

УДК 612.35:615.244:591.1

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС В РЕЗУЛЬТАТЕ НАГРУЗКИ ШРОТАМИ СЕМЯН ВИНОГРАДА И КУНЖУТА

© 2013 О.Н. Павлова¹, Т.В. Гарипов², Ю.В. Григорьева³, Н.Н. Желонкин³,
С.В. Первушкин³, А.В. Бормотов⁴, А.А. Сूपильников¹

¹ Самарский медицинский институт «РЕАВИЗ»

² Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана

³ Самарский государственный медицинский университет

⁴ Тольяттинская городская клиническая больница №5, г. Тольятти

Поступила в редакцию 07.10.2013

В статье рассмотрена структура ткани печени крыс в эмбриогенезе и онтогенезе на фоне дополнительной нагрузки внутрижелудочно шротами семян винограда и кунжута. Выявлено, что на нагрузку суспензией шрота семян винограда организм крыс отвечает угнетением апоптоза в гепатоцитах периферической части долек печени, повышенной синтетической активностью клеток, синтезирующих альбумины и белки плазмы крови, а также повышением дезинтоксикационной функции органа. На нагрузку суспензией шрота семян кунжута ткань печени эмбрионов и взрослых половозрелых крыс не отвечает патологическими изменениями, но на 21 сутки эмбриогенеза отмечается усиленная пролиферация клеток желчевыводящих протоков и у эмбрионов пролонгируется эритропоэз до момента рождения.

Ключевые слова: *гистоморфологическая характеристика печени, гепатопротекторы, крысы, шрот, виноград, кунжут*

В настоящее время заболевания различных органов, связанные с оксидативным стрессом, являются весьма распространенной проблемой, при этом патологии печени занимают ведущее место среди заболеваний органов пищеварения [8, 9]. Причинами и факторами, способствующими развитию заболеваний печени, могут быть вирусы, гормональные и метаболические нарушения, неправильное питание, хронические болезни пищеварительной системы и токсические вещества [1, 2]. В печени происходит один из этапов обезвреживания токсических веществ и подготовка их к выводу из организма. Скорость переработки токсических компонентов в печени ограничена и не может быть резко увеличена в соответствии с возрастающими потребностями организма, к тому же происходит нарушение самой функции самоочищения органа, что влечет за собой серьезные нарушения метаболизма, иммунного ответа,

детоксикации и антимикробной защиты организма [2, 6, 10]. Многообразие нарушений функций печени существенно осложняет задачу медикаментозной коррекции патологических состояний органа и требует применения фармакологических средств широкого спектра действия. Сложившаяся ситуация требует все более частого назначения гепатопротекторов, действие которых направлено на восстановление гомеостаза печени, повышение устойчивости органа к действию патогенных факторов, нормализацию функциональной активности и стимуляцию репаративно-регенерационных процессов в печени [2, 8, 10]. В связи с этим в настоящее время в практической медицине отмечается дефицит гепатопротекторов, к тому же, в лечении заболеваний печени преимущество отдается препаратам природного происхождения, сочетающих мягкое терапевтическое действие с минимумом побочных эффектов [3, 10].

На наш взгляд, этим требованиям отвечают шроты семян винограда и кунжута, получаемые компанией ООО «Золотой корень» (г. Самара). Шрот семян винограда и кунжута – это побочные продукты маслоэкстракционного производства, получаемые после извлечения масла из семян экстрагированием органическими растворителями, они представляет собой обезжиренные порошки, отличающиеся повышенным содержанием белка, богатым минеральным составом, а также ценным набором биологически активных соединений [4, 5, 7.]. По мнению исследователей [1-3, 10] при некоторых поражениях печени и дополнительных сопутствующих заболеваниях наиболее эффективно применять гепатопротекторы на основе растительного сырья в виде шротов, так как они, по сути, являются концентрированными экстрактами полифенольных соединений и практически не содержат

Павлова Ольга Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры естественнонаучных дисциплин. E-mail: casioreya13@mail.ru

Гарипов Талгат Валирахменович, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии

Григорьева Юлия Владимировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии. E-mail: JuliaG.va@yandex.ru

Желонкин Николай Николаевич, кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии

Первушкин Сергей Васильевич, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии

Бормотов Александр Васильевич, заведующий патолого-анатомическим отделением. E-mail: medvaz@ilt.ru

Супильников Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, доцент, проректор по научной деятельности и организационным вопросам

масла, которое препятствует высвобождению водорастворимых биофлавоноидов в желудочно-кишечном тракте [5, 10].

