

УДК 616.13-02:613.62]-092.9:599.323

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ АНТРАКОСИЛИКОЗА КАК ФАКТОРА РИСКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ СОСУДОВ

Ю. А. ПРОКОПЬЕВ¹, Д. В. ФОМЕНКО¹, Н. В. КИЗИЧЕНКО¹, Ю. А. КУДРЯВЦЕВА²,
В. В. БОРИСОВ², А. П. ПОПОВА¹, Н. Н. МИХАЙЛОВА¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профзаболеваний», Новокузнецк, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

В работе представлена корректная методика моделирования экспериментального антракосиликоза (АС). Результаты сканирующей электронной микроскопии образцов стенки брюшной аорты белых лабораторных крыс свидетельствуют о морфологических нарушениях сосудов, ассоциированных с хронизацией пневмокониотического процесса в динамике развития АС.

Ключевые слова: антракосиликоз, эндотелий, сканирующая электронная микроскопия.

METHODICAL APPROACHES TO STUDY OF THE ANTHRACOSILICOSIS AS A FACTOR OF RISK TO MORPHOLOGICAL DISEASES OF BLOOD VESSELS

YU. A. PROKOPYEV¹, D. V. FOMENKO¹, N. V. KIZICHENKO¹, YU. A. KUDRYAVTSEVA²,
V. V. BORISOV², A. P. POPOVA¹, N. N. MIKHAILOVA¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Hygiene and Occupational Diseases, Novokuznetsk, Russia

² Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

In work the correct method of modeling the experimental anthracosilicosis (AS) is presented. Results of the scanning electron microscopy of samples of abdominal aorta walls of white laboratory rats testify about morphological diseases of blood vessels. These diseases are associated with chronization of pneumoconiotic process in dynamics of AS progression.

Key words: anthracosilicosis, endothelium, scanning electron microscopy.

В последнее время в научной литературе все чаще дискутируется вопрос о том, может ли являться антракосиликоз (АС) – профессиональное заболевание работников угледобывающих предприятий фактором риска развития сердечно-сосудистых нарушений. И все больше доказательств дают на это утвердительный ответ [4, 6, 8]. Ведущим фактором развития данной патологии является длительное вдыхание угольно-породной пыли (УПП) с содержанием диоксида кремния, которое характеризуется не только повреждением бронхолегочной системы, но и всего организма в целом. Среди соматических заболеваний у работников угольной промышленности чаще встречаются сердечно-сосудистые, ведущее место среди которых принадлежит ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии [7].

К настоящему моменту достаточно полно изучена клиническая картина АС и патогенез его хронической формы. Есть данные о патанато-

мическом состоянии гистологических образцов легочной ткани, бронхов и сосудов малого круга кровообращения в динамике развития АС [2, 9]. В то же время отсутствуют данные о состоянии крупных кровеносных сосудов, их эндотелия как важнейшей функциональной структуры, выполняющей пиноцитозный, трансцеллюлярный транспорт веществ и молекул. Кроме этого, эндотелиоциты участвуют в неоваскулогенезе и синтезе факторов, активирующих тромбопластин, тромбосан, простагландин и др. Помимо синтеза, эндотелий осуществляет захват и инактивацию ацетилхолина, брадикинина, гистамина и др. Сосудистый эндотелий вырабатывает про- и противовоспалительные факторы, принимая участие в адаптации организма к различным патологическим состояниям [1, 5].

Проследить в клинике динамику морфологического состояния сосудов на фоне начала развития пневмокониотического процесса не представля-

ется возможным, что диктует необходимость поиска методических подходов к изучению данного вопроса. Тем более что приоритетным направлением современной профпатологии и медицины труда считается выявление признаков заболевания на ранних стадиях, позволяющих объективно диагностировать АС в преморбидный период, оценивать течение болезни, эффективно проводить профилактические и лечебные мероприятия. Это позволяют осуществить экспериментальные модели, приближенные к производственным условиям и отражающие основные патогенетические звенья в динамике развития той или иной патологии.

