

# ГІСТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СЕЛЕЗІНКИ, ПЕЧІНКИ, НИРОК ТВАРИН ЗА ДІЇ БІОАКТИВНИХ КОМПЛЕКСІВ

Н.П. Шемедюк, О.О. Зайцев, В.І. Буцяк, д. сіл.-госп. н.

Львівський національний університет ветеринарної медицини

та біотехнологій ім. С.З.Гжицького. м. Львів

**РЕЗЮМЕ.** Передозування препаратами рослинного походження зумовлює прооксидантний ефект. Спостерігаємо токсичний вплив екстрактів *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* при внутрішньоочеревинному введенні у дозі 30 мкл на 20 г маси тварин та з кормом у дозі 2 мкл, на 20 г маси миші. Спостерігаємо зміни органів імунної системи, деструктивні зміни у печінці. При внутрішньоочеревинному введенні екстрактів *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* у дозі 5 мкл на 20 г маси тварин та з кормом у дозі 3 мкл (розведення водою 1:3) на 20 г маси миші істотних змін відносно контролю не спостерігаємо — доза екстракту нетоксична.

Ключові слова: етанольні екстракти, токсична доза, печінка, селезінка, нирки.

**РЕЗЮМЕ.** Передозировка препаратами растительного происхождения приводит к прооксидантному эффекту. Отмечаем токсическое влияние экстрактов *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* при внутрибрюшинном введении в дозе 30 мкл на 20 г массы животного и с кормами в дозе 2 мкл, на 20 г массы мыши. Отмечаем изменения органов иммунной системы, печени. При внутрибрюшинном введении экстрактов *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* в дозе 5 мкл на 20 г массы животного и с кормами в дозе 3 мкл (1:3), на 20 г массы мыши изменений относительно контроля не отмечаем — доза экстракта не имеет токсического влияния.

Ключевые слова: этанольные экстракты, токсическая доза, печень, селезенка, почки.

**SUMMARY.** A prooxidative effect predetermines the overdose of phyto-genous preparations. Look after toxic influence of extracts of *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* at inwardly peritoneal introduction for the concentrations of 30 mkl on 20 grammes of mass of zoons and with a feed in the concentrations of 2 mkl, on 20 grammes of mass of mouse. Look after the changes of organs of the immune system, destructive changes in a liver. At inwardly peritoneal introduction of extracts of *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* for the concentrations of 5 mkl on 20 grammes of mass of zoons and with a feed in the concentrations of 3 mkl (breeding water 1:3) on 20 grammes of mass of mouse of substantial changes in relation to control does not look after — the dose of extract is not toxic.

Keywords: extracts, toxic dose, liver, spleen, buds.

У попередніх наших дослідженнях було показано, що етанольні екстракти (біоактивні комплекси ліпофільного характеру) із сухої біомаси рослин, які містять велику кількість речовин з антиоксидантною активністю володіють доволі високою антипроліферативною активністю щодо клітин з високим рівнем експресії трансформованого фенотипу. Біологічно активні речовини містяться в рослинах в оптимальних кількісно-якісних співвідношеннях [1, 2]. Так, галенові препарати (настої, відвари, настоянки, екстракти) мають широкий спектр дії завдяки сумуванню і потенціюванню дії різних за хімічною будовою і фармакологічною активністю діючих чинників. Зважаючи на широкий спектр фізіологічної та фармакологічної активності флавоноїдів (антиоксидантна, протизапальна [3, 5], антиоксична, протинфекційна, протипухлинна [4, 5]), особливу увагу приділено дослідженню екстрактів рослин з переважаючою кількістю саме цих речовин.