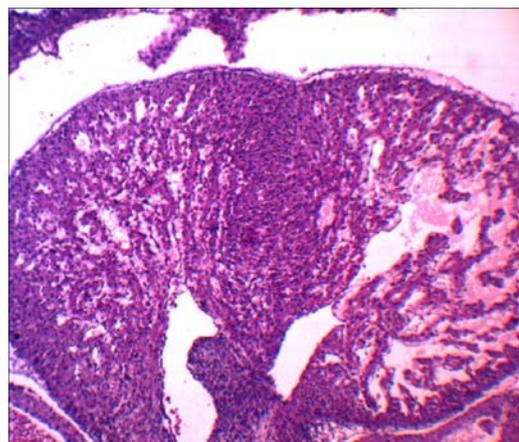
Цель исследования: изучение реактивных изменений ткани печени крыс на фоне нагрузки шротами семян винограда и кунжута как потенциальных гепатопротекторных средств.

Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие **задачи:** провести гистологический анализ ткани печени в эмбриогенезе и онтогенезе крыс на фоне дополнительной нагрузки внутрижелудочно шротами семян винограда и кунжута в виде суспензий. Исследования проводили на 30 (21 самка, 9 самцов) белых беспородных крысах массой 190-210 г, которые были поделены поровну на контрольную (интактную) и две опытные группы. Животные первой опытной группы в качестве дополнительной нагрузки получали внутрижелудочно суспензию шрота семян винограда в виде суспензии в дозе 10 мг/100 г веса тела объемом 1 мл, а второй – суспензию шрота семян кунжута аналогичной дозы и объема согласно схеме опыта. Суспензии шротов готовили на дистиллированной воде [9]

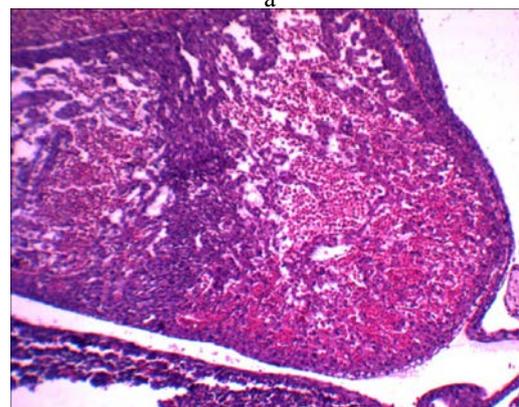
Материалом для гистологического анализа тканей печени послужили эмбрионы на 15 и 21 сутки развития, а также печень взрослых половозрелых крыс, которым в течение 30 дней до наступления беременности и до родов в качестве дополнительной нагрузки внутрижелудочно согласно группе вводили суспензии шротов семян винограда и кунжута. Контролем послужил материал от интактных крыс аналогичных сроков развития. Для получения самок с датированным сроком беременности использовали 4-4,5 месячных крыс, которым, с учетом эстрального цикла, вечером подсаживали самцов, а утром брали влажалищные мазки. Так как у крыс покрытие происходит в 1-2 часа ночи, считали день обнаружения спермы в мазке первым днем беременности.

