

Научная статья

УДК 633.883:599.323

doi: 10.34655/bgsha.2024.77.4.008

Морфологическое и гистохимическое проявление действия препарата «диг-да-ши-тан» при хроническом токсическом гепатите у крыс

Олег Иннокентьевич Убашеев¹, Наталья Викторовна Мантатова²

^{1,2}Бурятская государственная сельскохозяйственная академия имени В.Р. Филиппова, Республика Бурятия, Улан-Удэ, Россия,

¹helge5@rambler.ru

²mannat75@yandex.ru

Аннотация. В современных условиях остро стоит вопрос об изыскании новых лекарственных препаратов, обладающих высокой терапевтической активностью и оказывающих минимальное нежелательное действие на организм животных. Для этого предлагается шире использовать возможность различных лекарственных растений. В статье приводятся результаты исследования влияния четырехкомпонентного растительного препарата «диг-да-ши-тан», состав которого приводится в трактатах тибетской медицины, на регенеративную способность печени крыс при хроническом токсическом гепатите. Препаратом сравнения служило гепатопротекторное средство холосас. Животные контрольной группы лечения не получали. Исследования выполнены с использованием гистологических и гистохимических методов. Установлено, что применение испытуемого препарата вызывает достоверное уменьшение степени фиброза, площади лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрации и некрозов. Гистологическое исследование материала, полученного от животных первой группы, на 14-е сутки применения испытуемого препарата характеризовалось уменьшением площади лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрации в 1,8 раза и некроза в 5,6 раза, на 21-е сутки эксперимента – прогрессирующим уменьшением лимфогистиоцитоза в 4,4 раза и площади некрозов в 2,6 раза. Отмечена более высокая, чем при применении препаратов сравнения, скорость репарации гепатоцитов на фоне резорбции соединительной ткани. Также установлено, что структурно-метаболические нарушения в печени при применении испытуемого препарата оказались ниже, чем в контроле. Показатели содержания свободного оксипролина в гомогенате органа уменьшались на всех этапах эксперимента в сравнении с контрольной группой.

Ключевые слова: печень, крысы, гепатит, препарат «диг-да-ши-тан», морфология.

Original article

Morphological and histochemical effects of the drug 'dig-da-shi-tan' in chronic toxic hepatitis at rats

Oleg I. Ubasheev¹, Natalia V. Mantatova²

^{1,2}Buryat State Academy of Agriculture named after V. Philippov, Republic of Buryatia, Ulan-Ude, Russia

¹helge5@rambler.ru

²mannat75@yandex.ru

Abstract. Nowadays, the search for new drugs with high therapeutic efficiency and minimal side effects on animals is a pressing issue. To address this, it is proposed to make better use of the potential of various medicinal plants. The article deals with the results of a study on the effect of a four-components herbal preparation, “dig-da-shi-tan,” described in Tibetan medical texts, on the ability of liver regeneration of rats with chronic toxic hepatitis. For comparison, a hepatoprotective drug, holosas, was used as a control. Animals of a control group did not receive any treatment. The study used histological and histochemical methods. The results showed that the tested drug significantly reduced fibrosis, lymphoid-histiocytic infiltration and necrosis. Histological processing of the material obtained from the animals of the first group on the 14th day after the application of the test drug revealed a reduction of the area of lymphoid-histiocytic infiltration in 1.8 times and necrosis in 5.6 times. On the 21st day, there was a further decrease in lympho-histiocytosis in 4.4 times and necrosis in 2.6 times. The higher speed of reparation of hepatocytes against resorption of connective tissue was pointed. The total number of mitosis and hypertrophied cells indicated that the test drug was more effective than the comparison drugs. The highest regenerative activity was observed on the 14th and 21st days of treatment. Structural and metabolic abnormalities in the liver while using the test drug compared to the control group turned to be lower. Indicators of the content of free oxyproline in the organ homogenate decreased at all stages of the experiment compared to the control group.