Представленные материалы посвящены научному обоснованию методики моделирования АС, корректному забору биологического материала (перфузирование брюшной аорты) и подготовке образцов сосудистой стенки для сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 60 взрослых белых лабораторных крысах-самцах массой 200–250 г, выращенных в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, естественном чередовании суточной освещенности. Содержание животных и эксперименты проводились в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

В работе были использованы следующие методы:

а) постановка хронического эксперимента по моделированию АС. Для затравки использовались пылевые камеры цилиндрической формы объемом 130 л. Камера снабжена отверстиями для подачи пыли, отсоса и отбора проб воздуха. Для равномерного распределения пыли в камере находится вентилятор с регулируемой скоростью вращения. Концентрация пыли в затравочной камере создается динамическим методом и регулируется путем изменения скорости подаваемого в распылитель воздуха. Концентрация УПП составляла в среднем 50 мг/м³. Скорость нагнетаемого воздуха (0,5–5 л/мин) измеряется при помощи ротаметра. Отсос воздуха из камеры осуществляется со скоростью 50 л/мин. Скорость отсоса регулируется с помощью реометра с поворотными диафрагмами;

б) подготовка образцов для изучения методом сканирующей электронной микроскопии. После декапитации, которая проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977), производился забор

биологического материала. Приготовление образцов осуществлялось в два этапа. Прежде всего, участок брюшной аорты в течение 2 мин перфузировали раствором Хэнкса с гепарином (концентрация 10 ед/мл) для полного удаления форменных элементов крови с поверхности сосуда. Далее, перфузированный образец фиксировался 1 %-ным глутаровым альдегидом в течение 2 мин, проводилась дегидратация метанолом, чистка диоксидом углерода и последующая сушка в критической точке;

в) сканирующая электронная микроскопия. После напыления проводящего покрытия – углерода – образец просматривался в режиме вторичных электронов и низкого вакуума на сканирующем электронном микроскопе Hitachi S3400N при ускоряющем напряжении 30 кВ.

Результаты и обсуждение

Моделирование АС осуществлялось путем длительного воздействия на животных УПП в специальных пылевых камерах. Использовалась УПП угля марки газовожирный (ГЖ), выбор которой был основан на результатах изучения биотоксичности различных марок углей. Марка ГЖ является основной добываемой на шахтах Новокузнецка и обладает высокой биотоксичностью, имеет самый высокий показатель выхода смолистых веществ – 14 % и один из высоких выходов летучих веществ – 38 % по сравнению с другими марками [3]. Учитывая, что в витающей пыли шахт содержание в УПП частиц размером до 5 микрон, обладающих наибольшей агрессивностью и попаданием в глубокие разветвления бронхиального дерева, составляет 80 % от общей массы, нами использовалась УПП, состоящая из частиц 5 и менее микрон.

Длительность эксперимента составила 12 недель, в течение которых животные ежедневно по 4 часа находились в ингаляционно-затравочной камере. Хронизация процесса определялась от средней продолжительности жизни лабораторной крысы, составляющей около 3 лет, что соотносится со средней продолжительностью жизни человека приблизительно как 1:24. При такой экстраполяции 6 месяцев жизни человека соответствует примерно одной неделе жизни данного животного. Таким образом, забор биологического материала осуществлялся через 1, 3, 6, 9, 12 недель затравки. Три недели имитируют приблизительно три года работы в агрессивной среде; 6–9 недель – 5–10 лет стажа; 12 недель эксперимента – стажированность свыше 10 лет. Когда речь идет об экстраполяции на организм человека результатов, полученных на

лабораторных животных, не следует это понимать абсолютно. Подразумеваются лишь основные, ключевые физиологические или патогенетические звенья проявления того или иного состояния.

По результатам исследования образцы контрольной группы животных с углеродным напылением имели обычную физиологическую структуру стенки брюшной аорты. Под слоем эндотелия отмечали упорядоченно расположенные коллагеновые и эластиновые волокна (рис. 1).