По окончании эксперимента животных подвергали декапитации после ночного голодания, а затем извлекали печень. Фиксацию печени взрослых крыс и эмбрионов проводили в 10% забуференном формалине, затем осуществляли проводку гистологического материала с помощью аппарата гистологической проводки замкнутого типа Tissue-Tek® Vip 5 junior, а после заливали в парафиновые блоки, из которых готовили срезы толщиной 6-7 мкм. Срезы ткани печени окрашивали гематоксилином и эозином. Также проведено иммуногистохимическое исследование печени с применением набора моноклональных антител к ингибитору апоптоза (Bcl-2) и антигену пролиферации (Ki-67). Типирование проводили с использованием антител фирмы DАСО. Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Фотографическую съемку образцов ткани печени осуществляли с помощью светового микроскопа «Микромед» при увеличении х40, х100 и х200. Визуализацию препаратов проводили при помощи светового микроскопа «Микромед» и цифровой фотовидеокамеры.

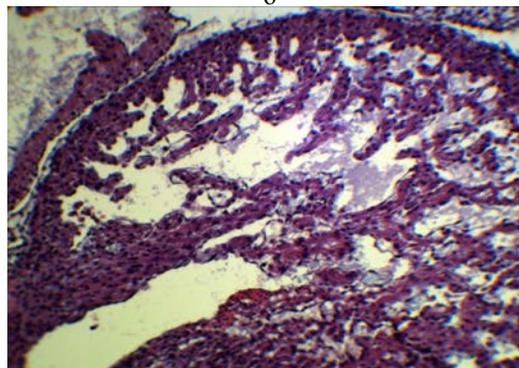
Исследование реакции ткани печени на введение суспензий шротов семян винограда и кунжута показало, что на 15 сутки эмбриогенеза балочное строение печени крыс находится в стадии формирования (рис. 1). Дольчатое строение печени у животных всех экспериментальных групп на 15 сутки эмбриогенеза не развито. В формировании печеночных балок наблюдается более плотное скопление клеток по периферии в подкапсулярной зоне и рыхлое расположение к центру за счет расширенных синусоидных пространств в глубине органа.



а



б



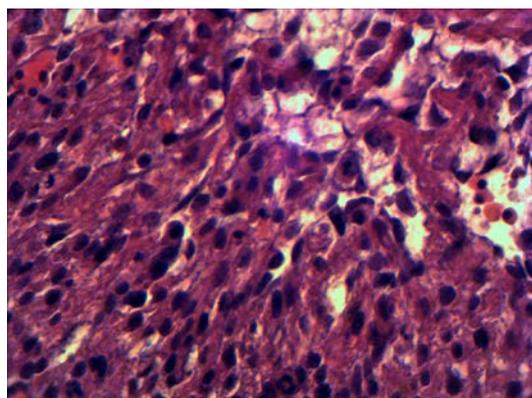
в

Рис. 1. Печень на 15 сутки эмбриогенеза. Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение х40: а – печень интактных крыс; б – печень на фоне нагрузки шротом семян винограда; в – печень на фоне нагрузки шротом семян кунжута

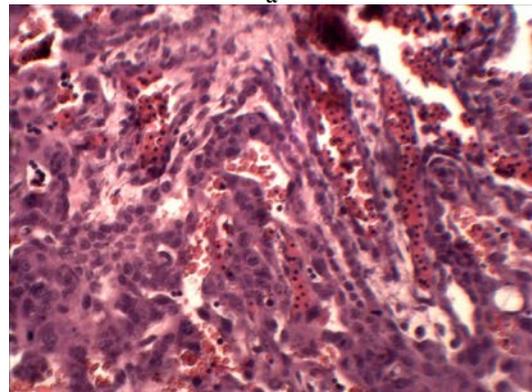
Капилляры синусоидного типа имеют расширения, которые заполнены дифференцирующимися клетками эритроцитарного ряда. Имеются

участки эритропоэза и лимфопоэза, но в печени животных опытных групп, получавших шроты, эритропоэз выражен сильнее, островков кровотоков больше, в отличие от печени животных контрольной группы, в которой встречаются только единичные эритробласты (рис. 2).