Keywords: liver, rats, hepatitis, drug ‘dig-da-shi-tan’, morphology.

Введение. Проблема изучения регенерации органов и тканей после их повреждения имеет важное общебиологическое значение. Ряд авторов, Ивашкин В.Т. [1], Подымова С.Д. [2], отмечают возросшее (до 3%) от общей патологии печени ее токсическое поражение, объясняя это негативным влиянием на организм различных факторов.

Функциональное восстановление пораженного органа или ткани зависит от степени его регенерации [3]. Плеханов А.Н. [4], Танака М. [5], Михалопулос Г.К. [6] отмечают, что процесс регенерации затрагивает как органоиды клетки (внутриклеточная регенерация), так и их размножение (пролиферация).

Проблема обусловлена широким распространением заболеваний печени, приводящих к развитию печеночной недостаточности. Исходя из этого, актуальным становится использование для регенерационной терапии печени различных лекарственных растений, влияющих на ускорение механизмов репаративной регенерации.

Гистологические и гистохимические исследования позволяют изучать структурные изменения, происходящие на клеточном, тканевом и органном уровнях при различных патологических процессах, а также используются для оценки воздействия лекарственных препаратов. Мор-

фологические исследования помогают изучить эффективность лекарственных средств и разработать новые терапевтические подходы к лечению заболеваний. Исходя из этого была поставлена **цель** – изучить морфологическое и гистохимическое проявление действия препарата «диг-да-ши-тан» при хроническом токсическом гепатите у крыс.

Материал и методы исследования. В эксперименте использовано 1640 белых крыс линии Wistar, содержание которых регламентировалось соответствующими документами [7]. Экспериментальная часть исследований выполнена согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Сформировано 3 группы животных, у которых моделировали хронический токсический гепатит согласно методике, предложенной Р.У. Мироновым [8]. Крысам каждой группы подкожно инъецировали 50% масляный раствор четыреххлористого углерода в дозе 0,25 мл/100 г веса тела. Раствор вводили 2 раза в неделю в течение 2 месяцев. После этого животные испытываемой группы на протяжении месяца получали испытываемое тибетское лекарственное средство «диг-да-ши-тан», изготовленное по прописи [9]: горечавка бородатая (*Gentiana Barbata*

Froel), цветки; зубчатка обыкновенная (*Odontites vulgaris* Moench), трава; эмблика лекарственная (*Embllica officinalis* L.), плоды; софора желтоватая (*Sophora flavescens* Ait), корни, которое вводили per os ежедневно в дозе 10 мл/кг массы животных. Второй группе животных в течение месяца per os задавали препарат сравнения холосас в дозе 1 мг/кг. Животные контрольной группы лечение не получали.

Эвтаназию крыс как находящихся в эксперименте, так и контрольной группы проводили согласно Европейской директиве 2010/63/EU [10] на 14-, 21- и 42-й день после начала приема тибетского лекарственного средства «диг-да-штан» и препарата холосас.

Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Г.А. Меркулову [11] и исследовали под разным увеличением микроскопа

фирмы Motic с камерой видеозахвата.

Определяли митотический индекс (МИ), количество двуядерных и гипертрофированных гепатоцитов, число купферовских клеток, холангиоцитов и эндотелиоцитов.

По содержанию свободного оксипролина судили о степени фиброза органа [12].

Статистическая обработка проведена согласно общепринятым методикам.

Результаты исследований и их обсуждение. Гистологическая картина экспериментального хронического токсического CCl_4 -гепатита у крыс через 2 месяца после затравки CCl_4 характеризуется выраженной сосудистой гиперемией, умеренной клеточной инфильтрацией и атрофией гепатоцитов. На фоне расширенных синусоидных капилляров отмечено разрастание стромы органа к центральной вене дольки печени [13] (рис. 1).

