

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ КУЛЬТУРНОГО НА ГІСТОМОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ГОСТРОМУ ТЕТРАХЛОРОМЕТАНОВОМУ ГЕПАТИТІ

А.Л.Загайко, С.В.Заїка, О.А.Красильнікова, Ю.Б.Лар'яновська

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: екстракт з насіння винограду культурного; гістоморфологічні показники; печінка

Під дією різноманітних патологічних чинників відбувається активація вільнорадикальних процесів. В умовах недостатньої потужності антиоксидантної системи або її ушкодження реалізуються альтеруючі ефекти вільних радикалів, що є передумовою розвитку багатьох патологічних станів. Вивчали вплив екстракту з насіння Винограду культурного на стан печінкової паренхіми тварин. Через добу після одноразового внутрішньошлункового введення тетрахлорометану у щурів з групи контрольної патології виявлені грубі порушення структури печінкової паренхіми. Лікувально-профілактичне введення екстракту з насіння Винограду культурного поліпшувало стан печінкової паренхіми тварин. У першу чергу, це стосувалося деструктивних проявів, збереження гістоархітектоніки тканини. На відміну від тварин з групи контрольної патології практично у всіх тварин даної групи некроз охоплював лише окремі групи гепатоцитів. Значні ділянки паренхіми зберігали характерний рисунок. За виразністю гепатопротекторної дії в умовах гострого тетрахлорометанового ураження печінки екстракт з насіння Винограду культурного дещо перевищує гепатопротекторний ефект силібору.

Печінка – головний орган метаболізму в організмі людини, що виконує більше 70 функцій. Згідно з сучасними уявленнями найбільш значущими метаболічними захворюваннями печінки є неалкогольний стеатоз і стеатогепатит, у патогенезі яких провідна роль належить накопиченню ліпідів у гепатоциті і посиленню процесів вільнорадикального окиснення з накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і розвитком некрозів печінкових клітин [7, 9]. Широкий спектр фармакологічних ефектів демонструють рослинні поліфеноли. Багатим джерелом рослинних поліфенолів є насіння винограду культурного. Для поліфенолів винограду характерна антиоксидантна, мембраностабілізуюча, імуномодулююча, протизапальна активність [10].

Враховуючи провідну роль, яку відіграє стан гіперліпопер-

оксидації у патогенезі захворювань печінки, а також значний вміст поліфенольних сполук у складі субстанції екстракту з насіння Винограду культурного, антиоксидантна дія яких широко відома, метою наших досліджень стало вивчення впливу екстракту з насіння Винограду культурного на стан печінкової паренхіми тварин в умовах гострого тетрахлорометанового ураження.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на безпородних самцях щурів, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Екстракт з насіння винограду вводили внутрішньошлунково в дозі 100 мг/кг (в перерахунку на 9 мг поліфенолів / 100 г маси тіла) протягом 2 тижнів 1 раз на добу [8], в якості референс-препарату використовували силібор у дозі 25 мг/кг за такою ж схемою. Гострий тетрахлорометановий

гепатит викликали одноразовим внутрішньошлунковим введенням 50% олійного розчину тетрахлорометану у дозі 10 мл/кг маси тіла тварин [4].

Зразки печінки фіксували у 10% розчині формаліну, зневоднювали у спиртах зростаючої міцності, укладали в целоїдин. Мікротомовані зрізи товщиною 3-4 мкм фарбували кислим гемалауном Майєра та еозином [5]. На зрізах печінки (окуляр 10, об'єктив 50) у 5-ти поверхнях з осягненням перивазальних, перипортальних та проміжних відділів часточки на стандартній площі окулярмікрометричної сітки підраховували (на 1000 гепатоцитів) кількість двоядерних клітин, клітин, що знаходяться у фазі синтезу ДНК, та клітин, що знаходяться у стадії мітозу, кількість дегенерованих клітин. Проводили напівкількісну оцінку інтенсивності патологічного процесу (стеатозу, деструктивних проявів, збереження гістоархітектоніки паренхіми) за 5-ти бальною системою, відпо-