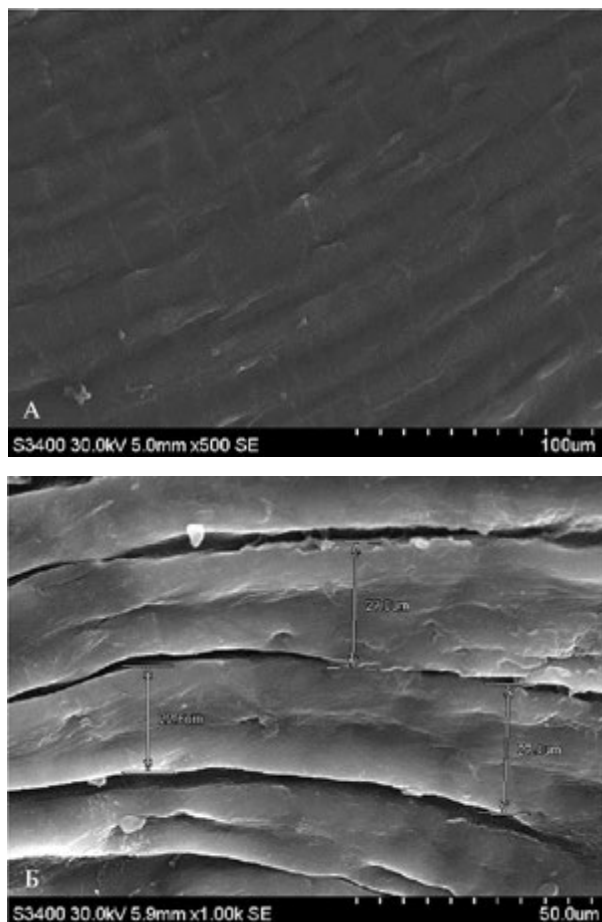


Рис. 1. Стенка брюшной аорты животного контрольной группы: А – в качестве проводящего покрытия углерод (увелич. $\times 500$); Б – в качестве проводящего покрытия золотопалладиевый сплав (увелич. $\times 1000$);

У животных с АС к 3-й неделе затравки волокна коллагена и эластина в стенке брюшной аорты упорядочены, эндотелий частично слущен, местами дифференцируются его остатки (рис. 2). На 6-й неделе затравки эндотелий четко не дифференцируется, состояние коллагеновых и эластиновых волокон сходно с контрольными образцами, адгезии форменных элементов крови и фибрина нет (рис. 3). К 9-й неделе эксперимента волокна упорядочены, эндотелий на образцах отсутствует, на поверхности сосуда обнаруживаются очаговые отложения фибрина с форменными элементами крови (рис. 4).

К 12-й неделе наблюдается разрыхление волокон, отмечается адгезия белков крови (фибрина) с вовлеченными в него эритроцитами (рис. 5).

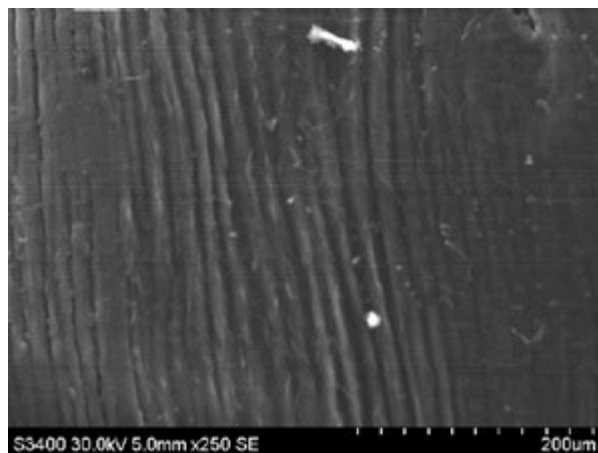


Рис. 2. Стенка брюшной аорты крысы, подвергшейся воздействию УПП в течение 3 недель (увелич. $\times 250$);

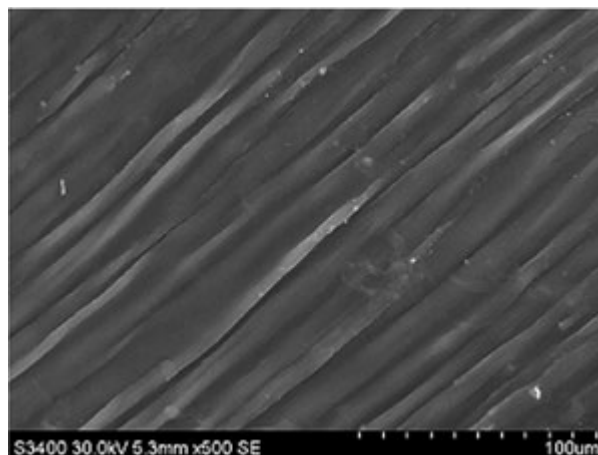


Рис. 3. Стенка брюшной аорты крысы, подвергшейся воздействию УПП в течение 6 недель (увелич. $\times 500$)

