

УДК 591.441:547.533  
© Волошин В.М., 2011

## ВПЛИВ ТОЛУОЛУ НА ГІСТОМОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ СЕЛЕЗІНКИ СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ

Волошин В.М.

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

На сучасному етапі розвитку науки досягнуто суттєвих успіхів у морфологічних дослідженнях органів імунної системи [3, 4, 12]. Їх структурно-функціональна організація в нормі як у людини, так і в експериментальних дослідженнях на деяких тваринах, досить гарно вивчена. Відомо, що селезінка, найбільший серед вторинних лімфоїдних органів, є у всіх хребетних. Найбільш примітивною вона представлена у циклостом, де тканина селезінки входить до складу стінки кишки. У вищих хребетних паренхіма цього органу представлена двома компартментами – червоною (ЧП) та білою пульпою (БП), які відрізняються за кольором на зрізі органу та на гістологічних препаратах при дослідженні останніх на малому збільшенні. Біла пульпа селезінки представляє високоорганізовану акумуляцію Т- та В-лімфоцитів, що оточують центральні артерії, у той час як червона пульпа складається з венозних синусів (наявні не в усіх видах) та селезінкових тяжів.

Толуол або толуен (ісп. *Tolu*, толуанський бальзам),  $C_7H_8$  — гомолог бензолу. Його отримують з продуктів сухої перегонки кам'яного вугілля і в процесі дегідроцеклізації гептану. Це – рідина без кольору з характерним запахом. Вперше толуол був отриманий П. Пельт'є в 1835 році при перегонці соснової смоли. В 1838 році А. Девіль виділив толуол з бальзаму, що був привезений з колумбійського міста Толу, на честь якого і отримав свою назву. Аналіз літератури за останнє десятиріччя стосовно впливу толуолу на організм свідчить про те, що робіт, які були б присвячені обраній нами проблемі, немає. Переважна більшість робіт стосується впливу толуолу зокрема на перебіг запального процесу [9], зниження слуху [14], експресії деяких факторів [8, 13] та ін. Роботи кінця минулого століття доводять відсутність тератогенного ефекту, але зниження маси плодів мишей при інгаляціях толуолу, відсутність ефектів цього агента на будову деяких органів щурів, морських свинок, собак та приматів. Існують повідомлення про зростання маси надниркових залоз та рівня гідрокортикоїдів в плазмі крові. Незначні зміни гіпопластичного характеру у кістковому мозку мишей відмітили Horiguchi and Inoue, 1977 при інгаляційному впливі толуолу. Таким чином, з'ясування особливостей морфогенезу зокрема селезінки, як одного з вторинних лімфоїдних органів, за умов впливу ксенобіотиків є актуальною проблемою, якою цікавляться як науковці, так і практичні лікарі.

**Метою** презентованого дослідження стало вивчення в динаміці морфогенезу селезінки після інгаляційного впливу на організм толуолу. Презентована робота виконана у відповідності з планом наукових досліджень ДЗ «Луганський державний медичний університет» та є частиною наукової теми кафедри анатомії людини «Морфогенез органів ендокринної, імунної та кісткової систем під хронічним впливом летучих компонентів епоксидних смол» (номер державної реєстрації – 0109U004615).