Таблиця 1

Вплив екстракту з насіння Винограду культурного на гістоморфологічні показники печінки щурів в умовах гострого тетрахлорометанового гепатиту у порівнянні з силібором, n=6

Показники (на 1000 клітин)	Експериментальна група			
	інтактний контроль	контрольна патологія	екстракт з насіння винограду, 100 мг/кг	силібор, 25 мг/кг
Кількість двоядерних клітин	33,74±1,09	12,96±1,07*	31,46±4,78**	25,86±1,33 **
Кількість клітин, що знаходяться у фазі синтезу ДНК	9,37±1,86	12,98±0,92	18,93±2,88**	16,42± 0,68**
Кількість деструктивних клітин	8,67±1,44	59,23±4,55*	34,00±4,69*/**	32,85±2,94*/**
Кількість клітин у стадії мітозу	не виявлено	1,24±0,46*	1,41±0,68*	0,83±0,45*

Примітки:

- 1) * – достовірно відносно інтактного контролю;
- 2) ** – достовірно відносно контрольної патології;
- 3) n – кількість тварин у кожній групі.

відно до якої: 1 бал – слабкі зміни; 2 бали – середні зміни; 3 бали – виражені зміни та 4 бали – зміни дуже виражені [6]. Мікроскопічне вивчення мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400. Мікрофотографування зображень здійснювали за допомогою цифрового фотоапарату NikonCoolPix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 4GH за допомогою програми NikonView 5.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою методів непараметричної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента [2], критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні [3].

Результати та їх обговорення

Оглядова мікроскопія печінки щурів з групи інтактного контролю показала, що часточковий рисунок тканини носив притаманний щурам нечіткий характер. Межі часточок виявляли за тріадами (портальними трактами). Зони тріад вузькі. Ендотелій термінальних гілок воротної вени та печінкової артерії, інших кровоносних судин, а також епітелій жовчних протоків незмінні. Радіаль-

на спрямованість тяжів гепатоцитів не порушена. Гепатоцити за формою та розміром відповідають нормі. Спостерігалася виразна ізоморфність клітин. Ядра клітин овальні, розташовані у центрі клітини, загалом нормохромні, помірно варіабельні за розмірами і містять по одному ядерцю. Виявлена невелика кількість клітин, ядра яких знаходяться у фазі синтезу ДНК. Ядро значно збільшене, конденсований хроматин розподілений дифузно по всьому ядру, ядерце не виявлялося, що свідчить про нормальний стан органу [1]. Цитоплазма не місти-

ла включень, які виявляються на світлооптичному рівні, і була рівномірно забарвлена. Перинуклеарно виявляється певне посилення базofilії. Наявність двоядерних клітин була у межах норми, клітин із регресивними змінами ядра та цитоплазми небагато, клітин, що знаходяться у стадії мітозу, не виявлено. Внутрішньочасточкові синусоїдальні капіляри помірно розширені, практично вільні від еритроцитів; ендотеліальна вистилка синусоїдів, зірчасті ретикулоендотеліоцити знаходяться у стані спокою (рис. 1, табл. 1).

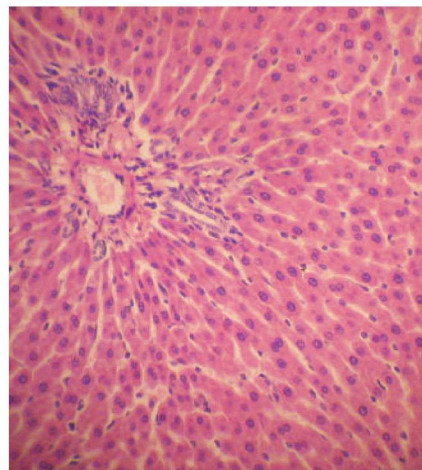


Рис. 1. Печінка інтактного щура. Перипортальна зона часточки. Гематоксилін та еозин. х 250