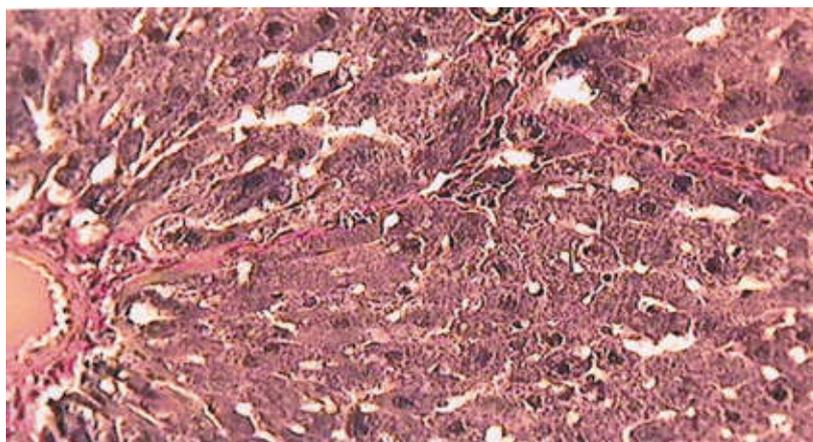


Рисунок 1. Морфологическая картина печени крысы через 2 месяца после затравки CCl_4 . Ван Гизон. 40x10

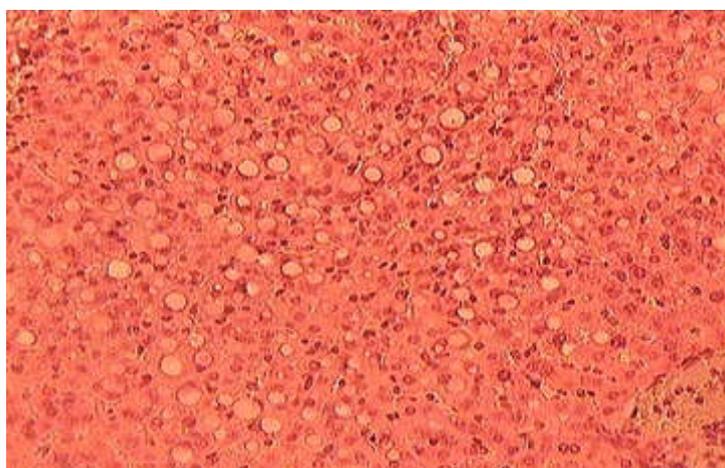


Рисунок 2. Жировая инфильтрация печени. Контроль. 21-е сутки эксперимента. Гематоксилин и эозин. 20x10

Отмечены фиброзные изменения соединительной ткани в сочетании с белковой дистрофией гепатоцитов. Дистрофические изменения переходят в некроз, в зоне которого выявлены тельца Маллори. Отмечена средне- и мелкокапельная жировая инфильтрация печени [14] (рис. 2).

В ходе экспериментов установлено, что на фоне фармакотерапии тибетским лекарственным средством структурно-метаболические нарушения в печени выявлялись в значительно меньшей степе-

ни, чем в контроле.

Гистологическим исследованием материала, полученного от животных первой группы, на 14-е сутки применения испытуемого препарата характеризовались уменьшением площади лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрации (в 1,8 раза) и некроза (в 5,6 раза). Отмечено снижение количества пролиферирующих фибробластов (рис. 3). Данные приведены по сравнению с контролем.