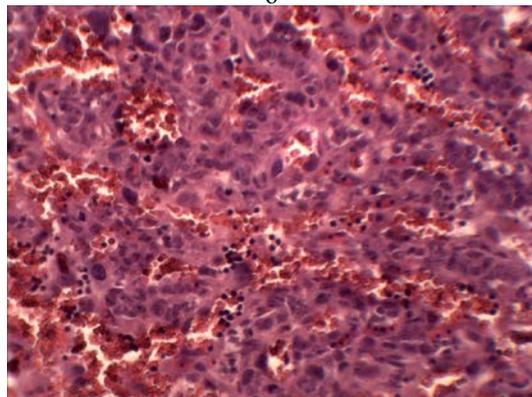
В целом развитие печени в эмбриогенезе на 15 сутки у крыс, получавших, в качестве дополнительной нагрузки, суспензии шротов семян винограда и кунжута, не отличается от контрольной группы. К 21 суткам эмбриогенеза наблюдается сформированное балочное строение печени у всех животных, находящихся в эксперименте (рис. 3).



а



б

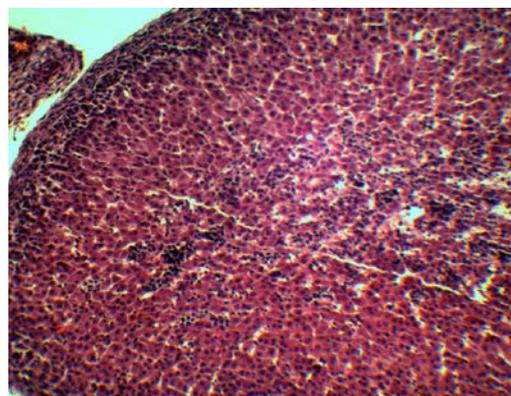


в

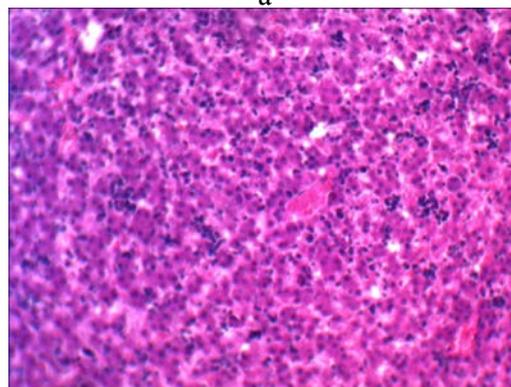
Рис. 2. Ткань печени крыс на 15 сутки эмбриогенеза. Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение x200: а – печень intactных крыс; б – печень на фоне нагрузки шротом семян винограда; в – печень на фоне нагрузки шротом семян кунжута

Наблюдается развитое радиальное строение печени. Расширенные перисинусоидальные пространства заполнены участками эритро- и

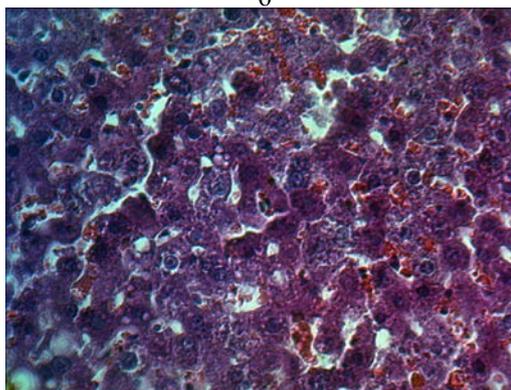
лимфопоэза, междольковая соединительная ткань и порталные тракты не развиты. Наблюдается развитое радиальное строение печени. Расширенные перисинусоидальные пространства заполнены участками эритро- и лимфопоэза, междольковая соединительная ткань и порталные тракты не развиты. Также в ткани печени животных опытных групп на 21 сутки эмбриогенеза обнаружены некоторые особенности, по сравнению с печенью животных контрольной группы.



