитивним. Водночас кількість клітин із коефіцієнтом Fn визначалася практично на рівні 7-ї доби досліду. Кореляційний зв'язок між Fn і його Sn був оберненопропорційний слабої сили.

На 21-у добу досліду з введенням глутаргіну на тлі токсичної дії пестициду 2,4-Д печінкові трабекули, як і розміщені між ними синусоїдні гемокапіляри центролобулярних та проміжних зон, мали типовий радіальний напрям – від периферії до центру часточок. У перипортальних зонах печінкові трабекули розташовані не завжди впорядковано за рахунок неоднакових розмірів гепатоцитів. Синусоїдні гемокапіляри I зони нерівномірно звужені. Ядра печінкових клітин були округлими і різнилися за своїми розмірами. В усіх зонах часточок спостерігалися двохядерні гепатоцити. Цитоплазма гепатоцитів усіх зон печінкової часточки забарвлена слабобазофільно з проявами зернистої і дрібновакуольної дистрофії. Порівняно з попереднім терміном, не виявлялися лімфоцитарні інфільтрати. Лімфоцити були рівномірно розподілені в усіх зонах часточок.

Результати морфометричного аналізу гістологічних мікропрепаратів показали продовження тенденцій, які проявлялися в попередні терміни досліду, зменшилася кількість гепатоцитів із Sh до 160,00 мкм^2, 320,01 і більше мкм^2, дещо збільшилася – із Sh 160,01-320,0 мкм^2. Це наклало свій відбиток на характер гістограми, в якій з'явилось дві вершини і крива стала бімодальною. У розподілі ядер за показником Sn також спостерігалось збільшення ядер із Sn до 40,00 мкм^2 і відповідне зменшення – із Sn від 40,01 мкм^2. Визначався позитивний зв'язок середньої сили між показниками Sn і Sh. У показнику відношення Sn/Sh, як і в попередніх термінах досліду, збільшилась кількість клітин із Sn/Sh=0,05-0,15 і зменшилась із Sn від 0,16. Кореляційний зв'язок між Sn/Sh і Sh був обернено-пропорційний слабої сили. Коефіцієнт Fh прогресивно змінився в бік збільшення кількості клітин із величиною Fh, наближеного до контролю. Кореляційна залежність між Fh і його Sh виявилась слабо позитивною. Коефіцієнт Fn за цих умов не досяг умов кон-

тролю, але частка клітин із більш округлими ядрами (Fn=1,05-1,15) була досить великою. Між Fn і його Sn визначено оберненопропорційну залежність слабої сили.

При дослідженні печінки щурів на через 30 діб корекції глутаргіном цитоархітектоніка більшості печінкових часточок не була порушена і вони зберігали гексагональну форму. Печінкові часточки формувалися системою печінкових балок, до складу яких входили два ряди гепатоцитів, між якими розташовані жовчні капіляри та нерівномірно звужені та розширені синусоїдні гемокапіляри. У цитоплазмі гепатоцитів виявлялися дрібні вакуолі. Паренхіма печінкових часточок помірно інфільтрована лімфоцитами. Судини портальних трактів характеризувалися звичною для них будовою стінки і були оточені невеликою кількістю сполучної тканини. Епітеліальне вистелення жовчних проток містило кубічні і частково плоскі епітеліоцити, які в окремих протоках забарвлювалися оксифільно.

У цей термін внутрішньошлункової корекції глутаргіном у метричних показниках гепатоцитів відбулися зміни, протилежні до таких у попередні терміни досліду – у великій кількості визначались гепатоцити з Sh понад 260,01 мкм^2. Водночас стало більше ядер із Sn до 30,00 мкм^2. Дещо ослабла кореляційна залежність між показниками Sn і його Sn. За показником відношення Sn/Sh виявлено, що гепатоцити з величиною цього показника Sn/Sh=0,11-0,15 склали найбільшу частку від усіх клітин. Достатньо великою (25,77%) була частка гепатоцитів із показником Sn/Sh=0,06-0,10 і зменшилась частка – із Sn/Sh=0,16-0,20. Ступінь кореляційного зв'язку між показником Sn/Sh і Sh виявився негативним і меншим від попереднього терміну досліду. Показник Fh виявив велику групу клітин (66,09%), в яких величина цього коефіцієнту була найнижчою – Fh=1,10-1,25. Характер гістограми був максимально наближений до контролю. Вираженість кореляційного зв'язку між Fh та його Sh зі слабої позитивної змінилась на слабу негативну. Форма ядра гепатоцита (показник Fn) при цьому в переважної більшості гепатоцитів мала величину Fn від 1,05 до 1,20, що також наближало гістограму розподілу гепатоцитів за показником Fn до контролю. Кореляційний зв'язок між показниками Fn і його Sn виявився оберненопропорційним і за величиною дещо більшим, ніж у попередній термін досліду.