**Напівкількісна оцінка структурних порушень у печінці щурів
різних експериментальних груп, n=6**

Група тварин	Показники, бали		
	виразність жирової дистрофії	інтенсивність деструкції в перипортальних та центролобулярних зонах часточок	збереження гістоархітекtonіки паренхіми
Інтактний контроль	0	0	4
Контрольна патологія	3,4* (2-4)	2,8* (1-4)	1,6* (1-2)
Екстракт з насіння винограду, 100 мг/кг	2,5* (2-3)	1,5*/** (1-2)	2,75*/** (2-3)
Силібор, 25 мг/кг	2,6*/** (2-3)	1,2*/** (1-2)	2,4*/** (2-3)

Примітки:

- 1) * – достовірно відносно інтактного контролю;
- 2) ** – достовірно відносно контрольної патології;
- 3) n – кількість тварин у кожній групі.

Через добу після одноразового внутрішньошлункового введення тетрахлорометану у щурів з групи контрольної патології виявлені грубі порушення структури печінкової паренхіми. Переважно уражені перипортальні структури з наявністю ядерно-цитоплазматичного детриту. Виявлений великокрапельний стеатоз, який переходить у жирову дегенерацію клітин. Деструктивні ділянки паренхіми помірно інфільтровані полінуклеарними лейкоцитами та круглоклітинними елементами (рис. 2). Сумарна кількість балів, що характери-

зують рівень деструктивних процесів у печінці щурів цієї групи, становила 6,2. Зони часточок, що зберегли оригінальну гістоархітекtonіку паренхіми, зменшилися на 60% (табл. 2). Дифузно по часточках зросла кількість клітин з регресивними змінами ядра та цитоплазми – у 6,83 рази відносно інтактного контролю. Компенсаторні регенераційні процеси у тканині виражені слабо. На тлі виразного (достовірного) зниження кількості двоядерних клітин виявлено тенденцію до збільшення кількості клітин, що знаходяться у фазі синтезу ДНК, та

появи гепатоцитів, які знаходяться у стадії мітозу (табл. 1).

В зонах деструкції нерідкі діapedезні крововиливи, плазмодіapedез. На відносно збережених ділянках печінкових часточок гепатоцити набухлі, межі клітин розмиті, радіальна спрямованість тяжів гепатоцитів не завжди чітка. У цитоплазмі виявляються дрібні та середні вакуолі, зникає ізоморфність клітин. Частина клітин містить лізовані або пікноморфні ядра. Виявлено деяке збільшення кількості гепатоцитів, що знаходяться у фазі синтезу ДНК, та помітне зниження кількості двоядерних клітин. З'явилися поодинокі гепатоцити, які знаходяться у стадії мітозу. Зірчасті ретикулоендотеліоцити гіпертрофовані. Бальна оцінка виявлених структурних порушень та кількісні гістоморфологічні характеристики печінки щурів різних експериментальних груп наведені у табл. 1 та 2.

Лікувально-профілактичне введення екстракту з насіння винограду культурного поліпшувало стан печінкової паренхіми тварин. У першу чергу, це стосувалося деструктивних проявів, збереження гістоархітекtonіки тканини. На відміну від

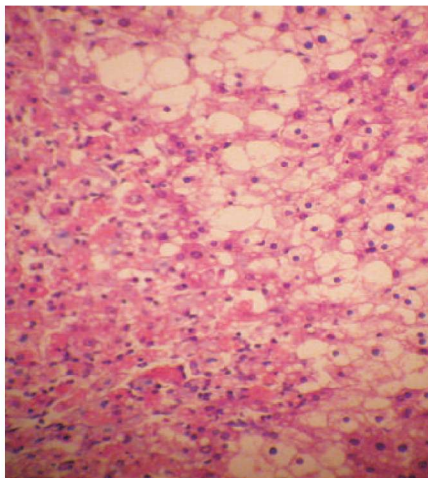


Рис. 2. Печінка щура після введення тетрахлорометану. Виразна деструкція паренхіми перипортальної зони часточки, великокрапельний стеатоз. Гематоксилін та еозин. x 250