а



б



в

Рис. 3. Ткань печени опытных крыс на 21 сутки эмбриогенеза. Окраска гематоксилин – эозин. а – печень intactных крыс. x40; б – печень intactных крыс; x40. в – печень на фоне нагрузки шротом семян кунжута. x200

В структуре органа крыс, получавших дополнительно суспензию шрота семян винограда, наблюдается формирование соединительной ткани по ходу междольковых и сегментарных желчных протоков, вокруг вен отмечается более плотное скопление гепатоцитов (рис. 4). В структуре органа крыс, получавших дополнительно суспензию шрота

семян кунжута, наблюдаются несколько увеличенные желчные протоки и расширенные желчные капилляры (рис. 5). В целом развитие печени в эмбриогенезе на 21 сутки у крыс всех опытных групп соответствует печени интактных животных.

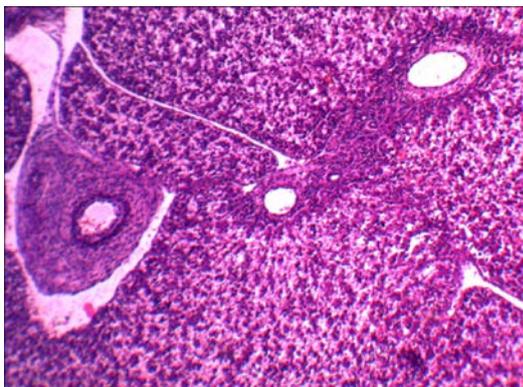
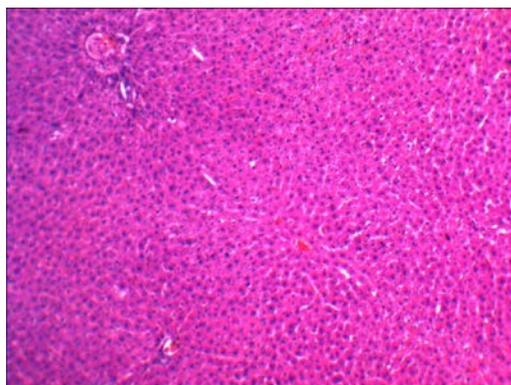


Рис. 4. Ткань печени опытных крыс на 21 сутки эмбриогенеза. Дольки печени. Окраска гематоксилином и эозином. x100

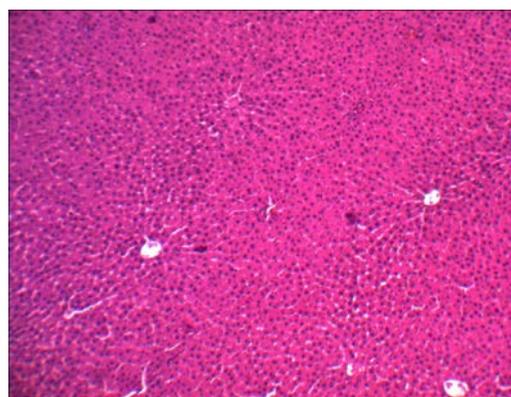


Рис. 5. Расширенные желчные протоки на 21 сутки эмбриогенеза. Окраска гематоксилин – эозин. x200

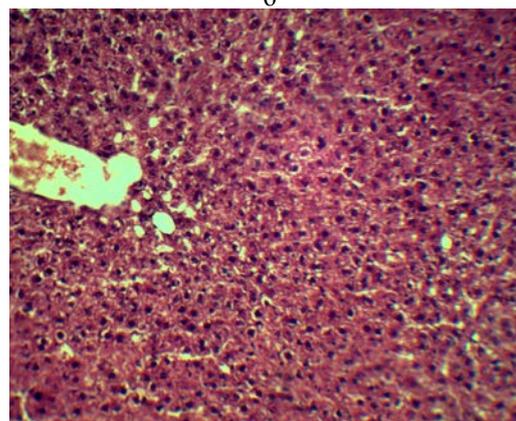
К четырем месяцам онтогенеза в структуре печени крыс контрольной и обеих опытных групп портальные тракты сформированы, между дольками соединительная ткань отсутствует, структура долек четко определяется, желчные капилляры не видны, гемопоэз отсутствует (рис. 6). В печени животных, получавших шрот семян кунжута, наблюдается мелкокапельная и среднекапельная жировая дистрофия, которая отсутствует у животных интактной и второй экспериментальной группы.



