



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.28.1.010>
УДК [615.276+615.415.16+582.991.15]:616.1/4-092.9



Сушинская О.А., Голяк Н.С., Неровня А.М.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Морфологическая оценка внутренних органов крыс при исследовании кожно-резорбтивного действия комбинированного спрея, содержащего ибупрофен и жидкий экстракт полыни

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Сушинская О.А. – проведение эксперимента, обработка экспериментальных данных, написание текста; Голяк Н.С. – идея, написание текста, редактирование статьи; Неровня А.М. – проведение эксперимента, обработка экспериментальных данных, редактирование статьи.

Финансовая поддержка. Работа выполнена в рамках ГПНИ 2 – Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия – подпрограммы 2.2. – Синтез и направленное модифицирование регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы) – задания 2.2.3. – Получить и стандартизировать экстракционные лекарственные формы с повышенным содержанием биологически активных веществ (№ государственной регистрации 20220401 от 30.03.2022).

Подана: 08.01.2025

Принята: 10.02.2024

Контакты: sushinskayaoa@gmail.com

Резюме

Цель. Морфологическая характеристика внутренних органов крыс при исследовании кожно-резорбтивного действия комбинированного спрея, содержащего ибупрофен и жидкий экстракт полыни.

Материалы и методы. Исследуемые объекты – жидкий экстракт полыни горькой 1:1 и комбинированный спрей, содержащий ибупрофен (5%) и жидкий экстракт полыни горькой (10%). Кожно-резорбтивное действие оценивали в течение 21 дня методом кожных аппликаций в соответствии с Инструкцией 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ». Для оценки макроскопического состояния внутренних органов крыс (легкие, сердце, печень, почки, желудок, селезенка, надпочечники, головной мозг, кожные покровы вне места и в месте орошения растворами) проводилась их аутопсия с дальнейшим патоморфологическим исследованием.

Результаты. Результаты морфологической оценки показали отсутствие выраженных, обусловленных наружным действием жидкого экстракта полыни горькой и комбинированного спрея на его основе признаков токсического поражения внутренних органов лабораторных животных по истечении 21 дня эксперимента. Имеются единичные случаи морфологических изменений, связанные в основном с терминальным периодом состояния крыс.

Заключение. Комбинированный спрей противовоспалительного действия для наружного применения, содержащий ибупрофен (5%) и жидкий экстракт полыни горькой (10%), может считаться безопасным при многократных наружных аппликациях. Это создает возможность его применения не только при острых воспалительных заболеваниях или синдроме острой боли, но и длительно в терапии хронических заболеваний.

Ключевые слова: спрей, ибупрофен, жидкий экстракт, полынь горькая, гистологическая оценка органов

Olga A. Sushinskaya, Natalya S. Golyak, Alexander M. Nerovnya
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Morphological Evaluation of Rat Internal Organs in the Study of Skin-Resorptive Effect of Combined Spray Containing Ibuprofen and Liquid Extract of Wormwood

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Olga A. Sushinskaya – conducting the experiment, experimental data processing, text writing; Natalya S. Golyak – idea, text writing, article editing; Alexander M. Nerovnya – conducting the experiment, experimental data processing, article editing.

Financial support. The work was carried out within the framework of State research program 2 – Chemical processes, reagents and technologies, bioregulators and biochemistry - subprogram 2.2. – Synthesis and directed modification of bioprocesses regulators (Bioregulators) – tasks 2.2.3. – Obtain and standardize extraction dosage forms with increased content of biologically active substances (No. of state registration 20220401 from 30.03.2022).

Translated with DeepL.com (free version)

Submitted: 08.01.2025

Accepted: 10.02.2025

Contacts: sushinskayaoa@gmail.com

Abstract

Purpose. The morphological characteristics of the internal organs of rats in the study of the skin-resorptive effect of a combined spray containing ibuprofen and liquid wormwood extract.

Materials and methods. The studied objects are liquid extract of wormwood 1:1 and a combined spray containing ibuprofen (5%) and liquid extract of wormwood (10%). The skin-resorptive effect was evaluated by the method of skin applications in accordance with the Instructions 1.1.11-12-35-2004 "Requirements for setting up experimental studies for primary toxicological assessment and hygienic regulation of substances" for 21 days. To assess the macroscopic condition of the internal organs of rats (lungs, heart, liver, kidneys, stomach, spleen, adrenal glands, brain, skin outside the site and at the site of irrigation with solutions), their autopsy was performed with further pathomorphological examination.

Results. The results of the morphological assessment showed the absence of pronounced signs of toxic damage to the internal organs of laboratory animals due to the external action of liquid extract of wormwood and a combined spray based on it after 21 days of the experiment. There are isolated cases of morphological changes caused mainly by the terminal period of the condition of rats.