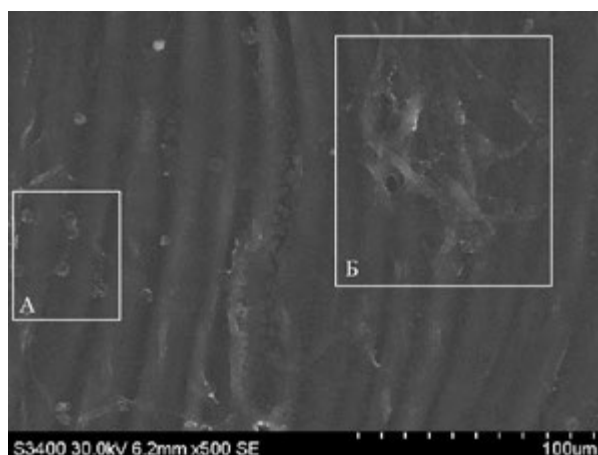


Рис. 4. Стенка брюшной аорты крысы, подвергшейся воздействию УПП в течение 9 недель:
А – форменные элементы крови;
Б – отложения фибрина (увелич. $\times 500$)

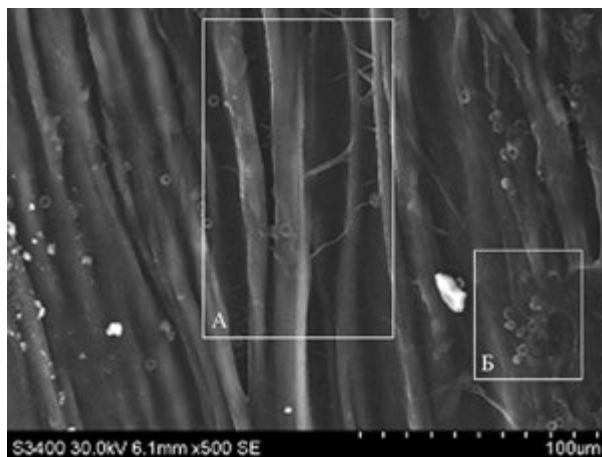


Рис. 5. Стенка брюшной аорты крысы, подвергшейся воздействию УПП в течение 12 недель:
А – разрыхление волокон соединительной ткани;
Б – отложения фибрина и форменных элементов крови (увелич. $\times 500$)

Таким образом, были получены достоверные изображения коллагеновых и эластиновых волокон брюшной аорты, которые наглядно отображают морфологические изменения сосуда в динамике развития АС. В то же время анализ образцов показал, что при напылении углеродом, которое применяли для большинства образцов, достаточно сложно характеризовать состояние эндотелия. При использовании в качестве проводящего покрытия сплава золота с палладием удастся получить более высококонтрастные изображения всех морфоструктур кровеносного сосуда за счет достаточно высокой вторичной электронной эмиссии (рис. 1Б). При этом микрофотографии образцов с золото-палладиевым напылением могут иметь большее увеличение в сравнении с образцами, покрытыми углеродом. Существенным минусом использования данного сплава при проведении объемных исследований является его высокая стоимость.

Полученные результаты дают основание свидетельствовать о том, что разработанная методика моделирования экспериментального АС корректна, позволяет оценить в динамике с самого первого дня патогенетического воздействия изменения морфоструктуры тканей. Сканирующая электронная микроскопия дает четкое представление о состоянии сосудистой стенки. Необходимость продолжения подобных исследований очевидна с использованием максимальных возможностей данной методики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Афанасьев Ю. И., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф. Гистология: учебник. Под ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2002.

Afanas'ev Ju. I., Jurina N. A., Kotovskij E. F. Gistologija: uchebnik. Pod red. Ju. I. Afanas'eva, N. A. Jurinoj. 5-e izd., pererab. i dop. Moscow, Medicina. 2002. [In Russ].

2. Бондарев О. И. Патологоанатомическое и морфометрическое исследование бронхов, респираторной ткани и сосудов малого круга кровообращения при воздействии угольно-породной пыли и при экспериментальном антракосиликозе. Дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2010.