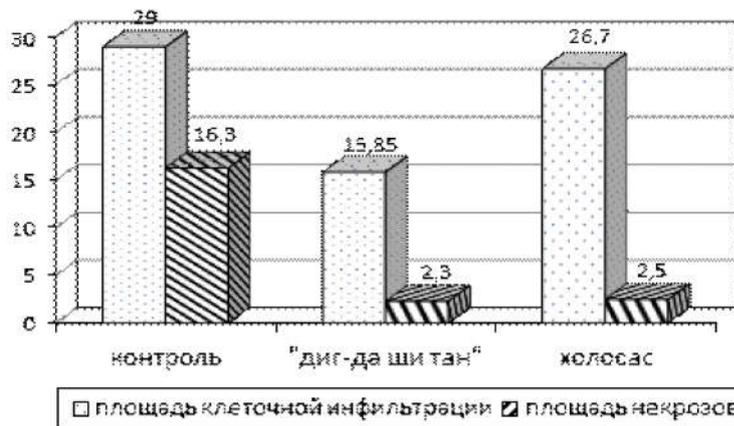


Рисунок 3. Морфометрические показатели печени крыс первой опытной группы. 14-е сутки эксперимента

Гистологическая картина печени крыс первой группы на 21-е сутки эксперимента характеризовалась прогрессирующим уменьшением лимфоидно-гистиоцитар-

ной инфильтрации. Дегенеративные изменения гепатоцитов не отмечались. На этом фоне отмечено уменьшение фиброза (рис. 4).



Рисунок 4. Морфометрические показатели печени крыс первой опытной группы. 21-е сутки эксперимента

Показатели содержания свободного оксипролина в гомогенате органа служат индикатором степени фиброза. Полученные данные представлены рисунком 5.

У животных первой группы установлено уменьшение содержания оксипролина на всех этапах эксперимента в сравнении с контролем. Так, 14-е сутки эксперимента

характеризовались его снижением до 68,4 мг/%, 21-е – до 55,4 мг/% и 42-е сутки – до 42,1 мг/% соответственно. Соот-

ветствующие показатели у животных второй группы составили 91,5 мг/%, 78,3 мг/% и 67,3 мг/%.

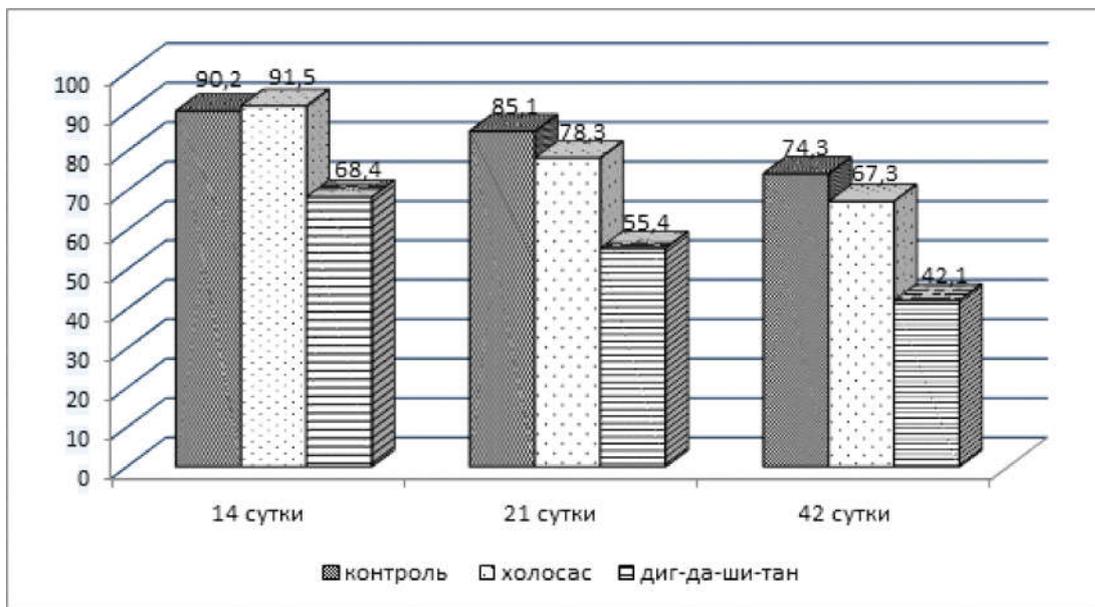


Рисунок 5. Динамика содержания оксипролина в гомогенатах печени крыс, мг/% ($M \pm m$; $n=7$)

Митотическая активность испытуемого препарата подтверждается гистологическим исследованием материала, проведенного при увеличении микроскопа

90x10. Выявленные нами изменения на 42-й день эксперимента представлены рисунком 6.