Conclusion. A combined anti-inflammatory spray for external use containing ibuprofen (5%) and liquid extract of wormwood (10%) it can be considered safe for multiple external applications. This makes it possible to use it not only for acute inflammatory diseases or acute pain syndrome, but also for long-term use in the treatment of chronic diseases.

Keywords: spray, ibuprofen, liquid extract, wormwood, histological assessment of organs



■ ВВЕДЕНИЕ

Доказательная оценка безопасности лекарственных препаратов (ЛП) – один из важнейших этапов в их фармацевтической разработке. Клинико-лабораторные исследования (гематологические, биохимические и гистологические) являются главными при изучении токсичности и кожно-резорбтивного действия наружных ЛП. Особенно важной становится данная оценка при разработке комбинированных препаратов, содержащих как синтетический, так и растительный компоненты [1].

Оценка безопасности ЛП, содержащих растительный компонент, должна учитывать все потенциальные факторы риска, специфичные для данной группы. Среди основных причин риска применения растительных препаратов, в том числе комбинированных, в медицинской и фармацевтической практике Всемирная организация здравоохранения выделяет возможность загрязнения лекарственного растительного сырья потенциально токсичными веществами, такими как тяжелые металлы, пестициды, радионуклиды. Кроме того, это могут быть экстрагенты, используемые в производстве экстракционных препаратов из растительного сырья, а также остаточные органические растворители. Резорбтивные свойства проявляют и растворители, необходимые при разработке жидких лекарственных средств, многие из которых являются пенетрантами и могут усиливать проницаемость кожи и чрескожную абсорбцию действующих веществ.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическая характеристика внутренних органов крыс при исследовании кожно-резорбтивного действия комбинированного спрея, содержащего ибупрофен и жидкий экстракт полыни.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые объекты – жидкий экстракт полыни горькой 1:1 и комбинированный спрей, содержащий ибупрофен (5%) и жидкий экстракт полыни горькой (10%). Кожно-резорбтивное действие оценивали методом кожных аппликаций в соответствии с Инструкцией 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ». У лабораторных животных выривали с обеих сторон кожные окошки размером 4×4 см (16 см²), на правое окошко наносили исследуемый препарат, левое окошко служило контролем [2].

Для оценки макроскопического состояния внутренних органов крыс после 21 дня эксперимента проводилась их аутопсия. Затем гистологически были исследованы органы (легкие, сердце, печень, почки, желудок, селезенка, надпочечники, головной мозг, кожные покровы вне места и в месте орошения растворами) 40 экспериментальных животных из 4 групп.

Первая группа – контрольная 1 (орошение водой, маркировка животных самцов – ♂К с номерами с 1-го по 5-й, для самок – ♀К 1–5-й соответственно), вторая группа – контрольная 2 (получала плацебо, маркировка животных самцов – ♂П с номерами с 1-го по 5-й, для самок – ♀П 1–5-й соответственно), третья группа – испытуемая 1 (получала экстракт, маркировка животных самцов – ♂Э с номерами с 1-го по 5-й, для самок – ♀Э 1–5-й соответственно), четвертая группа – испытуемая 2 (получала спрей, маркировка животных самцов – ♂С с номерами с 1-го по 5-й, для самок – ♀С 1–5-й соответственно).

Фрагменты органов для гистологического исследования хранились в пластиковых емкостях в растворе забуференного 10%-ного нейтрального формалина (рН=7,2). Полученные после вырезки образцы обезжовивались в спиртах возрастающей концентрации (70–96%). Затем образцы помещались в жидкий парафин. Проводка в спиртах и парафине осуществлялась в тканевом процессоре Leica TP 1020 (Германия) с последующим изготовлением парафиновых блоков на автоматизированной станции заливки Leica EG 1160 (Германия). Из всех парафиновых блоков были выполнены гистологические срезы толщиной 3–4 мкм. Препараты окрашивались гематоксилином и эозином. С использованием полнослайдового гистологического сканера Motic EASYS CAN PRO (Motic, КНР) выполнены цифровые сканы гистологических препаратов, анализ которых и видеозахват полей зрения для иллюстративного материала осуществлялся в программе Aperio ImageScope (Leica, Германия).

Постановка экспериментального исследования осуществлена в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза, а также в соответствии с Инструкцией 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ» [2–5].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патоморфологические изменения внутренних органов и кожных покровов, за исключением единичных животных, всех 4 серий при сравнительном исследовании не отличались между собой и представлены в виде единого гистологического описания. Также не было выявлено различий в зависимости от пола экспериментальных животных.

