

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Авторы, 2014
УДК 616.36-091:616.34-022.7

**МОРФОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ ТЕРАПИИ
КОЛЛОИДНЫМ НАНОАКВАХЕЛАТОМ СЕРЕБРА**

*Е.С. ПОЛОВЬЯН, Р.А. МОСКАЛЕНКО, Н.Д. ЧЕМИЧ,
А.Н. РОМАНЮК, С.Д. БОНЧЕВ*

Сумский государственный университет, г. Сумы

**THE MORPHOLOGY OF THE LIVER IN CASE
OF EXPERIMENTAL ACUTE INTESTINAL INFECTION IN A THERAPY
COLLOIDAL NANOACCUMULATOR SILVER**

*E.S. POLOVYAN, R.A. MOSKALENKO, M.D. CHEMYCH,
A.M. ROMANYUK, S.D. BONCHEV*

Sumy state University, Sumy

Изучены морфологические изменения печени самцов крыс при острой кишечной инфекции, вызванной условно патогенными микроорганизмами. Применение наноаквахелата серебра уменьшает активность воспалительного процесса и морфологических изменений в печени. Исследование ткани печени с помощью сканирующей электронной микроскопии с микроанализом показало отсутствие накопления серебра в органе.

Ключевые слова: печень, морфология, наноаквахелат серебра, сканирующая электронная микроскопия, острая кишечная инфекция.

The morphological state and morphometric indexes of liver of rats are studied in the conditions of design on males of rats of the acute intestinal infection caused by conditionally pathogenic flora. The application of nanosilver diminishes activity of

inflammatory process and morphological changes in an organ. Research of tissue of liver by means of scanning electronic microscopy with microanalysis showed absence of accumulation of silver in an organ.

Keywords: liver, morphology, nanosilver, scanning electronic microscopy, acute intestinal infection.

Введение

За последнее десятилетие на Украине, как и во всем мире, ежегодно растет заболеваемость острыми кишечными инфекциями (ОКИ), которые по количественным показателям стабильно занимают второе место в структуре инфекционной патологии. При этом наблюдается увеличение роли условно патогенной микрофлоры (УПМ) семейства Enterobacteriaceae (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescendes* и др.) [2]. Одной из причин высокой частоты ОКИ, является высокая пластичность УПМ, обусловленная генетическим контролем активации факторов патогенности, антагонизмом с представителями нормальной микрофлоры, способностью к образованию биопленок [1]. Также, вследствие неконтролируемого использования населением антибиотиков (АБ), происходит искусственная селекция УПМ с множественной устойчивостью к медикаментам. Таким образом, происходит циркуляция АБ во внешней среде, что приводит к антибиотикорезистентности УПМ [5]. Исходя из это-

го, возникает необходимость пересмотра традиционного этиотропного лечения ОКИ, вызванных УПМ.

Сегодня значительный теоретический и практический интерес вызывают научные разработки нанотоксикологии и нанофармакологии по выяснению биофизических механизмов действия наночастиц на функции органов и систем организма, различных клеток, их мембран, митохондрий, рибосом, ферментов, нуклеиновых кислот [7]. Современные нанотехнологии позволяют воздействовать на пораженные органы и системы без негативного влияния общее состояние здоровья [3, 4]. Например, в качестве альтернативы АБ используется коллоидный наноаквахелат серебра, стабилизированный лимонной кислотой, с размерами частиц 25 нм. Именно такие размеры позволяют действующему препарату занимать большую площадь, что приводит к увеличению контакта серебра с возбудителями инфекционных заболеваний [11].