Bondarev O. I. Patologoanatomicheskoe i morfometricheskoe issledovanie bronhov, respiratornoj tkani i sosudov malogo kruga krovoobrashhenija pri vozdejstvii ugol'no-porodnoj pyli i pri jeksperimental'nom antrakosilikoze [dissertation]. Novosibirsk; 2010. [In Russ].

3. Волынкина Е. В., Громов К. Г. Медико-биологические исследования углей Кузбасса. Кокс и химия. 1998; 11: 30–33.

Volynkina E. V., Gromov K. G. Mediko-biologicheskie issledovanija uglej Kuzbassa. Koks i himija. 1998; 11: 30–33. [In Russ].

4. Золоева П. В. Гигиенические аспекты профессионального антракосиликоза и особенности его формирования в эксперименте. Дис. ... канд. биол. наук. Иркутск; 2009.

Zoloeva P. V. Gigenicheskie aspekty professional'nogo antrakosilikoza i osobennosti ego formirovaniya v jeksperimente [dissertation]. Irkutsk; 2009. [In Russ].

5. Каде А. Х. Физиологические функции сосудистого эндотелия. Фундаментальные исследования. 2011; 11 (3): 611–617.

Kade A. H. Fiziologicheskie funkicii sosudistogo jendotelija. Fundamental'nye issledovanija. 2011; 11 (3): 611–617. [In Russ].

6. Михайлова Н. Н., Горохова Л. Г., Кизиченко Н. В., Прокопьев Ю. А., Бугаева М. С., Бондарев О. И. Клинико-экспериментальные исследования системных морфологических изменений в патогенезе пневмокониоза. «Dny vedy-2012»: materialy VIII mezinarodni vedecko-prakticka conference. Praha; 2012. Dil 71.

Mihajlova N. N., Gorohova L. G., Kizichenko N. V., Prokop'ev Ju. A., Bugaeva M. S., Bondarev O. I. Klinikojeksperimental'nye issledovanija sistemnyh morfologicheskikh izmenenij v patogeneze pnevmokonioza. «Dny vedy-2012»: materialy VIII mezinarodni vedecko-prakticka conference. Praha; 2012. Dil 71. [In Russ].

7. Панев Н. И. Структурно-функциональные изменения миокарда в покое и после нагрузочной пробы у больных пылевым бронхитом в сочетании с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией. Медицина труда и промышленная экология. 2009; 11: 43–48.

Panev N. I. Strukturno-funkcional'nye izmenenija miokarda v pokoe i posle nagruzochnoj proby u bol'nyh pyl'evym bronhitom v sochetanii s ishemicheskoy bolezn'ju serdca i arterial'noj gipertenziej. Medicina truda i promyshlennaja jekologija. 2009; 11: 43–48. [In Russ].

8. Филимонов С. Н. Научное обоснование прогнозирования возникновения ишемической болезни сердца у рабочих угольной и алюминиевой промышленности. Дис. ... д-ра мед. наук. Иркутск; 2007.

Filimonov S. N. Nauchnoe obosnovanie prognozirovaniya vozniknovenija ishemicheskoy bolezn'i serdca u rabochih ugol'noj i aljuminievoj promyshlennosti [dissertation]. Irkutsk; 2007. [In Russ].

9. Фоменко Д. В., Горохова Л. Г., Панев Н. И., Казич-
кая А. С., Бондарев О. И. Морфологические изменения
тканей при экспериментальном антракосиликозе. Медици-
на труда и промышленная экология. 2011; 2: 15–21.

Fomenko D. V., Gorohova L. G., Panev N. I., Kazic-
kaja A. S., Bondarev O. I. Morfologicheskie izmenenija tkanej
pri jeksperimental'nom antrakosilikoze. Medicina truda i pro-
myshlennaja jekologija. 2011; 2: 15–21. [In Russ].

Статья поступила 25.08.2015

Для корреспонденции:

Михайлова Надежда Николаевна
Адрес: 654041, г. Новокузнецк,
ул. Кутузова, д. 23
Тел. 8 (3843) 79-63-75,
E-mail: napmih@mail.ru

For correspondence:

Mikhailova Nadezhda
Address: 23, Kutuzov st., Novokuznetsk,
654041, Russian Federation
Tel. +7 (3843) 79-63-75
E-mail: napmih@mail.ru