тварин з групи контрольної патології практично у всіх тварин даної групи некроз охоплював лише окремі групи гепатоцитів. Значні ділянки паренхіми зберігали характерний рисунок.

Введення екстракту з насіння Винограду культурного в дозі 100 мг/кг призводило до виразного зниження деструктивних проявів у тканині печінки щурів. Кількісний рівень клітин з регресивними змінами був достовірно меншим за такий у тварин з групи контрольної патології у 1,74 рази, хоча й перевищував цей показник у інтактних тварин у 3,9 рази (табл. 1). В меншому ступені впливав екстракт з насіння Винограду культурного на інтенсивність жирової дистрофії гепатоцитів, зменшуючи її рівень на 26,47%. Сумарна кількість балів, що характеризують рівень деструкції печінкової паренхіми, у тварин, які на тлі гострого тетрахлорометанового гепатиту отримували екстракт з насіння Винограду культурного, складала 4 бали, що у 1,55 рази нижче за такий у тварин з групи контрольної патології.

Ділянки часточок зі збереженою паренхімою збільшилися на 71,87% порівняно із контрольною патологією (табл. 2). Під впливом екстракту з насіння Винограду культурного інтенсифікувалися процеси внутрішньоклітинної регенерації – достовірно збільшилася кількість двоядерних клітин (у 2,42 рази) і клітин, що знаходяться у фазі синтезу ДНК порівняно з контрольною патологією – на 45,83% (табл. 1).

У меншому ступені екстракт з насіння Винограду культурного впливав на виразність жирової дистрофії. Характерні зони її локалізації були зменшені порівняно з контрольною патологією або жирова дистрофія носила дифузний характер. Самі клітини, хоча й були дещо набухлими, але мали чіткі межі і були достатньо ізоморфними,

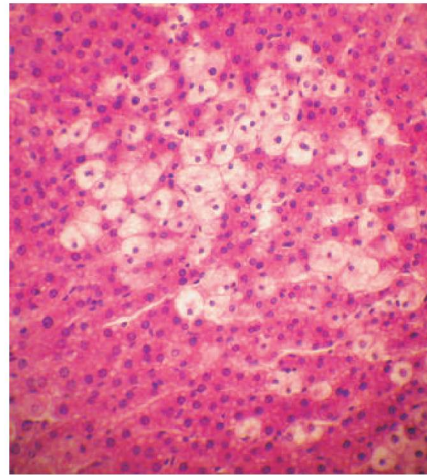


Рис. 3. Печінка щура, якому на тлі гострого тетрахлорометанового гепатиту вводили екстракт з насіння Винограду культурного в дозі 100 мг/кг. Значне відновлення гістоархітекtonіки паренхіми перипортальної зони часточки. Великокрапельна вогнищева дистрофія гепатоцитів. Гематоксилін та еозин. x 250

а вакуолі здебільшого були дрібними та середніми за розмірами і не порушували цілісності клітин (рис. 3).

Помітним було зниження кількості клітин із регресивними змінами ядра та цитоплазми, більше виявлено клітин, що знаходяться у фазі синтезу ДНК. Дещо більше було двоядерних гепатоцитів, з'явилися дрібні клітини з базофільною цитоплазмою. Кількість клітин, що знаходяться у стадії мітозу, значно не збільшилась (табл. 1, 2).

