

Использование гидробионтов для моделирования патологии паренхиматозных органов

Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹, Г.Д. Капанадзе¹,
О.В. Баранова¹, О.И. Степанова¹

¹ - ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² - ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, scbmt@yandex.ru

Показана возможность использования пойкилотермных гидробионтов для проведения модельных экспериментов. Проведено успешное моделирование патологии печени и поджелудочной железы у карпов, гепатопанкреаса речных раков.

Ключевые слова: рыбы, речные раки, моделирование патологии, паренхиматозные органы, печень, поджелудочная железа, гепатопанкреас.

При исследованиях в области медицины нередко возникает необходимость вызывать патологию для нахождения оптимальных способов лечения различных болезней, углубленного изучения функций органов и систем [5, 1].

Для этого используется комплексное моделирование доклинических и клинических испытаний, в т.ч. лекарственных препаратов, выполненных на классических и альтернативных биологических объектах, и экстраполяция на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных.

В качестве альтернативных биомodelей целесообразно использовать пойкилотермных гидробионтов по ряду причин:

- по этическим соображениям, т.к. эти организмы находятся на более низкой ступени эволюционного древа;

- они являются более доступными объектами исследования;
- у них легче вызвать патологию, т.к. данные организмы являются обитателями водной среды и полностью зависят от температуры окружающей среды;
- холоднокровные гидробионты имеют специфические особенности, изучение которых позволит выявить фундаментальные физиологические механизмы, в т.ч. в эволюционном аспекте.

За последние десятилетия использование рыб как животных для исследований значительно увеличилось [22, 13, 10, 15, 21]. Относительно восприятия болевых импульсов у рыб ведутся дебаты, однако большинство авторов склонны считать, что у рыб понижен болевой порог чувствительности [19, 11, 23].

Рыбы представляют самый старый и самый разнообразный класс позвоночных животных, включая приблизительно 48% известных существующих разновидностей подтипа *Vertebrata* (Позвоночные). Их эволюционное положение относительно тех или других позвоночных животных, вместе с их высокими адаптивными мощностями, делает их ценными объектами для исследования в различных отраслях биологии. Как следствие, рыбы используются в качестве экспериментальных моделей в исследованиях биомедицины, рака, биологии, связанной с развитием, экологии, экологической токсикологии, эндокринологии, геронтологии, генетики, молекулярного развития, нейробиологии и фармакологии [20, 8].

Перспективным направлением биомоделирования является использование беспозвоночных животных, которые

химатозных органов (поджелудочной железы и печени) у рыб и гепатопанкреаса речных раков.

Материалы и методы

Экспериментальные объекты исследовались методом моделирования.

В качестве объекта нами выбраны двухлетки карпа (*Cyprinus carpio* L.), выращенные в аквариальных условиях с фазы сеголеток. Рыбы содержались в аквариальных условиях при температуре +14-16 °С. А также исследовались длиннопалые речные раки (*Pontastacus leptodactylus*).

Патология поджелудочной железы и печени рыб вызывалась однократным внутрибрюшинным введением аллоксана в дозе 200 мг/кг.

Патология печени рыб моделировалась парацетамолом. Препарат вводился *per os* по следующей схеме, представленной в табл. 1.

Таблица 1

Схема введения препаратов молоди карпа

Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
	<i>per os</i> через день 7 раз		
Контроль без введения препаратов	Парацетамол 15 г/кг + 1 мл 50% спирта	1 мл 50% спирта	Парацетамол 15 г/кг + 1 мл дистиллированной воды

обладают сопоставимостью физиологической реакции с высшими животными, а также специфическими свойствами, позволяющими расширить представления о спектре действия тестируемого фактора на биосистему. Они удовлетворяют современным этическим представлениям и нормам, ограничивающим область применения высших животных в экспериментальных исследованиях.

Целью настоящих исследований являлось моделирование патологии парен-

химатозных органов (поджелудочной железы и печени) у рыб и гепатопанкреаса речных раков вызывалась ведением аллоксана в дозе 100 мг/кг в вентральный синус однократно.

Кровь для анализа отбиралась из хвостовой вены рыб прижизненно. Гемолимфу речных раков получали *in vivo* путем пункции вентрального синуса.

Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) проводился в окрашенных по Паппенгейму мазках

периферической крови, осуществлялся микроскопически на цифровом микроскопе Optika DM 15.

Биохимические анализы (глюкоза) проводились на глюкометре Ассu-Chek Active.

Внутренние органы фиксировались в 10% растворе формалина. Затем, после обезвоживания и заливки в парафин готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином. Гистологические исследования проводились с помощью цифровой микроскопии.

Обработка полученных результатов проводилась методом вариационной статистики по Стъуденту с использованием программы Excel пакета Microsoft Office. Достоверными считались различия показателей при $p < 0,05$.

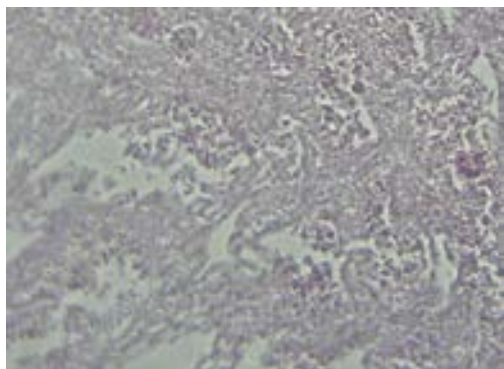
Результаты и их обсуждение

На всем протяжении эксперимента (53 дня) гибели исследуемых сеголетков карпа (с введенным аллоксаном) не наблюдалось.

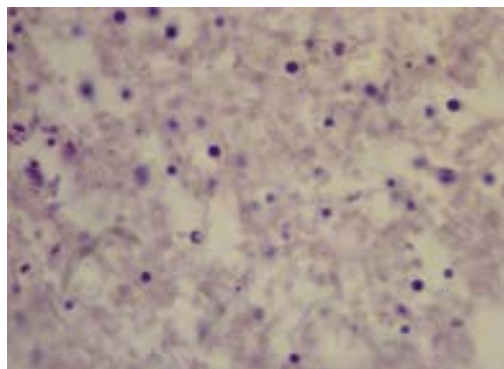
Гистологические исследования показали разрушение структуры островков Лангерганса (рис. 1А).

При воздействии аллоксана были обнаружены патологические изменения в гистоструктуре печени карпа. Гистология показала полное нарушение архитектоники органа. Жировые капли замещают собой клетки печеночной паренхимы. Пустоты на месте экстрагированного жира во всех направлениях пронизывают ткань, создавая в ней многочисленные разрывы. Количество ядер гепатоцитов существенно меньше по сравнению с нормой (рис. 1Б).

Результаты исследований речных раков показали, что через 3 дня после введения аллоксана содержание глюкозы в гемолимфе было невелико, что характерно для здоровых особей. Затем, к 7-му дню, наступает повышение уровня глюкозы в гемолимфе и остается таким до конца эксперимента. На 3-й и 23-й дни после введения 100 мг/кг аллоксана наблюдалась гибель двух речных раков.



А. Поджелудочная железа.
Увеличение x 100.



Б. Печень.
Увеличение x 640.

Рис. 1. Гистологическая картина внутренних органов карпа при воздействии аллоксана

Патологоанатомические изменения гепатопанкреаса: увеличение органа, дряблая консистенция, серо-зеленоватый цвет (рис. 2). У здорового речного рака гепатопанкреас имеет плотную консистенцию и красновато-коричневый цвет.

Патологоанатомические изменения гепатопанкреаса: увеличение органа, дряблая консистенция, серо-зеленоватый цвет (рис. 2). У здорового речного рака гепатопанкреас имеет плотную консистенцию и красновато-коричневый цвет.

Гистологические исследования показали, что в ткани гепатопанкреаса происходит вакуолизация цитоплазмы R-клеток после введения аллоксана (рис. 3).



Рис. 2. Вскрытие погибшего речного рака *Pontastacus leptodactylus* L.