Кожные покровы. Кожа покрыта многослойным плоским эпителием с явлениями орто- и гиперкератоза. В дерме определяется большое количество сально-волосяных фолликулов. Дерма с гистологическими изменениями по типу отека. Воспалительные, атрофические и склеротические изменения в дерме в месте введения препарата у изученных животных не выявлены. Прилежащий к дерме мышечный лоскут представлен пучками скелетной мускулатуры, разделенными тонкими прослойками соединительной ткани с полнокровными сосудами и умеренно выраженным отеком. Кожные покровы в зоне орошения и вне ее имели одинаковое строение (рис. 1).

Головной мозг. Гистоархитектоника коры и подлежащего белого вещества полушарий, гиппокампа имеет нормальное строение. Кора головного мозга представлена 6 слоями нервных клеток (молекулярным, наружным зернистым, наружным пирамидным, внутренним зернистым, внутренним пирамидным полиморфным). Отмечаются гистологические признаки умеренно выраженных острых дисциркуляторных изменений: венозное полнокровие сосудов, очаговые свежие диапедезные кровоизлияния, периваскулярный и перицеллюлярный отек мозга. Наблюдаются острые ишемические повреждения единичных нейронов в их гиперхромии с конденсацией цитоплазмы и цитолизом с появлением «клеток-теней». Подобные изменения возникли, наиболее вероятно, в агональный период при эвтаназии животных.

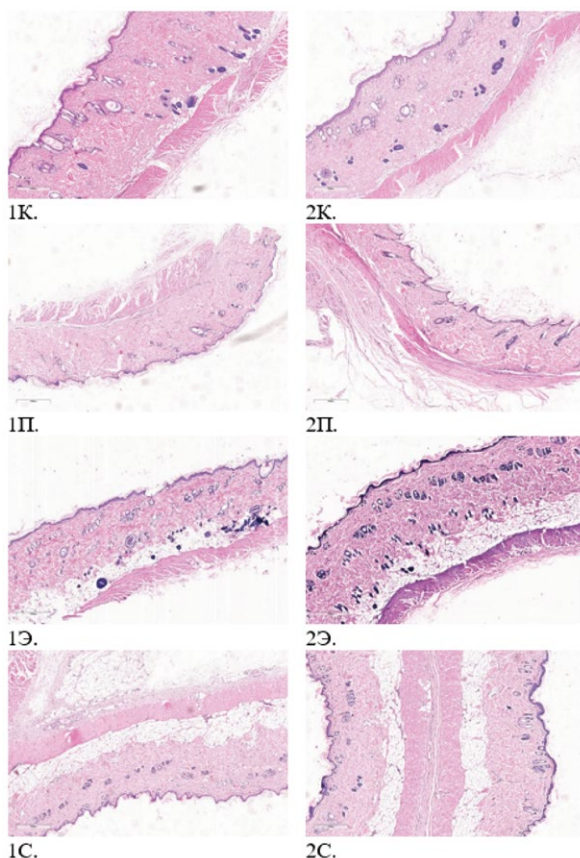


Рис. 1. Фрагменты кожных покровов контрольных и экспериментальных животных. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение абсолютное $\times 4$. Нечетные номера – кожные покровы вне зоны орошения, четные – из зоны орошения. К – контрольная первая группа, П – контрольная вторая группа, Э – испытуемая первая группа, С – испытуемая вторая группа
Fig. 1. Fragments of the skin of control and experimental animals. Stained with hematoxylin and eosin. The magnification is absolute $\times 4$. Odd numbers – skin outside the irrigation zone, even numbers – from the irrigation zone. K is the control first group, P is the control second group, E is the test first group, C is the test second group

Каких-либо признаков предшествующих патологических изменений нейронов и глии при исследовании не обнаружено. Также отсутствовали признаки воспаления и тромбообразования в сосудах головного мозга (рис. 2).

У одного животного (♂K3) в белом веществе полушарий мозга были выявлены спонгиозные изменения ткани головного мозга (рис. 3), развитие которых, как правило, связывают с деструкцией миелина самой разнообразной этиологии (гипоксической, инфекционной).