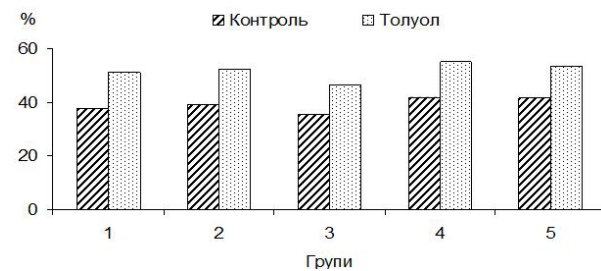
**Матеріал і методи дослідження.** Робота виконана на 60 білих статевонезрілих щурах-самцях з початковою масою тіла 40-50 г. Тварин отримували з віварію ДЗ «Луганський державний медичний університет». Дослідження проводилося у відповідності до етичних норм та рекомендацій щодо гуманізації роботи з лабораторними тваринами, які відображені у «Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1985). Тварини були розділені на контрольну (К) та експериментальну (І) серії (по 30 тварин в кожній). Контрольні тварини знаходилися в стандартних умовах віварію. Щури І серії зазнавали впливу толуолу у концентрації  $500 \text{ мг/м}^3$  протягом 60 днів (5 годин/добу, 5 днів/тиждень). Такі умови створювалися за допомогою спеціальної установки, яка складається з (1) затравочної камери, (2) камери, у якій створювалася необхідна концентрація діючої речовини, (3) датчика толуолу та (4) допоміжного оснащення. Після закінчення вказаного терміну тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом через 1, 7, 15, 30 та 60 днів (1, 2, 3, 4 та 5 групи відповідно), дотримуючись «Методичних рекомендацій з виведення лабораторних тварин з експерименту». Забір, фіксацію селезінки та виготовлення парафінових блоків з розміщенням в них шматочками органу виконували у відповідності до загальноприйнятих методик. Виготовляли поперечні зрізи селезінки в ділянці воріт органу товщиною 3-4 мкм. Для вивчення структурних компонентів селезінки гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Деталі гістологічної будови органу вивчали за допомогою цитоморфологічного комплексу на базі мікроскопа Olympus BX 41. Площі різних структурних компонентів селезінки визначали за допомогою програми «Master of Morphology» [5], а кількісні показники обробляли з застосуванням методів варіаційної статистики за допомогою програми

«Statistica 6.0». Достовірною вважали статистичну похибку менше 5% ( $p < 0,05$ ). Критичним вважали t-критерій Ст'юдента – 2,23.

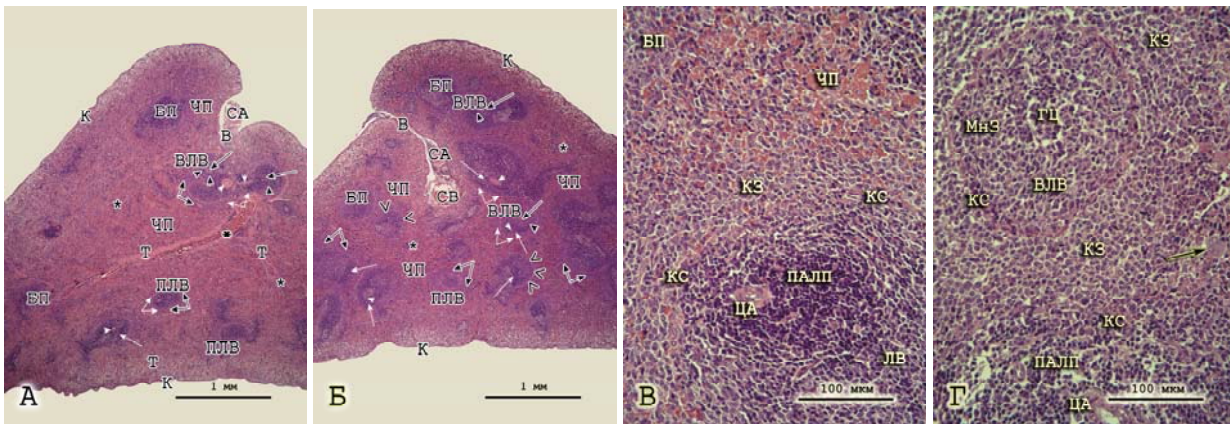
**Результати дослідження.** На гістологічних препаратах селезінки щурів, які зазнавали впливу толуолу, подібно до таких у щурів контрольної серії чітко візуалізується розподіл органу на його компартменти – білу пульпу, червону пульпу та структури, що складаються зі сполучнотканинних елементів – капсулу та трабекули. Лімфоїдні структури БП забарвлюються гематоксиліном у синій колір, тому виглядають на препаратах більш темними, ніж елементи ЧП. Кількість ПЛВ та ВЛВ в органі незалежно від того, до якої серії відносилася тварина, була практично однаковою. Лімфатичні вузлики БП розташовані переважно у місцях біфуркації ЦА, які безпосередньо оточені ПАЛП, серед клітинного компоненту якої знаходяться концентрично розташовані шари ретикулярних волокон та сплюснених ретикулярних клітин. Остання складається з внутрішнього (більш темного за рахунок наявності тут переважно малих лімфоцитів) та зовнішнього (складається з малих, середніх Т-лімфоцитів та В-лімфоцитів) шарів. При цьому в ділянці воріт селезінки, на рівні яких проводилися поперечні зрізи добре видно селезінкові артерію та вену. На гістологічних препаратах органу щурів, які зазнавали впливу толуолу чітко видно, що частка БП зростає у порівнянні з контролем (рис. 1).

