

Клименкова И.В., кандидат ветеринарных наук, доцент
Лазовская Н.О., кандидат ветеринарных наук, доцент
Спиридонова Н.В., кандидат ветеринарных наук, доцент

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

МИКРОМОРФОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС И ЕЕ РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИГЕЛЬМИНТНОГО ПРЕПАРАТА

Резюме

В статье отражены основные морфологические, морфометрические и гистохимические показатели печени в связи с физиологическими процессами, протекающими у половозрелых лабораторных крыс, а также установлен уровень токсичности антигельминтного препарата суспензия «Триклафен».

Summary

The article reflects the main morphological, morphometric and histochemical indices of the liver in connection with the physiological processes occurring in adult lab rats, and also established the level of toxicity of the anthelmintic drug «Triclafen» suspension.

Поступила в редакцию 12.04.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

Печень, являясь железой пищеварительной системы, характеризуется широким спектром функциональных отправления и высоким уровнем регенерации. С непосредственным участием печени в организме протекают сотни метаболических реакций, затрагивающих все виды обменных процессов. В процессах обмена липидов гепатоциты синтезируют жирные кислоты, холестерин, желчные кислоты и формируют липопротеиды очень низкой и высокой плотности. В печени происходит депонирование гликогена, необходимого для организма, жирорастворимых витаминов (А, D, E, К), витамина В₁₂, железа, а также синтез белков плазмы крови [1, 2, 6].

Разнообразие функций гепатоцитов приводит к тому, что в случаях возникновения в них различных изменений происходит нарушение многих биохимических констант, поэтому ранняя диагностика патологий печени, своевременно проведенное лечение являются определяющими факторами в условиях интенсивного ведения животноводства.

По реактивным изменениям структурных компонентов печени определяют также и уровень токсичности лекарственных препаратов. Фармацевтические предприятия ветеринарного профиля располагают ресурсами, позволяющими производить современные конкурентоспособные препараты. Однако возникает необходимость в проведении серии лабораторных исследований, подтверждающих безопасность и эффективность воздействия новых препаратов на биологические объекты перед запуском их производства в промышленном масштабе. В этой связи принимается во внимание статус печени как мощного биологического фильтра, способного нейтрализовать вредные токсические вещества. Однако в результате этого процесса регистрируются изменения структурных компонентов органа, характер и степень которых являются показателями уровня токсичного исследуемого лекарственного препарата [5, 10].

Многочисленными исследованиями установлено, что выраженные нарушения гомеостаза любой этиологии сопровожда-

ются развитием у больных эндогенной интоксикации, что незамедлительно отражается на уровне функциональной активности печени.

В настоящее время проблема инфекционных болезней животных, в том числе и инвазионных патологий, стоит достаточно остро, несмотря на ряд мер, предпринимаемых ветеринарными специалистами хозяйства [10].

В последнее время все чаще животные поражены не одним видом гельминта, а несколькими. По данным многих авторов в организме больных животных развиваются тяжёлые патологические изменения, дестабилизируются иммунные процессы, что приводит к усугублению разнообразных функциональных нарушений органов и систем [3, 5, 7, 11].

В связи с тем, что гельминты вызывают нарушение многих видов обмена веществ в организме животных, существует необходимость изыскания высокоэффективных и доступных по цене препаратов с минимальными побочными эффектами для борьбы с этими болезнями [5, 9, 10].

Учитывая значение печени как самой большой и функционально значимой железы организма, мы сочли целесообразным и перспективным изучение цитоархитектоники органа, определение морфологических, морфометрических и гистохимических показателей в связи с основными физиологическими процессами, протекающими у половозрелых лабораторных крыс, а также установление токсичности антигельминтного препарата суспензия «Триклафен», в состав которого в качестве активно действующих веществ входят триклабендазол и фенбендазол [4, 5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфологические, морфометрические и гистохимические исследования печени проведены на материале от 15 половозрелых лабораторных крыс.

Для определения степени развития общеклеточных органелл, а следовательно, и уровня функциональной активности же-

лезистых клеток печени образцы подвергали обработке гистохимическими методами.