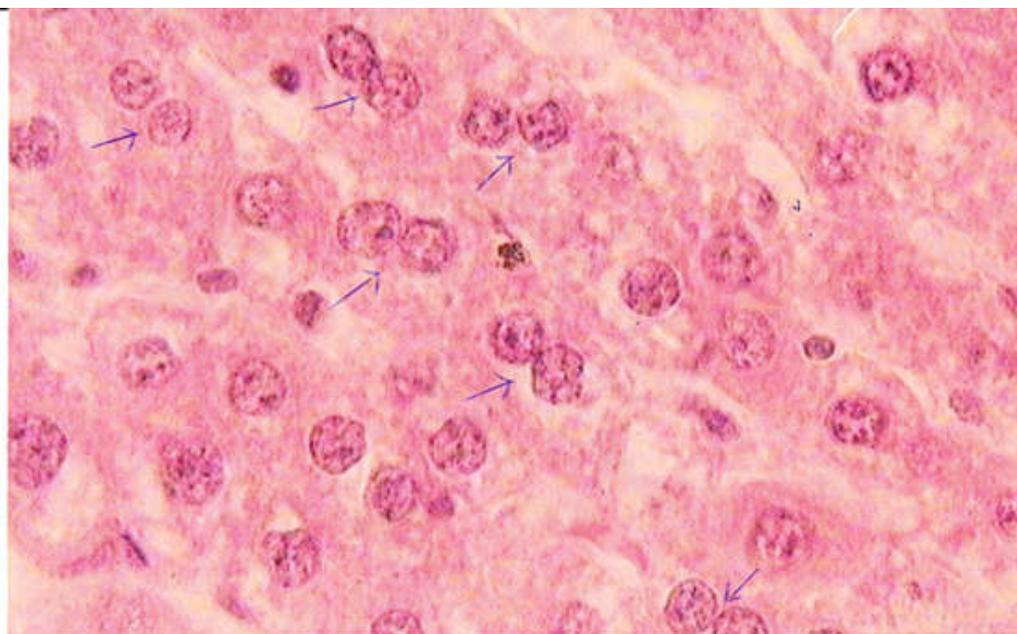


Рисунок 6. Митотическая активность гепатоцитов. Гематоксилин-эозин. 90x10

Общее количество митозов и число гипертрофированных клеток показано в таблице 1, из которой следует, что эффективность испытуемого препарата в со-

ставлении с препаратом сравнения оказалась выше. При этом, наибольшая регенераторная активность отмечена на 14-е и 21-е сутки исследований.

Таблица 1 – Регенеративная активность препаратов диг-да-ши-тан и холосас (M ± m; n=10)

Сроки исследования (сутки)	Общее количество митозов			Число гипертрофированных клеток		
	Условия опыта					
	Контроль (CCl ₄)	CCl ₄ + холосас	CCl ₄ + диг-да-ши-тан	Контроль (CCl ₄)	CCl ₄ + холосас	CCl ₄ + диг-да-ши-тан
14-е	2,0 ± 0,33	2,9 ± 0,9	4,7 ± 0,39*	27,7 ± 3,13	37,0 ± 2,0*	49,3 ± 6,24*
21-е	2,3 ± 0,23	3,2 ± 0,19	7,0 ± 0,47*	24,0 ± 0,33	42,0 ± 2,7*	37,0 ± 2,23*
42-е	2,7 ± 0,7	1,0 ± 0,17	1,6 ± 0,43	21,0 ± 1,8	29,0 ± 3,0	25,0 ± 2,0*

Анализируя результаты, приведенные в таблице, была установлена обратная зависимость между митотической активностью и числом гипертрофированных клеток в начальные сроки исследования, что свидетельствует о чередовании клеточной и внутриклеточной регенерации [15, 16].