Гістоморфометричне дослідження білої пульпи селезінки щурів всіх експериментальних груп без виключення показало статистично вірогідне підвищення її відносної щільнос-

ті. Так, у тварин 1 групи, які зазнавали впливу толуолу, частка білої пульпи перевищувала значення контрольної серії на 36,20% ( $p = 0,002$ ). В 3 та 4 групах піддослідних тварин ця різниця становила 30,57% ( $p < 0,001$ ) та 31,69% ( $p = 0,003$ ) відповідно. Площа червоної пульпи, таким чином, була меншою за показники відповідних груп тварин контрольної серії. Це привело до збільшення індексу БП/ЧП. Так, якщо в контрольній серії він коливався в межах від 0,61 (3 група) до 0,81 (5 група), то його значення у щурів I серії коливалися між 1,00 (3 група) до 1,46 (4 група). Частка сполучної тканини на гістологічних зрізах селезінки статистично вірогідно не відрізнялася від показників контрольної серії. Так, в 1 та 2 групах тварин зазначений показник виявився на рівні 6,16% та 6,56%, що нижче за показники відповідних груп контрольної серії на 5,08% ( $p = 0,228$ ) та 7,87% ( $p = 0,185$ ). В 3 та 4 групах щурів, які зазнавали впливу толуолу, цей показник вже перевищував контрольні значення на 4,23% ( $p = 0,404$ ) і 3,20% ( $p = 0,201$ ) відповідно (рис. 2).



**Рис. 1.** Показники відносної площі білої пульпи селезінки щурів.



**Рис. 2.** А і В – селезінка щура 1 групи контрольної серії; Б і Г - селезінка щура 1 групи, який зазнавав впливу толуолу. БП – біла пульпа, ЧП – червона пульпа, ПАЛП і довга біла стрілка – периартеріальна лімфатична півха, ПЛВ і ВЛВ – первинні та вторинні лімфатичні вузлики, ЛВ – лімфатичний вузлик, В – ворота, К – капсула, КС і > – крайовий синус, ГЦ і довга чорна стрілка – гермінативний центр, МнЗ і коротка чорна стрілка – мантийна зона, КЗ – крайова зона, подвійна чорна стрілка – крайова зона вузлика, подвійна біла стрілка – крайова зона ПАЛП, ЦА і коротка біла стрілка – центральна артерія, СА і СВ – селезінкові артерія та вена, \* - ділянки екстрамедулярного кровотворення, \* - трабекулярна артерія, Г – стрілка вказує на мегакаріоцит.