Для объяснения механизма действия наносеребра используется абсорбционная теория, согласно которой этот химический элемент поглощается

бактериальными протопластами с дальнейшим связыванием тиамин и гуанина ДНК и деструкцией мембраны, что приводит к гибели возбудителя [10]. Широкий спектр антисептического действия серебра, отсутствие к нему резистентности у микроорганизмов, способствуют повышению заинтересованности исследователей к этому микроэлементу во многих странах мира. На современном этапе серебро относят в группу микроэлементов с малоизученной биологической ролью, и, учитывая изменение физико-химических свойств серебра в нанометровом диапазоне, необходимо создание практического и теоретического базиса нанофармакологии и нанотоксикологии для предупреждения ятрогенных микроэлементозов, в данном случае, аргирозов [8].

Цель исследования

Изучение влияния препарата коллоидного наноаквахелата серебра на морфологию печени на экспериментальной модели ОКИ, вызванной УПМ.

Материалы и методы

Эксперимент проводили согласно положения “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, Франция, 1985 г.). ОКИ вызывали у 16 половозрелых самцов крыс массой 200-250 г путем перорального введения 1,0 мл смеси куль-

тур УПМ каждые 4 часа на протяжении 5 дней (*E. coli* гемолизирующая 10^{10} КОЕ/мл, *K. pneumoniae* 10^{10} КОЕ/мл, *St. aureus* (гиалуронидазная, лецитиназная, коагулазная, гемагглютинирующая активность) 10^{10} КОЕ/мл, *Ps. aeruginosae* 10^{10} КОЕ/мл, *Enterobacter cloacae* 10^{10} КОЕ/мл, *Str. fecalis* 10^{10} КОЕ/мл). Животные были разделены на две группы: 1-ой контрольной группе (8 крыс) – в качестве базисной терапии перорально вводили регидрон (2,5 мл/сутки), смекту (0,15 г/сутки в 3 приема) и панкреатин (12 мг/сутки в 3 приема); 2-я экспериментальная группа (8 крыс) – на фоне базисной терапии перорально получала по 2 мл коллоидного наноаквахелата серебра (0,02 мг/сутки), стабилизированного лимонной кислотой, с концентрацией 10мг/л каждые (24±2) часа в течение 7 дней. Раствор наносеребра необходимой концентрации готовили *ex tempore*. Общая длительность эксперимента составила 14 дней.

После выведения животных из эксперимента путем декапитации в условиях эфирного наркоза, осуществляли взятие фрагмента печени. Проводку, заливку материала, изготовление гисто-логических срезов. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике [6]. В печеночной ткани измеряли площадь ядер и цитоплазмы гепатоцитов, подсчитывали количество клеток Купфера

в поле зрения и количество гепатоцитов в печеночной балке [9]. Микрофотографии гистологических препаратов получали и обрабатывали с помощью цифровой системы вывода изображения «SEO Scan ICX 285 AK-F IEE-1394» и морфометрической программы «SEO Image Lab 2.0» (Сумы, Украина).

Для проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с микроанализом исследуемые образцы печени нарезали на блоки размером 3x3 мм и толщиной 1-1,5 мм, которые фиксировали в 3,125 % растворе глютарового альдегида на фосфатном буфере. Минимальное время фиксации образцов составляло 4-5 часов. Далее образцы промывали фосфатным буфером (рН 7,2) и помещали в 1% раствор тетраоксида осмия на том же фосфатном буфере на 2 часа. После фиксации осмием образцы промывали трижды бидистиллированной водой. Затем проводилась дегидратация в спиртах возрастающей концентрации. Обезвоженные образцы помещали в вакуумную камеру для просушивания под разрежением в течение 5 часов. Далее высушенные образцы монтировали на предметных столиках и напыляли золотом. Исследование проводилось на сканирующем электронном микроскопе РЕМ 100-У с микроанализом (ПО «Электрон», Сумы).

Результаты и их обсуждение

В ходе эксперимента у исследуемых животных на $(2,88 \pm 0,18)$

день введения смеси культур УПМ наблюдалось угнетение познавательной и двигательной активности, снижение потребления корма. К четвертому дню $(4,63 \pm 0,13)$ присоединились жажда, жидкий стул зелено-коричневого цвета без примесей слизи, крови; наблюдалось снижение массы тела на $9,81 \pm 0,3$ %.