Застосовуючи препарати рослинного походження, особлива увага приділяється визначенню нетоксичної дози. Слід пам'ятати, що їх передозування зумовлює прооксидантний ефект. Невисокі концент-

рації препаратів, очевидно, не викликають конформаційних змін з боку білкових молекул клітинних мембран, результатом чого є підсилення білок-ліпідних та білок-білкових взаємодій, які сприяють підвищенню стійкості мембран до гіпотонічного гемолізу. З підвищенням концентрації препарату проходить повне насичення мембранних структур молекулами біологічно активних речовин досліджуваного препарату, що спричиняє зміни конформації білкових молекул внаслідок того, що ряд гідрофобних радикалів, які при невеликих концентраціях препарату були занурені у ліпідний шар, стають зовнішніми, що призводить до послаблення гідрофобних взаємодій між білок-білковими, білок-фосфоліпідними, холестерол-фосфоліпідними комплексами. Істотну роль у цьому відіграє порушення холестерол-білкових взаємодій, оскільки холестерол є важливим регулятором мінливості клітинних мембран. У результаті виникнення таких порушень спостерігається своєрідне "розрідження мембрани", втрата осмотичної рівноваги між нею та середовищем і настає гемоліз. Отже, внаслідок тривалого введення антиоксидантів має місце розвиток адап-

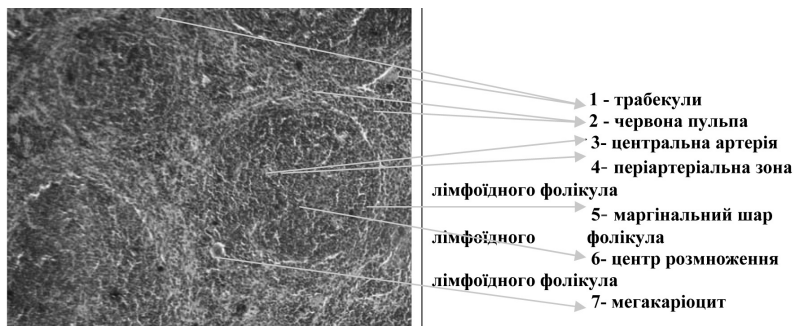
тивної перебудови фосфоліпідного складу мембран в напрямку збільшення в ньому легкоокиснюваних фракцій, тобто в напрямку, протилежному ефекту їх введення [1].

Застосування токсичних доз препаратів спричиняє деструктивні зміни в організмі. Оскільки печінка є центральним органом метаболізму та системи захисту організму, селезінка є органом лімфатичної системи, але знаходиться в тісному зв'язку з кровоносною системою, одним із основних органів виділення речовин з організму є нирки, токсичність препаратів оцінювалася саме за морфологічними змінами у цих органах [6].

Метою роботи є проведення серії дослідів *in vivo*, які б дали можливість визначити нетоксичну дозу екстрактів *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* за дії на організм тварин.

## Матеріали і методи

Для проведення досліджень структурних змін паренхіми печінки, селезінки, нирок були використані нелінійні білі миші, самці, масою  $\approx 20$  г. Тривалість досліду становила 14 діб. Першій групі лабораторних тварин екстракти вводились внутрішньоочеревинно у дозі 30 мкл, 5 мкл на 20 г маси



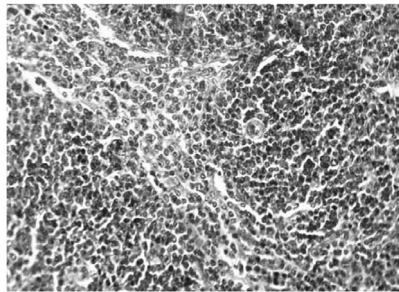
**Рис. 1.** Гістологічний препарат селезінки інтактних мишей. Гематоксилін-еозин x100 (фолікули)

тварини, другій — з кормом відповідні екстракти у дозі 2 мкл, 3 мкл (розведення водою 1:3) на 20 г маси миші. Третя група — інтактні тварини — контроль.

По завершенню досліду всіх тварин було декапітовано під ефірним наркозом, проведено відбір зразків печінки, селезінки, нирок для морфологічних досліджень. Зразки фіксували в 10% розчині формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і заливали в парафін, після чого виготовляли зрізи на санному мікромомі у 5-7 мкм. Одержані зрізи наклеювали на предметні скельця, фарбували гематоксиліном Еріха та еозином і досліджували за допомогою світлового мікроскопа [7]. Зміни оцінювали у полях зору мікроскопа.