В структурі ПАЛП частка периартеріальної ділянки становила 20,94%, 22,15% та 25,74% в 1, 2 та 3 групах щурів, які зазнавали впливу толуолу. Ці дані були нижче за показники відповідних груп контрольної серії на 32,95% ( $p < 0,001$ ),

34,23% ( $p = 0,011$ ) та 21,45% ( $p = 0,146$ ) відповідно. У щурів, які були виведені з експерименту через 30 та 60 днів після припинення дії толуолу, зазначений показник склав 27,90% та 28,20%, що менше контрольних даних на 16,49% ( $p = 0,005$ ) і

14,60% ( $p=0,014$ ). Виходячи з цього, частка крайової зони в 1 та 2 групах тварин становила відповідно 79,06% та 77,85%, що статистично вірогідно перевищувало значення відповідних груп контрольної серії на 14,96% ( $p=0,030$ ) і 17,39% ( $p=0,011$ ). Щури, які були виведені з експерименту через 15 днів після припинення дії толуолу, мали середній показник площі крайової зони ПАЛП на рівні 74,26%, що у порівнянні з 67,23% в контрольній групі не дозволяє стверджувати статистично вірогідну різницю між ними ( $p=0,146$ ). Проте, в 4 та 5 групах тварин альтернативна гіпотеза щодо різниці між контрольними та експериментальними даними зазначеного показника була підтверджена –  $p=0,005$  та  $p=0,014$  відповідно.

Площа, яку займав ГЦ лімфатичного вузлика у всіх групах тварин I серії був більшим за контрольні значення. Так, його площа у структурі лімфатичного вузлика склала 9,04% та 10,29% у щурів 1 та 2 груп відповідно, що було більше значень контролю на 13,71% ( $p=0,081$ ) та 17,87% ( $p=0,017$ ). У тварин, які були виведені з експерименту через 15, 30 та 60 днів після припинення дії толуолу, ця різниця склала 12,53% ( $p=0,115$ ), 9,45% ( $p=0,123$ ) та 15,23% ( $p=0,007$ ) відповідно. Площа мантійної зони лімфатичного вузлика у структурі останнього була менше контрольних значень. Так, у тварин, які були виведені з експерименту через 1 та 7 днів після припинення дії толуолу, середнє значення цього показника знаходилося на рівні 28,87% та 26,58%, що відрізнялося від показників відповідних груп контрольної серії на 31,77% ( $p<0,001$ ) та 32,12% ( $p=0,001$ ). У тварин 3 та 4 групи I серії площа мантійної зони була зафіксована нами на рівні 30,70% та 31,95%, що нижче контрольних значень на 30,26% ( $p<0,001$ ) та 24,07% ( $p<0,001$ ). Через 60 днів після припинення дії толуолу зазначений показник виявився на рівні 33,95%, що нижче значень контролю на 22,28% ( $p<0,001$ ). Абсолютні значення площі, що займає крайова зона лімфатичного вузлика у щурів, які зазнавали впливу толуолу, значно зростають. Це викликає також статистично вірогідне збільшення її частки у структурі вузлика. Так, середній показник МЗ ЛВ в 1, 2 та 3 групах тварин виявився на рівні 62,09%, 63,13% та 59,06%, що було більше контрольних значень на 24,83% ( $p=0,002$ ), 21,15% ( $p<0,001$ ) та 25,98% ( $p<0,001$ ) відповідно. У щурів, які були виведені з експерименту через 30 та 60 днів після припинення дії толуолу, площа зазначеного показника була зафіксована на рівні 59,02% та 56,29%, що з вірогідністю  $p<0,001$  дозволило нам підтвердити альтернативну гіпотезу щодо різниці між показниками контрольної та експериментальної серій.

**Обговорення.** Толуол широко використовуються в якості сировини в хімічній та обробній промисловості, з якою люди можуть зіткнутися в ході повсякденного життя. Джерелом надходження цієї хімічної речовини до навколишнього середовища є фарби, розчинники для