Во время лечения подопытных крыс обеих групп нормализация двигательной реакции, и активности употребления корма наступала в одинаковые сроки – на второй день $(2,13 \pm 0,53)$ от начала лечения. Использование разных схем лечения повлияло на длительность диарейного синдрома. Так, у крыс 2-й группы быстрее, по сравнению с 1-й, происходила нормализация функции кишечника на третьей $(3,88 \pm 0,13)$ и пятой $(5,38 \pm 0,18)$ сутки от начала лечения соответственно, $p < 0,001$. За весь период наблюдения за животными летальных случаев не было.

В условиях базисной терапии ОКИ, вызванной УПМ, в печени были выявлены морфологические изменения. Гистологическая структура печени характеризовалась частичной дисконплексацией печеночных балок, отеком паренхимы. Наблюдалось умеренное количество двуядерных гепатоцитов, некоторые печеночные клетки находились в состоянии выраженной баллонной дистрофии (рис. 1).

Портальные тракты расширены за счет отека и воспалительной ин-

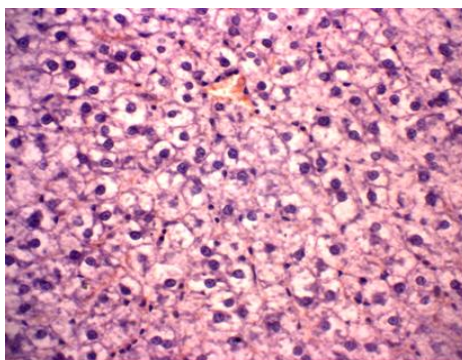


Рис. 1. Печень после базисной терапии ОКИ, вызванной УПМ.; Гепатоциты в состоянии баллонной дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. X 360

фильтрации. В перипортальной зоне определялась незначительная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация с формированием одиночных очагов некрозов. В поврежденных портальных трактах отмечались деструктивные изменения желчных протоков, дистрофические изменения эндотелия сосудов. Воспаление иногда распространялось в порто-портальном направлении, имелись одиночные внутридольковые ин-

фильтраты. Центральные вены полнокровны, их эндотелий с признаками десквамации, базальная мембрана утолщена. Большинство синусоидов расширены и содержали цепочки лимфоцитов, наблюдалось увеличение клеток Купфера.

В условиях терапии ОКИ раствором наноаквахелата серебра было выявлено нормализация гистологической структуры печени (рис. 2).

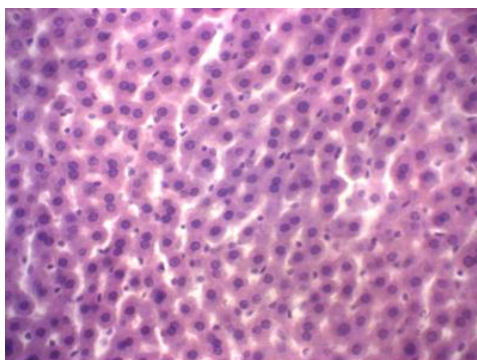


Рис. 2. Печень после лечения наноаквахелатом серебра ОКИ, вызванной УПМ. Гепатоциты без дистрофических изменений, много двуядерных гепатоцитов и клеток Купфера. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. X 360

Уменьшался отек паренхимы, однако сохранялось расширение пространств Диссе и незначительная дисконкомплексация печеночных балок. По сравнению с первой группой крыс, количество двуядерных гепатоцитов уменьшалось, отдельные гепатоциты находились в состоянии гидропической дистрофии. В части портальных трактов выявлялась умеренная воспалительная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация, иногда с распространением в перипортальные зоны, одиночные фокусы воспаления встречались внутри долек. В пораженных портальных трактах наблюдались явления деструкции и компенсаторной пролиферации желчных протоков, дистрофические изменения эндотелия сосудов. Также

наблюдались полнокровие центральных вен, мелкие кровоизлияния в паренхиме печени. Некоторые синусоиды были расширены, содержали единичные лимфоциты, нейтрофилы.