Гистохимическое исследование ферментов имеет свои специфические особенности:

а) в ходе гистохимической реакции выявляется не сам фермент, а продукт, образующийся в результате взаимодействия фермента с субстратом (вещество, на которое воздействует данный фермент);

б) для определения истинной локализации фермента в микроструктурах необходимо, чтобы продукт его деятельности был тут же осажден в виде нерастворимого соединения.

В конечном итоге мы получаем характеристику активности исследуемого фермента. Чем большее количество продукта образуется в результате взаимодействия фермента и субстрата, тем более выражена окраска структур и, следовательно, выше активность фермента. Наоборот, ослабление окраски свидетельствует о понижении уровня этой активности.

Щелочная фосфатаза, или неспецифическая фосфомоноэстераза, участвует не только во многих обменных реакциях клетки, но и в транспортных процессах. Кислая фосфатаза – типичный маркер лизосом, то есть пищеварительного аппарата клетки [8].

Для определения локализации и активности щелочной фосфатазы применяли замороженные срезы толщиной 10–15 мкм. Инкубацию проводили при температуре 37 °С (8–12 часов) в смеси:

- 2%-ный раствор глицерофосфата натрия,
- 2%-ный раствор медиала,
- 2%-ный раствор хлористого кальция,
- М/50 раствор хлористого магния.

В результате черные отложения сульфита кобальта указывали на местоположение активного энзима. Активность щелочной фосфатазы выявлялась по методу Гомори [8].

Кислая фосфатаза – это типичный маркер лизосом, т.е. пищеварительного

аппарата клетки. Для выявления этого энзима использовали уже упомянутый метод Гомори [8].

Инкубацию срезов проводили при температуре 37 °С (8–12 часов) в смеси:

- ацетатный буфер рН 4,7–5,0,
- М/10 раствор азотнокислого свинца,
- 2%-ный раствор β-глицерофосфата.

В результате наличие черно-коричневого осадка сульфата свинца указывало на присутствие активного фермента [8].

Количественную оценку активности щелочной и кислой фосфатаз осуществляли на базе сканирующего микроскопа-фотометра MPV-2 в монохроматическом луче с длиной волны для РНК – 550 нм, фосфатаз – 500 нм при измерительном окуляре 6,3, объективе 25, размере зонда на плоскости препарата 4×4 мкм в 100–150 точках микрообъекта, взятых произвольно.

Стандартную точку – эталон принимали за 100 %. Коэффициент пропускания, выраженный в процентах, переводили в оптическую плотность (D) и выражали в относительных единицах оптической плотности (отн.ед. опт.пл.). Для этих целей использовали специальные таблицы «Соотношение коэффициента пропускания (τ) и оптической плотности (D)».

Изучение острой токсичности антигельминтного препарата суспензия «Триклафен» проводили на десяти группах половозрелых лабораторных крыс: девяти подопытных и одной контрольной, по шесть особей обоего пола в каждой.

Для изучения особенностей микроскопического строения печени гистосрезы были окрашены гематоксилин-эозином.

Морфометрические исследования проводили с помощью микроскопов BIO-LAR, Olimpus BX-41 с прикладной программой «Cell-A». Для получения отдельных показателей применяли сетку Автандилова-Стефанова и окулярный винтовой микрометр МОВ-1-15^х. Весь экспериментальный цифровой материал был подвергнут статистической обработке на ПЭВМ с помощью программы «Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Масса печени половозрелых крыс – в среднем 14 грамм, что составляет 4–7 % от массы животного.

Печень характеризуется наличием следующих долей: левая боковая (наиболее крупная), левая внутренняя, правая внутренняя, правая боковая, хвостовая и добавочная.

Печень темно-коричневого цвета, умеренной плотности. Морфометрические характеристики органа соответствуют следующим параметрам: длина 47±0,92 мм, ширина 39,4±0,96 мм, толщина 19,4±0,35 мм.