фарб, клеї, лаки, у тому числі і для нігтів, та бензин. Крім того, підвищеного ризику зазнають деякі групи людей, які піддаються впливу толуолу професійно. Це – розповсюджений розчинник, який при випаровуванні легко потрапляє в кров через легені і розповсюджується по всьому організму і накопичується переважно у ліпофільних ділянках [6]. Він може потрапляти до нирок, печінки, селезінки і головного мозку [10]. Толуол збільшує продукцію радикалів кисню, що є основним механізмом, відповідальним за ушкодження клітин під час експозиції толуолу [11]. Вільні радикали кисню або, більш загально, реактивні форми кисню, є продуктами нормального клітинного метаболізму. У фізіологічних умовах захисні антиоксидантні механізми обмежують та / або запобігають цим пошкодженням [7]. Окислювальний стрес, в результаті дисбалансу між вільними радикалами і антиоксидантною системою, може призвести до пошкодження клітинних ліпідів та білків, приводячи до порушення функції клітини [15]. У презентованій роботі ми дослідили зміни гістологічної будови селезінки щурів після впливу на організм толуолу. Попередні дослідження, пов'язані з вивченням впливу толуолу [16] на органи імунної системи нечисленні, а відсутність даних про конкретні зміни в морфогенезі того чи іншого органу іноді трактується як відсутність ефекту. Результатом нашого дослідження стало встановлення факту гіперплазії лімфоїдного компонента селезінки щурів, які зазнавали впливу толуолу. Статистично вірогідне збільшення площі, яку займає біла пульпа, привело до збільшення коефіцієнта БП/ЧП. Звертає на себе увагу також збільшення площі гермінативних центрів лімфатичних вузликів селезінки та крайової зони. В червоній пульпі ми спостерігали збільшення кількості ділянок екстрамедулярного кровотворення еритроїдного та міелоїдного типів та збільшення кількості мегакаріоцитів. Одним з можливих механізмів такої дії можна, на нашу думку, вважати ефект збільшення активних метаболітів кисню, викликаний впливом толуолу (або його метаболітами), що може привести до змін експресії генів, репаративних, метаболічних та біосинтетичних процесів [1, 2].

**Висновки:** (1) У контрольних щурів спостерігається типова для статевонезрілого віку гістологічна будова селезінки.

(2) Після інгаляційного впливу толуолу на організм спостерігається збільшення частки білої пульпи селезінки.

(3) При цьому зберігається чіткий розподіл органу на його компартменти.

(4) Збільшення терміну після припинення дії толуолу приводе до більш виражених зворотних змін гістологічної структури селезінки.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні ультрамікроструктури селезінки щурів, які зазнавали впливу толуолу, та пошуку засобів корекції змін, що були виявлені.