Заключение. Результаты морфологических и гистохимических исследований показали более высокое противовоспалительное и регенераторное действие испытуемого препарата «диг-да-ши-тан» при хроническом токсическом гепатите у крыс по сравнению с препаратом холосас, что позволяет рекомендовать его применение в практических условиях.

Список источников

1. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению фиброза и цирроза печени и их осложнений / В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская, М.С. Жаркова и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2021. № 31(6). С 56-102. EDN: GMKWTQ. doi: 10.22416/1382-4376-2021-31-6-56-102
2. Подымова С.Д. Печеночная энцефалопатия, связанная с циррозом печени. Современные подходы к патогенезу, клинике, лечению // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2017. (11). С. 4-12. EDN: QJMNCH
3. Дударев В.А., Фокин Д.В. Экспериментально морфологическое обоснование стимуляции регенерации печени // Международный журнал экспериментального образования. 2014. № 8-3. С. 112-113.
4. Плеханов А.Н., Товаршинов А.И. Регенерация печени: решенные и проблемные вопросы // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2020. (11). С. 101-106. EDN: REAMLW. doi: 10.17116/hirurgia2020111101
5. Tanaka M., Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation // Inflamm Regen. 2016. Oct. doi: 10.1186/s41232-016-0025-2
6. Michalopoulos George K. Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis // Compr Physiology. 2013 Jan; 3:485-513. doi: 10.1002/cphy.c120014
7. Коробейникова Е.П., Комарова Е.Ф. Лабораторные животные - биомодели и тест-системы в фундаментальных и доклинических экспериментах в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (НЛП/GLP) // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2016. №1. С. 30-36. EDN: WCBTUF
8. Миронов Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва : Минздрав РФ ЗАО ИИА «Ремедиум». 2012. С. 710-718.
9. Баторова С.М., Яковлев Г.Я., Асеева Т.А. Справочник лекарственных растений традиционной тибетской медицины. Новосибирск: Наука, 2013. 292 с.
10. EuroScience supports Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. EuroScience. 2015. Archived from the original on 10 April 2021. Retrieved 18 May 2016.
11. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники / 5-е изд., испр. и доп. Ленинград: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1969. 423 с.
12. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Пер. с англ. Н. Абросимовой, А. Баева, Ю. Васильева, Т. Венкстерна, Н. Райхлина, Р. Татарской. Москва : Изд-во иностранной литературы, 1962. 966 с.
13. Убашеев О.И. Оценка влияния антигепатотоксического средства на регенерацию печени при хроническом токсическом гепатите у белых крыс // Вестник Бурятского государственного университета. 2017. № 1. С. 50-56. EDN: XPTXGP
14. Убашеев О.И. Стимуляция растительным комплексом полифитохолл восстановительных процессов в печени поросят при остром токсическом гепатите // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В. Р. Филиппова. 2014. № 3 (36). С. 136-140. EDN: SMSZVF
15. Романова Л.П., Малышева И.И. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после

механической травмы в раннем онтогенезе у крыс // Вестник Чувашского университета. 2011. No 3. С. 398–402.

16. Блинкова Н.Б., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Полиплоидия гепатоцитов в регенерации печени при хроническом гепатите у пациентов из разных возрастных групп. Екатеринбург, 2017. 106 с.

References

1. Ivashkin V.T., Maevskaya M.V., Zharkova M.S., Zhigalova S.B., Kitsenko E.A., Manukyan G.V., Trukhmanov A.S., Maev I.V., Tikhonov I.N., Deeva T.A. Clinical Recommendations of the Russian Scientific Liver Society and Russian Gastroenterological Association on Diagnosis and Treatment of Liver Fibrosis, Cirrhosis and Their Complications. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2021;31(6):56-102 (In Russ.). doi: 10.22416/1382-4376-2021-31-6-56-102

2. Podymova S.D. Hepatic encephalopathy associated with cirrhosis of the liver. Modern approaches to pathogenesis, clinic, treatment. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2017;11:4-12 (In Russ.)