При гистологическом исследовании ткани печени у клинически здоровых животных выявляется следующая гистологическая картина: паренхима представлена дольками, имеющими правильную гексагональную форму размером 0,2–0,4 мм. Они состоят из радиально расположенных печеночных балок, представляющих собой анастомозирующие тяжи печеночных клеток. Между балками расположены синусоидные капилляры печени, внутренняя выстилка которых сформирована эндотелиальными клетками. В центре долек визуализируются центральные вены, средний диаметр которых составляет 87,6±2,3 мкм, часть сосудов заполнены кровью. Поскольку в печени крыс междольковая соединительная ткань развита слабо, границы между дольками выявляются нечетко.

В печени половозрелой лабораторной крысы регистрируется сбалансированный структурный гомеостаз, который проявляется прежде всего тесным взаимодействием стромальных структур с компонентами паренхимы. Гепатоциты четко структурированы, имеют средние размеры, их ядра округлые, занимают центральную часть клеток. Показатель диаметра ядер колеблется в достаточно широких пределах. Кроме этого, обнаруживается, что у 38 % гепатоцитов имеется по два ядра.

Толщина капсулы – 36,4±0,7 мкм. Волокна в наружной ее части расположены плотно, параллельно друг другу, поэтому окраска в этой зоне гораздо интенсив-

нее, чем во внутренней части. Клеточные структуры стромальных элементов – в основном фибробласты и фиброциты – хорошо структурированы, вытянутой формы. Ярко выраженная внутريدольковая рыхлая соединительная ткань обнаруживалась у лабораторных крыс только в зоне вокруг сосудов, которая является камбиальным участком печени.

Средние показатели диаметра ядра (7,86 мкм) и клетки (12,78 мкм) свидетельствуют о высоком уровне функциональной активности гепатоцитов.

При проведении гистохимических исследований установлено, что кислая фосфатаза активно выявляется в цитоплазме гепатоцитов в виде четко выраженной зернистости. В околядерной зоне энзим характеризуется также высоким уровнем активности, проявляя темно-коричневую окраску. Количественные показатели этих ферменты выглядят следующим образом: апикальный полюс – $0,319 \pm 0,032$, базальный полюс – $0,472 \pm 0,028$.

Щелочная фосфатаза выявляется в гепатоцитах и в эндотелии кровеносных сосудов. Энзим в цитоплазме гепатоцитов представлен крупной, чаще глыбчатой зернистостью. Больше активного фермента локализовано в базальных полюсах, несколько в меньшей степени – апикальных. В околядерной зоне сплошного размещения фермента не выявляется. Здесь энзим обнаруживается в виде отдельных окрашенных тяжей. В эндотелии кровеносных сосудов фермент представлен в виде достаточно широкой полосы черного цвета, размытой, не имеющей четких границ. В результате исследований получены следующие количественные данные: апикальный полюс – $0,323 \pm 0,025$, базальный полюс – $0,479 \pm 0,053$, сосуды – $0,318 \pm 0,016$, околядерная зона – $0,428 \pm 0,065$.

При изучении острой токсичности антигельминтного препарата суспензия «Триклафен» проведены исследования и получены следующие результаты: крысам первой подопытной группы натошак в желудок вводили по $5,0 \text{ см}^3$ препарата, что соответствует $25000,0 \text{ мг/кг}$, второй – по

$4,0 \text{ см}^3$ ($20000,0 \text{ мг/кг}$), третьей – по $3,5 \text{ см}^3$ ($17500,0 \text{ мг/кг}$), четвертой – по $3,0 \text{ см}^3$ ($15000,0 \text{ мг/кг}$), пятой – по $2,5 \text{ см}^3$ ($12500,0 \text{ мг/кг}$), шестой – по $2,0 \text{ см}^3$ ($10000,0 \text{ мг/кг}$), седьмой – по $1,5 \text{ см}^3$ ($7500,0 \text{ мг/кг}$), восьмой – по $1,0 \text{ см}^3$ ($5000,0 \text{ мг/кг}$), девятой – по $0,5 \text{ см}^3$ ($2500,0 \text{ мг/кг}$ массы животного).