#### Результати досліджень

Як показали отримані дані дослідів, морфологічна структура досліджених органів у групі контрольних мишей відповідає нормі для даного віку тварини і наприкінці досліджень відхилень від норми не спостерігалось. На зрізах тканини селезінки вирізняється вузька сполучнотканинна капсула й основні компоненти паренхіми (рис.1,2), тобто червона й біла пульпа. Площа зрізів селезінки зайнята червоною пульпою, у масиві якої вирізняється рівномірно розміщена тканина білої пульпи у формі лімфатичних вузликів навколо центральних вен і лімфоїдних скупчень подовженої форми, прилеглих до адвентиції пульпарних артерій. Основу червоної пульпи утворює ретикулярна тканина, у якій розміщені макрофаги, зернисті та незернисті лейкоцити, поодинокі мегакаріоцити, еритроцити. Біла пульпа представлена лімфоїдною тканиною, яка продукує лімфоцити. У лімфатичних вузликах визначаються їх структурні зони: вузькі періартеріальні ділянки переходять у ширші



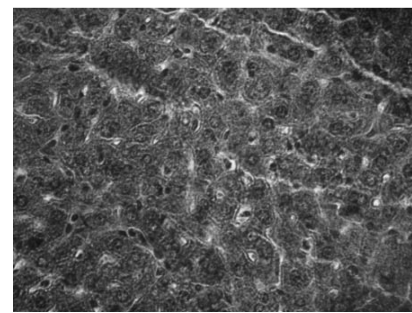
**Рис. 2.** Гістологічний препарат селезінки інтактних мишей. Гематоксилін-еозин x200 (фолікули)

й розширені гермінативні. Мантійні зони обмежені маргінальними, що межують з лімфоїдними вузликами і червоною пульпою. Фолікули чітко відокремлені один від одного та від червоної пульпи [7, 8].

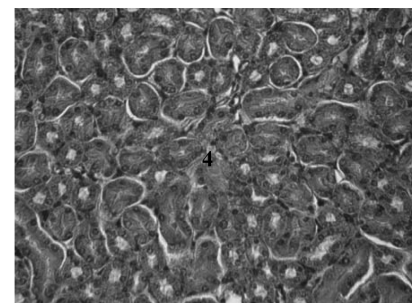
При гістоморфологічному дослідженні в полі зору мікроскопа на зрізах печінки у мишей контрольної групи відмічається типова будова печінкових часточок (рис 3): гепатоцити округлої форми з еозинофільною цитоплазмою і досить великим базофільним ядром. Місцями в печінці реєструються гепатоцити, цитоплазма яких містить 2 ядра. В центрі кожної часточки — центральна вена, від якої радіально розходяться печінкові балки, між якими знаходяться синусоїдні капіляри. У міжчасточковій сполучній тканині в кутах часточок спостерігаються триади. Кожна триада утворена міжчасточковою артерією, веною і жовчною протокою. Між часточками знаходиться сполучна тканина. Судини в міру кровонаповненні [6].

Гістологічна будова нирки контрольного зразку збережена (рис. 4, 5). Чітко виділяється межа між кірковим та мозковим шарами. Ниркові клубочки і каналці незмінні. Капсула Боумена — Шумлянського навколо клубочків [6].

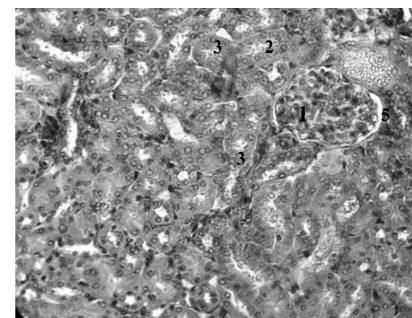
Внутрішньоочеревинне введення екстрактів у дозі 30 мкл на 20 г