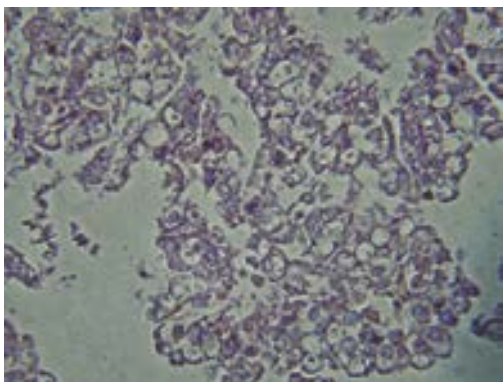


Рис.3. Гистологическая картина гепатопанкреаса длиннопалого речного рака *Pontastacus leptodactylus* L. Вакуолизация цитоплазмы R-клеток. Увеличение x 400.

Результаты исследований с парацетамолом показали, что через 1 мес. эксперимента (через 2 недели после окончания медикаментозного курса) в опытных группах рыб (2 и 4) отмечается снижение индекса печени (рис. 4), т.к. в органе происходит детоксикация препарата.

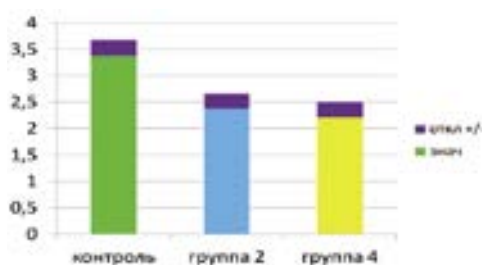


Рис.4. Индексы печени рыб через 1 мес. эксперимента.

У этих рыб наблюдалась дряблость печени и некротизированные участки в ней. А также отложения и инкапсуляция парацетамола диаметром 2-5 мм в печени (рис. 5), а у рыб 2-й группы – и в почках. Почки рыб 4-й группы дряблой консистенции.



Рис. 5. Включение парацетамола в печени экспериментального карпа.

В группе 3 изменения менее значительны, органы без очагов некроза. Печень дряблая с зелеными включениями.

В группе 4 и, в меньшей степени, в группе 2 у рыб отмечено увеличение желчного пузыря и скопление в нем желчи. Соответственно, индекс желчного пузыря с содержимым в этих группах был высоким (табл. 2).

Таблица 2
Индексы желчного пузыря
экспериментальных карпов, %

Контроль	Группа 2	Группа 4
0,28±0,02	0,59±0,09*	0,45±0,07*

Примечание: * различия достоверны по сравнению с контролем.

Отмечались нарушения морфологии клеток периферической крови у опытных рыб (рис. 6).

Уровень лейкопоза, судя по относительному количеству бластных форм лейкоцитов (миелобластов, промиелоцитов), наименее интенсивен в группе 2 (табл. 3). Вероятно, введение парацетамола со спиртом затормозило данный процесс. В лейкограмме экспериментальных карпов велика доля эозинофилов. Вероятно, причина – в активации системы комплемента при детоксикации. В группе рыб 3, получавших 50% спирт без парацетамола, снижена доля зрелых сегментоядерных нейтрофилов. В литературе имеются сведения об активации апоптоза и, следовательно, разрушения нейтрофилов у людей при злоупотреблении алкоголя [3].