а



б



в

Рис. 6. Ткань печени опытных крыс на 4 месяца онтогенеза. Окраска гематоксилин – эозин. а – печень интактных крыс. x100. б – печень на фоне нагрузки шротом семян винограда. x40. в – печень на фоне нагрузки шротом семян винограда. x40

Проведенные иммуногистохимические исследования печени интактных крыс в изучаемые периоды развития с применением набора моноклональных антител к ингибитору апоптоза (Bcl-2) показали, что на 100 клеток положительная экспрессия антигена в ядрах выявляется в $8,7 \pm 0,29$ гепатоцитах, а к антигену пролиферации (Ki-67) положительная экспрессия антигена в ядрах выявляется в $10,3 \pm 0,35$ гепатоцитах в эмбриональные периоды развития. К четвертому месяцу онтогенеза отмечается выравнивание показателей пролиферации и апоптоза: на 100 клеток положительная экспрессия антигена к ингибитору апоптоза (Bcl-2) в ядрах выявляется в $7,1 \pm 0,26$ гепатоцитах, а к антигену пролиферации (Ki-67) – $7,7 \pm 0,25$ гепатоцитах. Иммуногистохимические исследования тканей печени на 15 и 21 сутки эмбриогенеза с применением моноклональных антител к антигену пролиферации (Ki-67) у крыс, получавших шрот семян винограда, не выявили достоверно значимых отличий от экспрессии антигена у животных контрольной группы. Но в тканях печени 4-х месячных крыс опытной группы наблюдалась пролиферация эндотелия сосудов и пролиферация гепатоцитов (на 100 клеток $15,6 \pm 0,55$ пролиферируют) в отличие от интактных животных (рис. 7).

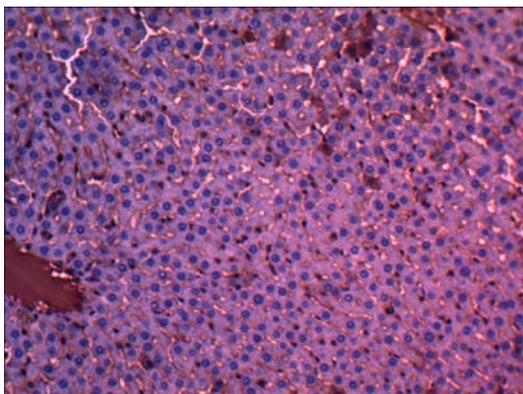


Рис. 7. Печень экспериментальной крысы, получавшей шрот семян винограда на 4 месяц онтогенеза. Положительная экспрессия маркера в ядрах отдельных гепатоцитов и ядрах эндотелия сосудов. Иммуногистохимическое исследование экспрессии антигена пролиферации Ki-67. x100

В результате иммуногистохимического исследования тканей печени крыс, на фоне нагрузки шротом семян винограда, на 15 и 21 сутки эмбриогенеза, а также печени 4-месячных крыс с применением набора моноклональных антител к ингибитору апоптоза (Bcl-2) было выявлено, что на 15 сутки эмбриогенеза показатели частоты экспрессии антигена соответствуют интактным животным. На 21 сутки эмбриогенеза заметно увеличение частоты экспрессии антигена (Bcl-2) в клетках лимфоидного ряда и в эндотелиоцитах синусоидных капилляров (рис. 8).

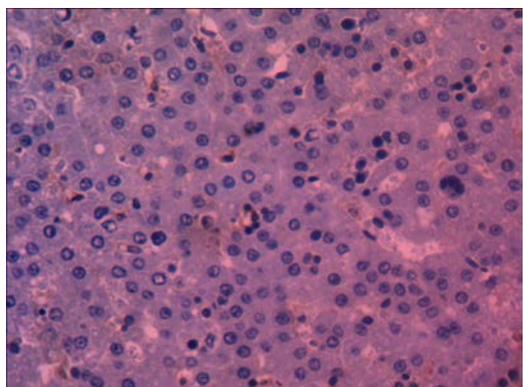


Рис. 8. Печень экспериментальной крысы, получавшей шрот семян винограда, на 4 месяц онтогенеза. В клетках лимфоидного ряда выраженная экспрессия антигена. Иммуногистохимическое исследование антител к ингибитору апоптоза Bcl-2. Увеличение x200