**Рис. 3.** Гістологічний препарат печінки інтактних мишей. Гематоксилін-еозин x200



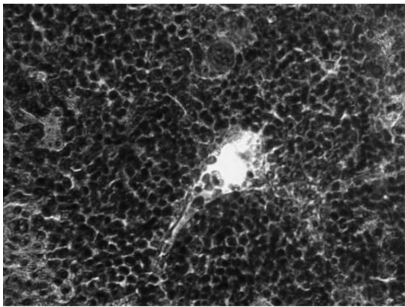
**Рис. 4.** Гістологічний препарат нирки інтактних мишей. Гематоксилін-еозин x200 (мозковий шар)



**Рис. 5.** Гістологічний препарат нирки інтактних мишей. Гематоксилін-еозин x200 (кірковий шар)

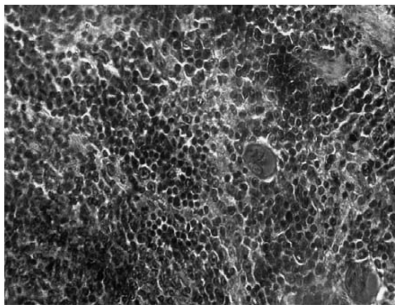
1- ниркове тільце ( мальпігіїв клубочок)  
2- проксимальні звивисті каналці  
3- дистальні звивисті каналці  
4- інтерстиціальна сполучна тканина  
5- порожнина капсули Боумена-Шумлянського

маси миші призводить до морфологічних змін досліджуваних органів. При дослідженні селезінки за дії арніки гірської, перстачу прямиостоячого (рис. 6), в полі зору мікроскопа помічаємо істотну перевагу білої пульпи над червоною, лімфоїдні фолікули втратили чітко виражену структуру. Серед червоної пульпи — поодинокі мегакаріоцити, та їх кількість в полі зору мікроскопа більша, порівняно з контрольними зразками. Характеризуючи



**Рис. 6.** Гістологічний препарат селезінки мишей за дії перстачу прямостоячого у концентрації 30 мкл на 20 г маси. Внутрішньоочеревинне введення, збільшена клітинність білої пульпи, гіпертрофія клітин, мегакаріоцити.  
Гематоксилін-еозин x200

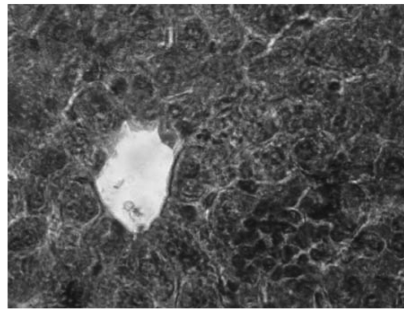
вплив софори японської (рис. 7) за даної діючої дози, крім описаних вище відмінностей, відносно контролю спостерігаємо гіпертрофію клітин, поодинокі атипіві мегакаріоцити [9].



**Рис. 7.** Гістологічний препарат селезінки мишей за дії софори японської у концентрації 30 мкл на 20 г маси. Внутрішньоочеревинне введення, збільшена клітинність білої пульпи, атипіві мегакаріоцити.  
Гематоксилін-еозин x200

Зазначені відмінності свідчать про зміни реактивності системи лімфоцитів у селезінці експериментальних тварин. Значний розвиток білої пульпи та ділянки гіперплазії лімфоцитів можна розцінювати як перевищення фізіологічного рівня адаптації, що може мати негативний наслідок.

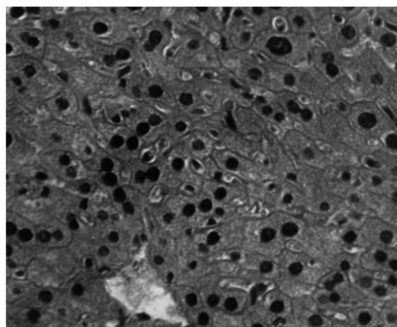
При дослідженні печінки за дії перстачу прямостоячого у дозі 30 мкл на 20 г маси миші на поперечних зрізах у полі зору зберігалася балкова будова тканини. Гепатоцити, що утворювали балочки, зберігали типову структуру, але привертала увагу помітна активація клітинних елементів печінки. Так, балочки, що радіально сходилися до центральних



**Рис. 8.** Гістологічний препарат печінки мишей за дії перстачу прямостоячого у концентрації 30 мкл на 20 г маси. Внутрішньоочеревинне введення. Гепатоцити з двома ядрами.  
Гематоксилін-еозин x200

вен, порівняно з інтактною групою, нерідко містили збільшену кількість гепатоцитів з двома ядрами, кількість клітин Купфера збільшено, розташовані нерівномірно — скупчення (рис. 8).