3. Dudarev V.A., Fokin D.V. Experimental morphological substantiation of stimulation of liver regeneration. *International Journal of Experimental Education*. 2014;8(3):112-113 (In Russ.)

4. Plekhanov A.N., Tovarshinov A.I. Liver regeneration: solved and problem issues. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2020;(11):101-106 (In Russ.). EDN: REAMLW. doi: 10.17116/hirurgia2020111101

5. Tanaka M., Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm Regen*. 2016 Oct. doi: 10.1186/s41232-016-0025-2

6. George K. Michalopoulos. Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis. *Compr Physiology*. 2013 Jan;3:485-513. doi: 10.1002/cphy.c120014

7. Korobeynikova E.P. Komarova E.F. Laboratory animals - biomodels and test systems in fundamental and preclinical experiments according to the good laboratory practice (glp) standards. *Journal of Fundamental Medicine and Biology*. 2016;1:30-36 (In Russ.)

8. Mironov R.U. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. M: Ministry of Health of the Russian Federation. Remedium. 2012;710-718 (In Russ.)

9. Batorova S.M., Yakovlev G.P., Aseeva T.A. Handbook of medicinal plants of traditional Tibetan medicine. Novosibirsk: Nauka, 2013. P. 292 (In Russ.)

10. EuroScience supports Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes". *EuroScience*. 2015. Archived from the original on 10 April 2021. Retrieved 18 May 2016.

11. Merkulov G.A. Course of pathological-histological technique. 5th ed., Leningrad: Medicine. Leningr. Department, 1969. P. 423 (In Russ.)

12. Pearce E. Histochemistry theoretical and applied. Translated from English by N. Abrosimova, A. Baev, Y. Vasiliev, T. Venkstern, N. Reichlin, R. Tatarskaya. Moscow: 1962. P. 966.

13. Ubasheev O.I. Evaluation of the effect of an antihepatotoxic agent on liver regeneration in chronic toxic hepatitis in white rats. *Bulletin of the Buryat State University*. 2017;1:50-56 (In Russ.)

14. Ubasheev O.I. Stimulation by a vegetable complex polifitohol recovery processes in a liver of pigs at acute toxic hepatitis. *Vestnik of Buryat State Academy of Agriculture named after V. Philippov*. Ulan-Ude. 2014;3(36):136-140 (In Russ.)

15. Romanova L.P., Malysheva I.I. Role of dinuclear hepatocytes in liver regeneration after mechanical trauma in early ontogenesis in rats. *Bulletin of Chuvash University*. 2011;3:398-402 (In Russ.)

16. Blinkova N.B., Sazonov S.V., Leontiev S.L. Polyploidy of hepatocytes in liver regeneration for chronic hepatitis in patients from different age group. Unica, Yekaterinburg. 2017;P.106 (In Russ.)

Информация об авторах

Олег Иннокентьевич Убашеев – кандидат биологических наук, ст. преподаватель кафедры «Терапия, клиническая диагностика, акушерство и биотехнология», helge5@rambler.ru;

Наталья Викторовна Мантатова – доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой «Терапия, клиническая диагностика, акушерство и биотехнология», mannat75@yandex.ru

Information about the authors

Oleg I. Ubasheev – Candidate of Science (Biology), Senior Lecturer, Chair of Therapy, Clinical Diagnostics, Obstetrics and Biotechnology, helge5@rambler.ru;

Natalia V. Mantatova – Doctor of Science (Veterinary), Professor, Head of the Chair of Therapy, Clinical Diagnostics, Obstetrics and Biotechnology,

Статья поступила в редакцию 06.11.2024; одобрена после рецензирования 22.11.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 06.11.2024; approved after reviewing 22.11.2024; accepted for publication 26.11.2024.