При исследовании морфометрических показателей ткани печени были получены следующие результаты (таблица 1): средняя площадь ядер гепатоцитов в условиях базисного лечения ОКИ была в 1,4 раза меньше чем у крыс при использовании наноаквахелата серебра, а средняя площадь цитоплазмы в 1,7 больше. При этом количество клеток Купфера на 73,3 % было больше, а количество гепатоцитов в балке на 76,0 % меньше в поле зрения по сравнению с показателями, полученными при исследовании печени крыс 2-й группы.

Таблица 1

Морфометрические показатели печени крыс опытной и контрольной группы

Группа	Статистич. показатель	Площадь, мкм ²		Количество	
		ядра	цитоплазмы	клеток Купфера (в поле зрения)	гепатоцитов в балке
I	X ⁻	116,37±6,65	1151,02±44,41	50,63±1,73	17,38±0,68
II	X ⁻	168,09±6,21*	679,2±23,42*	37,13±1,37*	22,88±0,64*

Примечание: * – статистически значимые достоверные различия по сравнению с показателями первой группы, P<0,001

Исследование химического состава образцов печени проходило через всю толщину при помощи СЭМ с микроанализом. Средняя длина сканирования по линии составляла 510±200 мкм. В ходе исследования

устанавливали уровни содержания в образцах Fe, Cu, Zn, Ag.

В печени животных, получавших базисную терапию (1 группа), в ходе микроанализа образцов материалов выявлены следующие уровни со-

держания в массовых долях: Fe – 0 %, Cu – 5,45 %, Zn – 2,83 %, Ag – 0 %. У животных 2-й группы: Fe – 0 %, Cu – 4,61 %, Zn – 1,95 %, Ag – 0 %.

Вопрос о физиологической роли серебра изучен недостаточно. Большинство ученых относят серебро к потенциально-токсичным и к потенциально-канцерогенным элементам [8]. Известно, что в организме серебро образует соединения с белками, может блокировать тиоловые группы ферментных систем, угнетать тканевое дыхание. При длительном контакте с серебром в производственных условиях этот элемент может накапливаться в печени [8]. Использование серебра в виде наночастиц предупреждает развитие осложнений, так как показано, что токсичность металлов в атомарном состоянии во много раз меньше, чем в ионном, полученном с применением солей [3]. С другой стороны, биоцидные свойства наночастиц меди, серебра, выражены только в отношении микроорганизмов [4].

Гистологическое исследование ткани печени крыс показало наличие морфологических изменений разной степени выраженности. Изучение морфометрических показателей печени выявило достоверное различие всех характеристик – средней площади ядра и цитоплазмы, количества клеток Купфера и гепатоцитов в печеночной балке. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в I группе животных со-

ставляло 0,1, во II группе – 0,25. Существенная разница в показателях ядра и цитоплазмы в исследуемых группах можно объяснить наличием выраженной баллонной дистрофии гепатоцитов крыс, получавших только базисную терапию. Средняя площадь ядра у животных I группы свидетельствует об угнетении синтетических процессов в клетках печени. Уменьшение количества гепатоцитов в печеночных балках в условиях базисной терапии, по видимому, обусловлено их повреждением токсинами условно патогенных бактерий и воспалительным процессом, увеличение же количества звездчатых макрофагов (клеток Купфера) является показателем напряженности фагоцитоза, что может быть связано с утилизацией продуктов распада клеточных структур и микробных организмов. Таким образом, в 1-й группе преобладали явления неспецифического гепатита умеренной активности, а во 2-й активность воспалительного процесса в исследуемом органе была незначительной или минимальной.

Полученные результаты СЕМ с микроанализом состава микроэлементов в исследуемых образцах показывают наличие меди и цинка в постоянных концентрациях. Наличие серебра и железа в исследуемых образцах печени не было выявлено. При многоточечном исследовании (n=20) микроэлементов путем СЭМ с микроанализом, результаты не отличались от тех,

которые были получены при сканировании по линии.