Негативний вплив препарату на мікроструктуру тканини печінки спостерігаємо за дії софори японської (рис. 9) у дозі 30 мкл на 20 г маси миші. Ці зміни полягали у порушенні балкової будови більшості часточок (зникнення меж печінкових дольок, порушення радіального розміщення балок). Серед гепатоцитів в полі зору мікроскопа виявляли двоядерні клітини з вираженою поліморфністю ядер. Ядра різного розміру та об'єму — від дрібних ущільнених до атипіві великих. Є ядра з малим вмістом гетерохроматину з маргінальним його розташуванням. Кількість зірчастих ретикулоцитів зменшена.



**Рис. 9.** Гістологічний препарат печінки мишей за дії софори японської у концентрації 30 мкл на 20 г маси. Внутрішньоочеревинне введення. Гепатоцити з двома ядрами, поліморфізм ядер. Гематоксилін-еозин x200

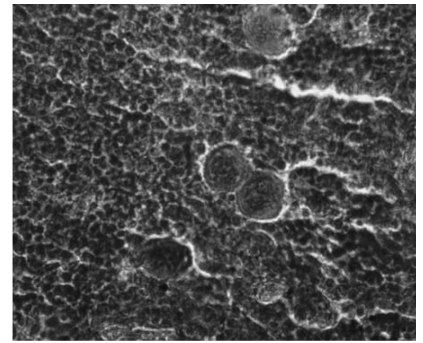
Негативний вплив арніки гірської у дозі 30 мкл на 20 г маси миші менш виражений, характерна на-

явність поодиноких атипіві гігантських гепатоцитів на зрізі тканини печінки, двоядерних клітин в полі зору мікроскопа.

За дії спирту етилового (64%) морфологічних змін у печінці відносно контролю не помічено.

Внутрішньоочеревинне введення екстрактів у дозі 30 мкл на 20 г маси миші не призводить до морфологічних змін нирки. Гістологічна будова нирки збережена.

За дії 2 мкл екстракту арніки гірської на 20 г маси миші, який вносили до корму, спостерігаємо значні зміни у селезінці тварин. Лімфоїдні фолікули втратили чітко виражену структуру. Істотно збільшення в полі зору мікроскопа кількості мегакаріоцитів (рис. 10) [9], які розміщені у всіх частинах селезінки.



**Рис. 10.** Мегакаріоцити у селезінці мишей за дії 2 мкл екстракту арніки гірської на 20 г миші, який вносили до корму

Значна кількість мегакаріоцитів у селезінці — компенсаторна реакція організму у відповідь на імунітопатологічні пошкодження, ознака розвитку дисбалансу, при якому має місце пошкодження органів імуногенезу, у тому числі кісткового мозку як системи імуногенезу та як системи кровотворення. Також це явище може розглядатися як феномен перебудови імунної системи у відповідь на її активацію біологічно активними речовинами арніки гірської.

У печінці за дії арніки гірської за даної діючої дози істотних змін відносно контролю не спостерігаємо. На зрізах можна побачити поодинокі двоядерні клітини, що пояснюється активацією клітинних елементів печінки.

Внесення до корму екстрактів у дозі 2 мкл на 20 г маси миші не призводить до морфологічних змін нирок. Гістологічну будову нирки збережено.

Внутрішньоочеревинне введення екстрактів рослин у дозі 5 мкл на 20 г маси миші, внесення до корму екстрактів рослин у дозі 3 мкл (розведення водою 1:3) на 20 г маси миші не призводить до морфологічних змін досліджуваних органів відносно контролю.