В тканях печени 4-х месячных крыс, получавших шрот семян винограда, имеет место выраженная экспрессия антигена, наблюдается ингибирование апоптоза в гепатоцитах по периферии долек печени (рис. 9). Иммуногистохимические исследования тканей печени крыс, получавших шрот семян кунжута, на 15 и 21 сутки эмбриогенеза и 4 месяц онтогенеза с применением моноклональных антител к ингибитору апоптоза (Bcl-2) не выявили особенностей.

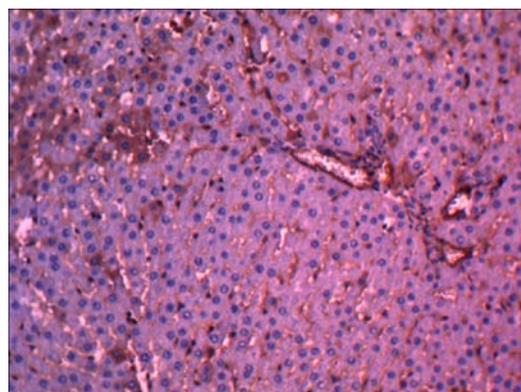


Рис. 9. Печень экспериментальной крысы, получавшей шрот семян винограда, на 4 месяц онтогенеза. В гепатоцитах по периферии печени выраженная экспрессия антигена. Иммуногистохимическое исследование антител к ингибитору апоптоза Bcl-2. x200

Иммуногистохимическое исследование тканей печени крыс, получавших шрот семян кунжута, на 15 и 21 сутки эмбриогенеза и 4 месяц онтогенеза с применением моноклональных антител к маркеру пролиферации (Ki-67) показало, что наиболее значимые отличия от печени крыс интактной группы выявляются в органе на 15 и 21 сутки эмбриогенеза и свидетельствуют об увеличении частоты экспрессии антигена в эпителии желчевыводящих протоков.

Выводы:

1. На нагрузку суспензией шрота семян винограда организм крыс отвечает отсутствием апоптоза в гепатоцитах периферической части долек печени, повышенной синтетической активностью клеток, синтезирующих альбумины и белки плазмы крови. В тоже время, усиленная пролиферация клеток центральной части печени является фактором повышения дезинтоксикационной функции органа.

2. На нагрузку суспензией шрота семян кунжута ткань печени эмбрионов и взрослых половозрелых крыс не отвечает патологическими изменениями, но на 15 и 21 сутки эмбриогенеза отмечается усиленная пролиферация клеток желчевыводящих протоков, что подтверждают данные иммуногистохимического исследования. Также на фоне нагрузки шротом семян кунжута, у эмбрионов пролонгируется эритропоэз до момента рождения (по сравнению с животными контрольной группы).