Выводы

1. Активность воспалительного процесса и выраженность морфологических изменений в печени при моделировании острой кишечной инфекции в группе животных, которые получали наноаквахелат серебра, снижается, что свидетельствует о позитивном эффекте исследуемого препарата по сравнению с базисной терапией.

2. По результатам сканирующей электронной микроскопии с микроанализом накопления серебра в ткани печени не происходит.

Литература

1. Бондаренко В.М. Идеи И.И. Мечникова и современная микробиология кишечника человека / В.М. Бондаренко, В.Г. Лиходед // Журн. микробиологии. – 2008. – № 5. – С. 23-29.

2. Возианова Ж.И. Диареогенные кишечные палочки / Ж.И. Возианова // Сучасні інфекції. – 2008. – № 3. – С. 4-9.

3. Использование биологически активных препаратов на основе наночастиц металлов в медицине и сельском хозяйстве / И.П. Арсентьева [и др.] // Индустрия наносистем и материалы: оценка нынешнего состояния и перспективы развития. – М.: Центр «Открытая экономика», 2006. – С. 26-33.

4. Каплуненко В.Г. Эрозионно-взрывные нанотехнологии на основе нового физического явления / В.Г. Каплуненко, Н.В. Косинов // Вісник Запорізького національного університету. – 2008. – №2. – С. 80-84.

5. Копча В.С. Корекція мікробіоценозу при лікуванні гострих кишкових інфекцій / В.С. Копча, С.А. Деркач // Інфекційні хвороби. – 2008. – № 2. – С. 31-37.

6. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.

7. Нанотехнології, наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження їх результатів у медичну практику / Л.Г. Розенфельд [та ін.] // Український медичний часопис. – 2008. – № 5 (67). – С. 63-68.

8. Скальный А.В. Биоэлементы в медицине / А.В. Скальный, И.А. Рудаков. – М.: Издат. дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.

9. Ткаченко А.В. Морфофункциональные изменения в печени крыс при экспериментальной гипокинезии / А.В. Ткаченко, Г.И. Губина-Вакулик // Буковинський медичний вісник. – 2006. – Т. 10, №2. – С. 111-114.

10. Чекман І.С. Біохімічний мінімум. Наночастинки: властивості та перспективи застосування / І.С. Чекман // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 122-129.

11. Farah A.A. Chemically stable silver nanoparticle-crosslinked polymer microspheres / A.A. Farah, R.A. Al-zarev-Puebla, H. Fenniri // Colloid Interface Science. – 2008. – Vol. 319, №2. – P. 572-576.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Половьян Екатерина Сергеевна – аспирант кафедры инфекционных болезней с эпидемиологией, курсом микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского института Сумского государственного университета.

Тел.: +380505018850.

E-mail: keetys@rambler.ru.

Москаленко Роман Андреевич – ассистент кафедры патоморфологии медицинского института Сумского государственного университета.

40007, г. Сумы, ул. Мира, 25.

Тел.: +380979802731.

E-mail: eriugen@ukr.net.

Романюк Анатолий Николаевич – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой патоморфологии медицинского института Сумского государственного университета.

40022, г. Сумы, ул. Привокзальная, 31.

Тел.: +380956006435.

E-mail: pathomorph@gmail.com.

Чемич Николай Дмитриевич – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой инфекционных болезней с эпидемиологией, курсом микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского института Сумского государственного университета.

40021, г. Сумы, ул. 20 лет Победы, 15.

Тел.: +380506310579.

E-mail: chemych@gmail.com.

Бончев Сергей Дмитриевич – аспирант кафедры нормальной анатомии медицинского института Сумского государственного университета.

40030, г. Сумы, ул. Санаторная, 31.

Тел.: +380951030027.

E-mail: Bonchev_sd@ukr.net.