На 60-у добу експерименту (30 діб після останнього введення глутаргіну) ми спостерігали наближену до контролю будову печінкових часточок і їх пластинок. Центральні вени мали округлу форму, інколи з помірними скупченнями лімфоцитів по периметру. Гепатоцити мали різну форму і розміри. У цитоплазмі багатьох із них визначалась дрібна базофільна зернистість, великі за розмірами і дрібні прозорі вакуолі. Ядра локалізувались центрально. Серед гепатоцитів траплялись двохядерні. Межі клітин чіткі. Поміж гепатоцитами ідентифікувалися поодинокі лімфоцити і макрофаги. Синусоїдні гемокапіляри мали радіаль-

ний напрям. Просвіт цих мікрогемосудин виявляв помірні розширення і звуження (у межах картини печінки контрольних тварин). У портальних трактах виявлялась незначна кількість пухкої сполучної тканини, серед якої розрізнялись артерії з округлою формою просвіту, вени – з овальною, жовчні протоки, вистелені кубічним епітеліоцитами.

Вивчення структури печінки ми доповнили аналізом морфометричних показників гепатоцитів та їх ядер. Слід зауважити, що під кінець досліду гістограма розподілу гепатоцитів за величиною показника Sh мала унімодальний тип із піком Sh=200,01-220,00 мкм^2 (у контролі Sh= =180,01-200,00 мкм^2). Розподіл гепатоцитів за Sn також був унімодальним за типом із піком Sn=30,01-35,00 мкм^2 і в контролі, і на 60-у добу. Майже аналогічним був розподіл гепатоцитів за показником Sn/Sh. Але у формі гепатоцитів виявились відхилення щодо кількості клітин із найменшим за значенням показником Fh, що засвідчує деформацію клітин. Форма ядра (показник Fn) характеризувалась більш сталими параметрами, які мало відрізнялись від контролю.

Висновки

1. Показники кореляційного аналізу взаємин між окремими показниками вказували на те, що між Sn і Sh у різні терміни введення пестициду 2,4-Д виявився прямопропорційний зв'язок. Між показниками відношення Sn/Sh і Sh прослідковувався односпрямований оберненопропорційний кореляційний зв'язок, переважно середньої сили.

2. Показники кореляційного аналізу між Fh і Sh у різні терміни введення пестициду 2,4-Д з внутрішньошлунковою корекцією глутаргіном вказували на слабий прямопропорційний зв'язок, за винятком 30-ї доби, коли залежність змінилась на слабу оберненопропорційну.

3. Кореляційна залежність між коефіцієнтом Fn і Sn у різні терміни введення пестициду 2,4-Д з внутрішньошлунковою корекцією глутаргіном на тлі введення пестициду, коли вона була слабою прямопропорційною, змінилась на стійку оберненопропорційну слабої сили.

4.У результаті внутрішньошлункової корекції токсичної дії пестициду 2,4-Д глутаргіном ми виявили позитивний вплив цього засобу, який виявився максимально наближеним до контролю на 30-у добу досліду, тобто під час введення глутаргіну. Із продовженням експерименту до 60-ї доби в морфологічній і морфометричній картині можна було ідентифікувати факти зменшення цього позитивного впливу.

Література

1. Коршун О.М. Гігієнічна оцінка проф. ризику при застосуванні сучасних інсектицидів та фунгіцидів в яблуневих садах / О.М. Коршун, В.Г. Бардов, С.Т. Омельчук // Довкілля та здоров'я. – 2007. – №2(41). – С. 40-47.
2. Кірсенко В.В. Гігієнічна оцінка умов праці при застосуванні пестицидів: можливості альтернативного підходу / В.В. Кірсенко // Український журнал з проблем медицини праці. – 2005. – №1. – С. 22-28.

3. Черных А.М. Угрозы здоровью человека при использовании пестицидов (обзор) / А.М. Черных // Гигиена и санитария. – 2003. – №5. – С. 25-29.
4. Яструб Т.О. Гігієнічна оцінка інгаляційного та крізьшкірного впливу пестицидів на працівників на етапі державних випробувань в Україні / Т.О. Яструб // Довкілля та здоров'я. – 2005. – №4(35). – С. 36-39.
5. Чубирко М.И. Влияние пестицидов на качество молочных продуктов / М.И. Чубирко, Г.М. Смольский, Г.М. Басова // Гигиена и санитария. – 1998. – №2. – С. 23-25.
6. Иванов А.В. Состояние здоровья населения на территориях интенсивного применения пестицидов / А.В. Иванов, В.В. Васильев // Гигиена и санитария. – 2005. – №2. – С. 24-27.

Стаття надійшла до редакційної колегії 23.12.2013 р.
Рекомендовано до друку д.м.н., професором ***Зайцем Л.М.****,*
д.м.н., професором ***Грицуляком Б.В.***

MORPHOMETRICAL CHANGES OF THE HEPATOCYTES UNDER INFLUENCE OF THE PESTICIDE 2,4-D AND AFTER INTRAGASTRIC CORRECTION BY GLUTARGIN

G. B. Kulynych
Ivano-Frankivs'k National Medical University;
76018, Ivano-Frankivs'k, Galytska str., 2;
e-mail: histology@ifnmu.edu.ua

In the experiment on 22 white rats we learned the influence of pesticide 2,4-D on structure of liver. The dystrophic changes of hepatocytes were observed. Positive effects on structure and morphometrical indexes (square of hepatocyte and its nucleus, index square hepatocyte/ square of its nucleus, coefficient of form of hepatocyte and its nucleus) of the liver by intragastrical introduction by Glutargin were observed during the rehabilitation period (since 60-th day).

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