Десятая группа крыс служила контролем: им вводили по $5,0 \text{ см}^3$ воды очищенной. Животные содержались в виварии УО ВГАВМ на стандартном пищевом рационе. Кормление проводили через 3 часа после введения препарата. Срок наблюдения за подопытными животными составлял 14 суток.

Во всех подопытных группах, кроме девятой, в разное время наблюдения отмечался падеж животных, которому предшествовали угнетение, одышка и асфиксия. При гистологическом исследовании печени, взятой от павших крыс, получавших триклафен в дозе $25000,0 \text{ мг/кг}$, были установлены мелкокапельная жировая дистрофия отдельных гепатоцитов, умеренный серозный отек и лимфоидно-макрофагальная инфильтрация паренхимы органа. Животные контрольной и 6–9 подопытных групп были подвергнуты эвтаназии и патологоанатомическому вскрытию. При этом видимых изменений со стороны внутренних органов обнаружено не было. При гистологическом исследовании печени животных девятой группы, получавших триклафен в дозе $5000,0 \text{ мг/кг}$, отмечали зернистую, местами вакуольную дистрофию гепатоцитов, а также гиперемию сосудов. В печени крыс, получавших препарат в дозе $2500,0 \text{ мг/кг}$, морфологических изменений не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные морфологические, морфометрические и гистохимические данные основных структурных компонентов печени клинически здоровых половозрелых лабораторных крыс коррелируют с физиологическим состоянием организма животных, а также обеспечивают расширение инфор-

мационного пространства, касающегося видовых особенностей строения печени.

При проведении исследований по определению токсикологических свойств антигельминтного препарата суспензия

«Триклафен» установлено, что в дозе 2500,0 мг/кг он не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александровская, О.В. Цитология, гистология и эмбриология: учеб. пособие / О.В. Александровская, Т.Н. Радостина, Н.А. Козлов. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 384–385.
2. Артюшевский, А.А. Гистология с техникой гистологических исследований / А.А. Артюшевский, А.С. Леонтьев, Б.А. Слука. – Минск: Вышэйшая школа, 1999. – С. 208–212.
3. Баркалова, Н.В. Влияние комплексной терапии на процессы эндогенной интоксикации в организме животных при сочетанной инвазии / Н.В. Баркалова // Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития: материалы Междунар. науч.-практ. конф. / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.В. Вавилова. – Саратов, 2012. – С. 26–29.
4. Баркалова, Н.В. Контроль качества нового антигельминтного препарата суспензия «Триклафен» / Н.В. Баркалова // Актуальные проблемы болезней обмена веществ у сельскохозяйственных животных в современных условиях: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 40-летию ГНУ ВНИВИПФиТ, г. Воронеж, 30 сентября – 2 ноября 2010 г.). – Воронеж: ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», 2010. – С. 43–46.
5. Баркалова, Н.В. Фармако-токсикологическая характеристика и противопаразитарная эффективность триклафена в сочетании с витаминами у жвачных животных: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.03, 03.02.11 / Н.В. Баркалова; УО ВГАВМ. – Витебск, 2012. – 23 с.
6. Билич, Г.Л. Биология. Полный курс / Г.Л. Билич, В.А. Крыжановский – М.: Оникс 21 век, 2004. – Т. 1: Анатомия. – С. 693–694.
7. Демидов Н.В. Фасциолез животных. – М.: Колос, 1965. – С. 52–59.
8. Меркулов, Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов. – 5-е изд., испр. и доп. – Л.: Медицина, 1969. – 432 с.
9. Перекисное окисление липидов и эндогенная интоксикация (значение в патогенезе болезней животных, пути коррекции): монография / С.С. Абрамов [и др.] – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 208 с.
10. Петров, В.В. Эндогенный токсикоз и его коррекция раствором натрия гипохлорита / В.В. Петров // Практик. – 2004. – № 11/12. – С. 93–97.
11. Ятусевич, А.И. Проблемы и перспективы развития ветеринарной паразитологии / А.И. Ятусевич // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: сб. науч. тр. – Витебск, 2002. – Т. 38, ч. 1. – С. 130–132.

наша продукция