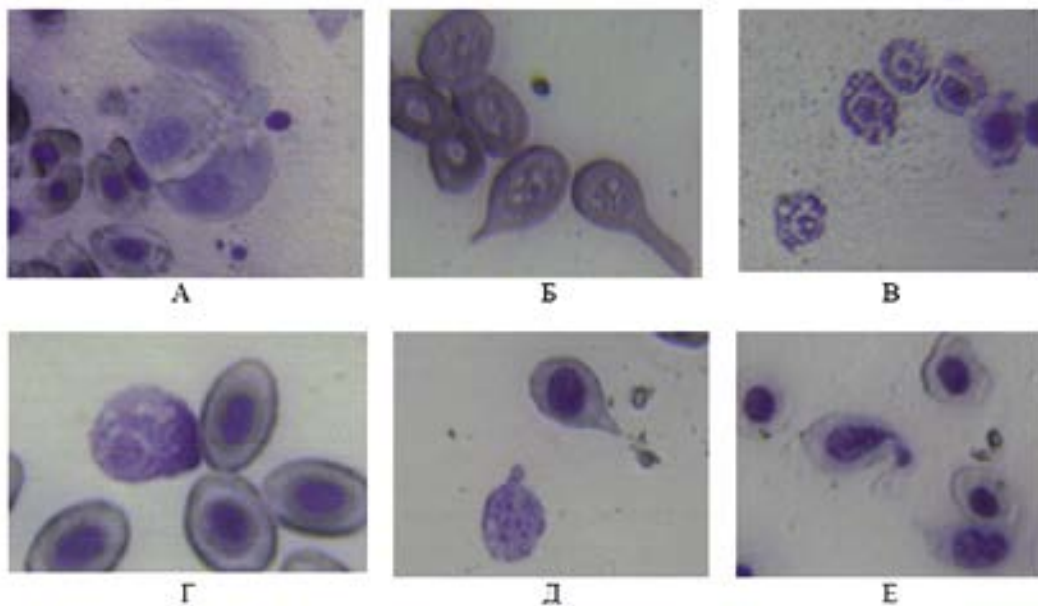


Рис. 6. Клетки периферической крови. Увеличение $\times 600$. А, Б, В – клетки крови карпов 4 группы (А – гемоцитобласты, разрушение и деформация эритроцитов; Б – эритроциты с псевдоподиями, в ядрах глыбки хроматина; В – вакуолизация и эозинофилия цитоплазмы эритроцитов). Г, Д, Е – клетки крови рыб 2 группы (Г – эозинофил, начало лизиса цитоплазмы; Д – клетки крови с псевдоподиями: эритроцит, базофил меньших размеров; Е – гемоцитобласт и моноцит с псевдоподиями).

Лейкограмма молоди карпа

Показатели	Группы рыб			
	1	2	3	4
Миелобласты	-	-	0,3±0,3	0,3±0,2
Промиелоциты	0,4±0,2	-	0,3±0,3	0,1±0,1
Миелоциты	0,4±0,2	0,2±0,2	0,5±0,3	0,9±0,5
Метамиелоциты	1,2±0,4	0,8±0,5	0,8±0,5	0,9±0,3
Палочкоядерные нейтрофилы	1,3±0,4	0,6±0,4	1,8±0,9	2,4±1,2
Сегментоядерные	2,0±0,3	1,4±0,6	0,7±0,4*	2,9±0,7
Всего нейтрофилов	3,3±0,6	2,0±0,7	2,5±0,9	5,3±1,7
Эозинофилы	0,3±0,1	1,0±0,2*	0,3±0,3	1,0±0,3*
Базофилы	0,2±0,1	0,2±0,2	0,5±0,3	0,7±0,2
Моноциты	2,5±0,5	2,0±0,3	1,8±0,9	3,7±0,8
Лимфоциты	92,3±1,2	93,6±0,9	93,3±1,7	87,1±1,9

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с 1-й группой (контролем).

Выводы

Таким образом, введение аллоксана вызывает патологические изменения поджелудочной железы и печени рыб. В поджелудочной исследуемых гидробионтов наблюдается нарушение структуры островков Лангерганса. Ткань печени карпа и окуня характеризуются накоплением жировых включений в гепатоцитах, пикнозом их ядер, деструкцией самих гепатоцитов, выселением массы фагоцитов в паренхиму органа, интенсивной инфильтрацией форменными элементами крови и нарушением архитектоники органа. В печени карпа встречаются участки, обнаруживающие практически полную дегенерацию большей части клеток.

При введении аллоксана в дозе 100 мг/кг отмечается патология гепатопанкреаса длиннопалых речных раков. Это обнаружено по динамике уровня глюкозы в крови, а также по результатам гистологических исследований.

Введение парацетамола per os в дозе 15 г/кг семикратно в течение 14 дней у молоди карпа вызывает нарушения как на органном, так и на клеточном уровне. Действие препарата усиливается смешиванием с 50% спиртом.