## ЛІТЕРАТУРА:

1. **Дубинина Е.Е.** Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме ткани при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопросы мед. химии. – 2001. – Т.47, №6. – С. 561–581.
2. **Зенков Н.К.**, Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: Маик, 2001. – 343с.
3. **Кашченко С.А.** Взаимосвязь морфогенеза костного скелета с органами иммунной системы при иммуностимуляции и иммуносупрессии в онтогенезе (анатомо-экспериментальное исследование) / С.А. Кашченко // Дис... д-ра мед. наук.- 14.03.01. – Луганск, 2004. – 491 с.
4. **Ковешников В. Г.** Функциональная морфология органов иммунной системы // Ковешников В.Г., Бирик Е.Ю. – Луганск: «Виртуальная реальность», 2007. – 172 с.
5. **Овчаренко В.В.** Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Master of Morphology» / В.В.Овчаренко, В.В. Маврич // Свід. про реєстрацію авт. права на винахід № 9604, дата реєстрації 19.03.2004.
6. AEGLS. Proposed Acute Exposure Guideline Levels. Toluene (CAS Reg. No. 108-88-3). United States Environmental Protection Agency Office of Pollution Prevention and Toxics. Public Draft. – 2000.
7. **Altavilla D.** Oxidative stress causes nuclear factor-kappa B activation in acute hypovolemic hemorrhagic shock / D. Altavilla, A. Saitta, S. Guarini et al. // Free Radical Biology Medicine. - 2001. - №30. - P. 1055–1066.
8. Does early life toluene exposure alter the expression of NMDA receptor subunits and signal transduction pathway in infant mouse hippocampus? / **Tin-Tin W.-S., Y. Yoshida, N. Kunugita [et al.]** // Neurotox. – 2010. – V. 31 – P. 647-653.
9. Effect of long-term exposure to low-level toluene on airway inflammatory response in mice / **H. Fujimaki, S. Yamamoto, Tin-Tin-Win-Shwe [et al.]** // Toxicology Letters. – 2007. - V. 168. - Issue 2 (30). – P. 132-139.
10. **Fuke C.** Postmortem diffusion of ingested and aspirated painter thinner / C. Fuke, C.L. Berry, D.J. Pounder // Forensic Science International. – 1996. - №78. – P. 199–207.
11. Halifeoglu I. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner / **I. Halifeoglu, H. Canatan, B. Ustundag et al.** // Cell Biochemistry Function. – 2000. - №18. – P. 263–267.
12. **Steiniger B.** The Open Microcirculation in Human Spleens / B. Steiniger, M. Bette, H. Schwarzbach // J. Histochem. Cytochem. 2011. - June (59). – P. 639-648.
13. Thymocytes are activated by toluene inhalation through the transcription factors NF-κB, STAT5 and NF-AT / **J. Liu, Y. Yoshida, N. Kunugita [et al.]** // Journal of Applied Toxicology. – 2010. – V. 30. - Issue 7. – P. 656–660.
14. Toluene-induced hearing loss in acivicin-treated rats / **D. Waniusiow, P. Campo, B. Cossec [et al.]** // Neurotox. and Teratol. – 2008. - V. 30. – P. 154-160.
15. **Valko M.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol et al. // The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 2007. - № 39. –P. 44–84.
16. **von Oettingen W. F.** The toxicity and potential dangers of aliphatic and aromatic hydrocarbons / W. F. von Oettingen // Yale journal of biology and medicine. – 1942. - December; №15(2). – P. 167–184.

**Волошин В.М.** Вплив толуолу на гістоморфометричні показники селезінки статевонезрілих щурів // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, №5. – С. 29-32.

У роботі наведені результати вивчення гістологічної будови селезінки статевонезрілих білих щурів після інгаляційного впливу толуолу у концентрації 500 мг/м<sup>3</sup>. Після впливу толуолу на організм спостерігається збільшення частки білої пульпи та збільшення відносної площі гермінативних центрів та крайової зони. При цьому зберігається чіткий розподіл органу на його компартменти. Збільшення терміну після припинення дії толуолу приведе до більш виражених зворотних змін гістологічної структури селезінки.

**Ключові слова:** селезінка, гістологія, толуол, щур.

**Волошин В.Н.** Влияние толуола на гистоморфометрические показатели селезенки неполовозрелых крыс // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, №5. – С. 29-32.

В работе приведены результаты изучения гистологического строения селезенки неполовозрелых белых крыс после ингаляционного воздействия толуола в концентрации 500 мг/м<sup>3</sup>. После воздействия толуола на организм наблюдается увеличение доли белой пульпы и увеличение относительной площади герминативных центров и краевой зоны. При этом сохраняется четкое разделение органа на его компартменты. Увеличение срока после прекращения действия толуола приводит к более выраженным обратным изменениям гистологической структуры селезенки.

**Ключевые слова:** селезенка, гистология, толуол, крыса.

**Voloshin V.N.** Effect of toluene on histomorphometry data in the spleen of immature rats // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, №5. – С. 29-32.

The paper presents results of studying the histological structure of spleen of immature white rats after inhalation exposure to toluene concentrations of 500 mg/m<sup>3</sup>. After toluene exposure on the body observed increase of white pulp and increased the relative area of germinal centers and marginal zone areas. It remains a clear division of authority on its compartments. The increase in time after the termination of the toluene leads to a more pronounced inverse change histological structure of the spleen.

**Key words:** spleen, histology, toluene, rat.

Надійшла 21.08.2011 р.  
Рецензент: проф. В.І.Лузін