3. Реактивные изменения ткани печени крыс в результате нагрузки шротом семян винограда на клеточном уровне подтвердили гепатопротекторный эффект шрота, обнаруженный нами в предыдущих исследованиях ферментов системы перекисного окисления липидов-антиоксидантов печени на экспериментальной модели токсического гепатита [3,5]. Однако на основании проведенного эксперимента достоверных данных о гепатопротекторном действии шрота семян кунжута не получено, но, вероятно, на фоне нагрузки шротом изменяется экзокринная функция печени, проявляющаяся в образовании желчи и секреции белков плазмы крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Белозерова, Л.А. Роль перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты в патологии печени и эритроцитов / Л.А. Белозерова, Т.П. Генинг // Система перекисного окисления липидов – антиоксиданты в норме и патологии. – Ульяновск: Вектор-С, 2008. С. 113-141.
2. Сазонова, О.В. Влияние окружающей среды на заболеваемость органов пищеварения / О.В. Сазонова и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Спец. выпуск «XIII конгресс «Экология и здоровье человека»». 2008. Том 2. С. 151-154.
3. Куркин, В.А. Флавоноиды как перспективный источник экопротекторов // Экология и здоровье человека: труды XI Всероссийского конгресса на тему: «Проблемы выживания человека в техногенной среде современных городов» 5-7 декабря 2006. – Самара, 2006. С. 159-160.
4. Логинов, Г.П. Исследование противотоксических свойств фитогепатопротектора «ВинСпир» / Г.П. Логинов, О.Н. Павлова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины. Казань. 2010. Т. 204. С. 135-140.
5. Магомедова, Е.С. Фенольные вещества и витамины винограда в зависимости от экологических факторов / Е.С. Магомедова, З.К. Бахмулаева // Виноград и вино России. 2000. № 2. С. 14-15.
6. Мубаракишина, О.А. Гепатопротекторы: сравнительная характеристика и аспекты клинического использования // Медицинский вестник. 2008. № 34. С. 20-23.
7. Павлова, О.Н. Оценка морфологического состава крови крыс на фоне нагрузки внутрижелудочно шротами семян винограда, граната и кунжута // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. Самара. 2012. №1/2012. С. 43-47.
8. Павлова, О.Н. Исследование гепатопротекторного действия биологически активной добавки «ВинСпир» / О.Н. Павлова, Н.Н. Желонкин, С.В. Первушкин и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук «13 конгресс «Экология и здоровье человека»» – Самара: Самарский научный центр Российской академии наук. 2008. Т. 2. С. 253-257.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. 832 с.
10. Христенко, Н.Е. Гепатопротекторы – путь к улучшению качества жизни / Н.Е. Христенко, С.Я. Ананько // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012. № 1. С. 63-64.

REACTIVE CHANGES OF RATS LIVER TISSUE AS A RESULT OF LOADING BY GRAPES SEEDS AND SESAME SEEDS EXTRACTION CAKES

© 2013 O.N. Pavlova¹, T.V. Garipov², Yu.V. Grigoryeva³, N.N. Zhelonkin³, S.V. Pervushkin³, A.V. Bormotov⁴, A.A. Supilnikov¹

¹Samara Medical Institute "REAVIZ"

²Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman

³Samara State Medical University

⁴Toglyatti City Clinical Hospital No. 5, Toglyatti

In article the structure of rats liver tissue in embryogenesis and ontogenesis against additional loading intraventriculus by grapes seeds and sesame cakes is considered. It is revealed that suspension of extraction cakes of grapes seeds the organism of rats answers loading with oppression of apoptosis in hepatocytes to peripheral part of segments of the liver raised by synthetic activity of cells, synthesizing albumine and proteins of blood plasma, and also increase of desintoxication function of body. Suspension of extraction cakes of sesame seeds the liver tissue of embryos and mature rats doesn't answer loading with pathological changes, but for 21 days of embryogenesis the strengthened proliferation of cells in bile-extracting channels is noted and at embryos is prolonged erythropoiesis until the birth.

Key words: *histomorphological characteristic of liver, hepatoprotector, rats, extraction cakes, grapes, sesame*

Olga Pavlova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Department of Natural-Science Disciplines. E-mail: casiopoya13@mail.ru; Talgat Garipov, Doctor of Veterinary, Professor, Head of the Physiology Department; Yuliya Grigoryeva, Candidate of Medicine, Associate Professor at the Department of Histology and Embryology. E-mail: JuliaG.va@yandex.ru; Nikolay Zhelonkin, Candidate of Pharmacy, Senior Lecturer at the Pharmaceutical Technology Department; Sergey Pervushkin, Doctor of Pharmacy, Professor, Head of the Pharmaceutical Technology Department; Alexander Bormotov, Chief of the Pathology-Anatomic Department. E-mail: medvaz@tlt.ru; Aleksey Supilnikov, Candidate of Medicine, Deputy Rector on Scientific Work and Organization Questions