Список литературы

1. *Адо А.Д.* (Ред.) Патологическая физиология. - М.: Триада-Х. 2000. 574 с.
2. *Артюков А.А., Мензорова Н.И., Козловская Э.П., Кофанова Н.Н., Козловский А.А., Рассказов В.А.* Ферментный препарат из гепатопанкреаса промышленных видов крабов и способ его получения. Патент № 2280076, заявка № 2004135771 от 20.07.2006 г.
3. *Жернова Е.В., Вялова Н.М., Иванова С.А., Бохан Н.А.* Показатели запрограммированной гибели лимфоцитов и нейтрофилов у лиц с алкогольной интоксикацией в

- динамике терапии препаратом с антиоксидантными свойствами // Вестник Томского государственного педагогического университета. - Томск. 2009. Вып. 3 (81). С. 59-61.
4. **Корягина Н.Ю., Пронина Г.И., Ревякин А.О.** Сравнительная характеристика альтернативных биомоделей по гематологическим и биохимическим показателям // Биомедицина. 2010. № 2. С. 68-70.
 5. **Крыжановский Г.Н.** Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // Вест. Рос. АМН. 1997. № 5. С. 60-62.
 6. **Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л.** Молекулярная биология. - М.: «МИА». 2003.
 7. **Тамкявичене Е.А.** Некоторые количественные закономерности питания широкопалого рака. Литв.: Сб. научн. тр. // Ин-т Зоол. и Паразитол. АН ЛитССР. 1979. С. 67-76.
 8. **Bolis C., Piccolella M., Dalla Valle A.Z., Rankin J.C.** Fish as model in pharmacological and biological research. Pharmacological Research. 2001. 44. P. 265-280.
 9. **Bormann I.** In Bolk: Hand der vergleichenden Anatomie der Wirbeltier 3. 1937.
 10. **Borski R.J., Hodson R.G.** Fish research and the Institutional Animal Care and Use Committee // Institute for Laboratory Animal Research Journal 44. 2003. P. 286-294.
 11. **Cameron A.A., Plenderleith M.R., Snow P.J.** Organization of the spinal cord in four species of elasmobranch fish: Cytoarchitecture and distribution of serotonin and selected neuropeptides // Journal of Comparative Neurology 297. 1990. P. 210-218.
 12. **Elsner M., Tiedge M., Guldbakke B., et al.** Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan // Diabetologia. 2002. Vol. 45. № 11. P. 1542-49.
 13. **Evans D.H., Claiborne J.B.** The Physiology of Fishes. 3th edn. 2005. 616 p.
 14. **Harrison F.W., Humes A.G.** Microscopic anatomy of invertebrates. Decapoda Crustacea. - New York: Willey-Liss Inc. 1992. Vol. 10. 459 p.
 15. **Johansen R., Needham J.R., Colquhoun D.J., Poppe T.T., Smith A.J.** Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. Laboratory Animals 40. 2006. P. 323-340.
 16. **Kroncke K.D., Fehsel K., Sommer A., et al.** Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitrosourea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1995. Vol. 376. № 3. P. 179-185.
 17. **Laguesse E.** Structure du pancreas intrahepatique chez les poissons // C.R. Acad., 112. 1891. 440 p.
 18. **Lazarow A., Cooperstein J.** Studies on the isolated islet tissue of fish // Biol. Bull. 1951. Vol. 100. No 3. P. 191-198.
 19. **Leonard R.B.** Primary afferent receptive field properties and neurotransmitter candidates in a vertebrate lacking unmyelinated fibres // Progress in Clinical Biological Resources 176. 1985. P. 135-145.
 20. **Ostrander G.** The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals), 678 pp. Waltham, MA, USA: Academic Press Inc. 2000.

21. **Posner L.P.** Pain and distress in fish: A review of the evidence // Institute for Laboratory Animal Research Journal 50. 2009. P. 327-328.
22. **Powers D.A.** Fish as model systems. Science. New York. 246. 1989. P. 352-358.
23. **Snow P.J., Plenderlaith M.B., Wright. L.L.** Quantitative study of primary sensory neurone populations of three species of elasmobranch fish // Journal of Comparative Neurology. 334. 1993.
24. **Szkudelski T.** The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas // Physiol. Res. 2001. Vol. 50. № 6. P. 536-546.

Use of hydrobionts for modelling pathology of parenchymatous bodies

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, O.B. Baranova, O.I. Stepanova

Possibility of use the poycilothermes hydrobionts for carrying out model experiments is shown. Successful modeling of pathology of a liver and pancreas at carps, hepatopancreas crawfishes is carried out.

Key words: fishes, crawfishes, pathology modeling, parenchymatous bodies, liver, pancreas, hepatopancreas.