Аналогічне за схемою введення силібору також чинило позитивний вплив на морфо-

логічні показники стану печінки щурів. У більшості тварин помітно зменшені зони деструкції перипортально та центрлобулярно, збільшені ділянки часточок, які зберегли оригінальну гістоархітекtonіку тканини, багато гепатоцитів були морфологічно повноцінними. Однак жирова дистрофія була ще достатньо виразною. Зберігалися мікрокісти (рис. 4). Референс-препарат силібор у дозі 25 мг/кг чинив співставлюваний з ефектом екстракту з насіння Винограду культурного вплив на морфоструктуру печінки тварин з експериментальним тетрахло-

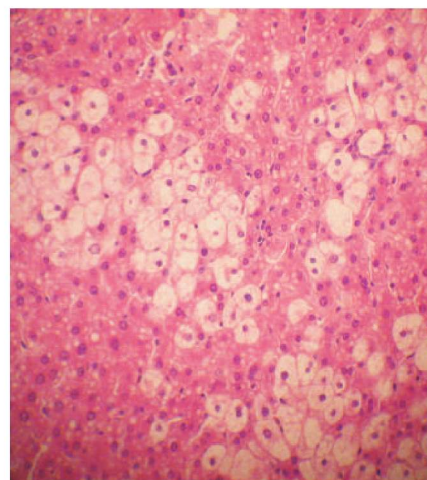


Рис. 4. Печінка щура, якому на тлі гострого тетрахлорометанового гепатиту вводили силібор у дозі 25 мг/кг. Деструкція паренхіми перипортальної зони часточки менш виразна, в значній мірі збережений великокрапельний стеатоз. Гематоксилін та еозин. x 250

рометановим гепатитом. Сумарна кількість балів, що відображають інтенсивність деструктивно-дистрофічних порушень у печінці щурів цієї групи, зменшилася в 1,63 рази, зони часточок зі збереженою гістоархітектонікою збільшилися на 50,0% порівняно з контрольною патологією (табл. 2). Кількість клітин з регресивними змінами ядра та цитоплазми була зменшена практично до рівня тварин, яким вводили екстракт з насіння Винограду культурного, у 1,8 рази. Зросли показники

регенераторних процесів, зокрема в 1,99 рази збільшилася кількість двоядерних клітин, на 26,5% стало більше клітин, що знаходяться у фазі синтезу ДНК (табл. 1). Виявлено певне збільшення кількості двоядерних клітин як дистанційно, так і в безпосередній близькості від уражених ділянок, а також клітин, що знаходяться у фазі синтезу ДНК (табл. 1, 2).

Таким чином, на підставі даних гістоморфологічного дослідження зразків печінки можна зробити висновок, що ек-

тракт з насіння Винограду культурного в дозі 100 мг/кг на моделі гострого токсичного ураження печінки у щурів, спричиненого тетрахлорометаном, чинив гепатопротекторну дію, виявляючи антинекротичний, антидистрофічний та репаративний ефекти. За виразністю гепатопротекторної дії в умовах гострого тетрахлорометанового ураження печінки екстракт з насіння Винограду культурного в дозі 100 мг/кг де-що перевищує гепатопротекторний ефект силібору.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Гепатоцит, функционально-метаболические свойства / Под ред. Л.Д.Лукьяновой. – М.: Наука, 1985. – 296 с.*
2. *Глянц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.*
3. *Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1973. – С. 21-33.*
4. *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.*
5. *Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.*
6. *Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 176 с.*
7. *Яковенко Э.П., Григорьев П.Я. // Рос. мед. журн. – 2003. – №5 (11). – С. 291-296.*
8. *Middleton E.Jr. // Adv. Exp. Med. Biol. – 1998. – Vol. 439. – P. 175-182.*
9. *Moseley R.H., Moseley R.H. // Curr. Opin. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 19. – P. 181-184.*
10. *Wu C.D. // J. Nutr. – 2009. – Vol. 139, №9. – P. 1818S-1823S.*

Адреса для листування: 61020, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 706-30-99.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.03.2012 р.