При інтерполяції результатів *in vitro* на організм [10], за математичними розрахунками, ми отримали дозу 2,6 мкл на 20 г маси тварин, яка спричиняє залежно від екстракту цитотоксичний чи цитостатичний ефект на культуру клітин. Ця доза володіє токсичним ефектом за дії більшості досліджуваних препаратів за умов внесення екстрактів до корму, тоді як при внутрішньоочеревинному введенні поріг токсичності є нижчим. Переносима токсична доза — 30 мкл екстракту на 20 г маси

тварини за внутрішньоочеревинного введення. Оскільки доза 5 мкл екстрактів арніки гірської, софори японської на 20 г маси тварини не є токсичною при внутрішньоочеревинному введенні, її можна рекомендувати для вивчення протипухлинної дії досліджуваних екстрактів (за цієї дози на культуру пухлинних клітин спостерігаємо антинеопластичну дію). При нижчих дозах препаратів *in vitro* спостерігали вибірковість їхньої дії щодо клітин з різним рівнем експресії трансформованого фенотипу. Дозу 3 мкл (розведення 1:3) екстракту на 20 г маси тварин за умов внесення до корму можна рекомендувати для вивчення протипухлинної дії перстачу пряmostоячого.

#### Висновки:

1. Спостерігаємо токсичний вплив

екстрактів *Arnica Montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* при внутрішньоочеревинному введенні у дозі 30 мкл на 20 г маси тварин та з кормом у дозі 2 мкл, на 20 г маси миші. Спостерігаємо гістологічні відмінності відносно контролю органів імунної системи, деструктивні зміни у печінці.

2. При внутрішньоочеревинному введенні екстрактів *Arnica montana*, *Potentilla erecta*, *Sophora japonica* у дозі 5 мкл на 20 г маси тварин та з кормом у дозі 3 мкл (розведення водою 1:3) на 20 г маси миші істотних гістологічних змін селезінки, печінки, нирок відносно контролю не спостерігаємо — доза екстракту нетоксична.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. — М.: Наука, 1984. — 160с.
2. Briskin D.P. Medicinal plants and phytochemicals. Linking plant biochemistry and physiology to human health. / D.P. Briskin // *Plant Physiol.* — 2000; 124: 507-514.
3. Залесский В.Н. Антиапоптотические, проапоптотические, антиоксидантные реакции молекул флавоноидов — растительных фенолов. / В.Н.Залесский, Н.В. Великая // *Совр. проблемы токсикологии.* — 2003. — №3. — С. 64-72.
4. Фільченков О.О.. Порівняльний аналіз дії різних флавоноїдів на проходження клітинного циклу та індукції апоптозу у клітинах лінії МТ-4 гострої лімфобластної лейкемії людини. / О.О.Фільченков, М.П. Завелевич // *Укр. біохім. журн.* — 2009. — т. 81, №5. С. 33-39.
5. Andersen Q.M.. *Flavonoids — Chemistry, Biochemistry and Applications.* / Q.M.Andersen, K.R. Markham // *Taylor and Francis Group* — 2006. P. 617-917.
6. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / [під. ред. І.Я. Коцюмбаса]. — Львів: "Тріада". — 2006. — С. 359.
7. Потоцький М.К. Основи гістопатологічної техніки. / М.К. Потоцький // *Методичні вказівки.* -Київ, 2001. С. 66.
8. Волкова О.В., Элецкий Ю.К. Основы гистологии и гистологической техники. / О.В.Волкова, Ю.К. Элецкий- М.: Медицина, 1987. — 301 с.
9. Гистохимия и электронная микроскопия в клинической и экспериментальной онкологии / [под. ред. Н. А. Краевского, Н.Т. Райхлина, Г. Г. Голдевского]. — М. "Медицина", — 1975. — С. 221.
10. Ушкалов В.О.. Методичні рекомендації щодо виявлення токсичної та мутагенної дії ветеринарних препаратів на моделі клітин *in vitro*. / В.О. Ушкалов, М.В. Бабкін, О.А. Лаврик // *Методичні рекомендації.* — Київ, 2008. 12 с.

Надійшла до редакції 17.06.2010