Легкие. Слизистая бронхов выстлана реснитчатым эпителием, состоящим из высоких призматических клеток, среди которых хорошо различимы реснитчатые, бокаловидные и базальные клетки. В состав слизистой крупных и средних бронхов входит

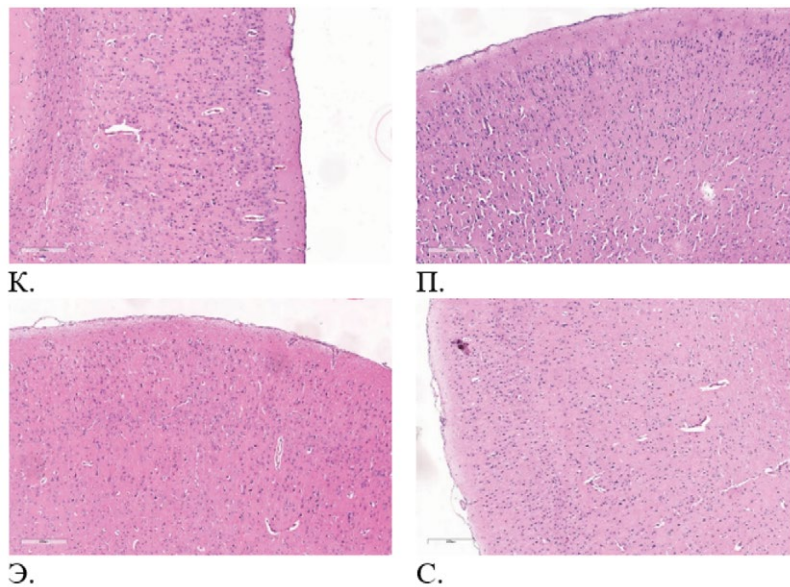


Рис. 2. Ткань полушарий головного мозга животных 4 групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$
Fig. 2. The tissue of the cerebral hemispheres of animals of four groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 10$

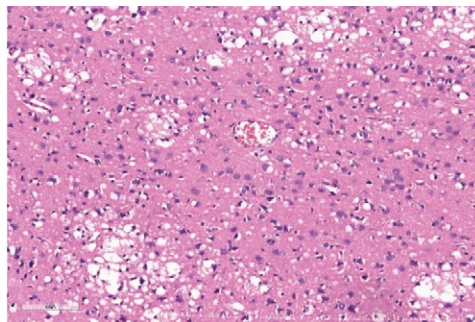


Рис. 3. Спонгиозные изменения ткани головного мозга животного ♂К3. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$
Fig. 3. Spongiform changes in animal brain tissue ♂К3. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 20$

лимфоидная ткань в виде скоплений лимфоидных фолликулов и межфолликулярных лимфоцитов. Часть фолликулов имеет гомогенное строение за счет преобладания в них мономорфных малых лимфоцитов; в части, имеющей больший диаметр, присутствуют крупные светлые зародышевые центры с признаками фагоцитоза в макрофагах. Респираторный отдел имеет ацинарное строение, представленное системой респираторных бронхиол, альвеолярных ходов и альвеол, которые заполнены

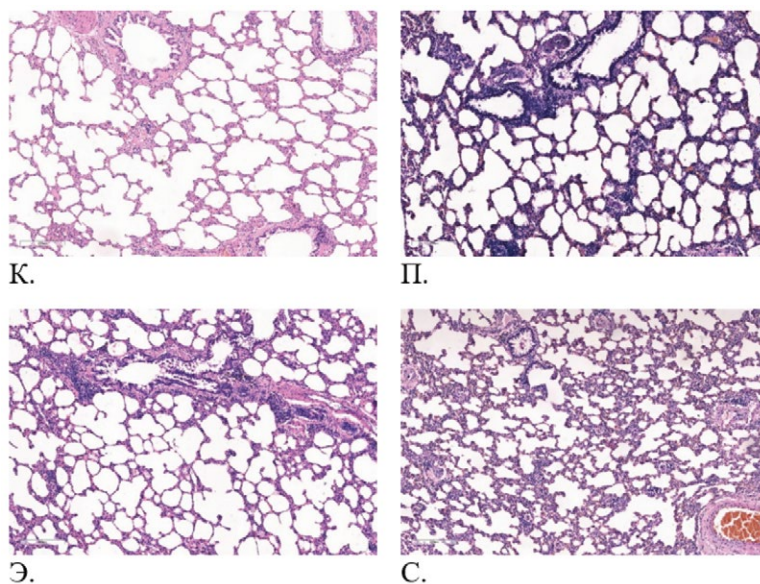


Рис. 4. Ткань легких животных 4 групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$
Fig. 4. Lung tissue of animals of four groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 10$

воздухом, в отдельных местах разорваны, с формированием гистологической картины эмфизематозных изменений. Также отмечаются мелкие фокусы дис- и ателектазов. В просвете некоторых альвеол встречаются десквамированные, увеличенные в размерах, с пенистой цитоплазмой альвеолярные клетки. В стенках респираторных альвеол, в том числе и периваскулярно, встречаются единичные лимфоциты. Сосуды легких расширены, полнокровные, без перестройки стенки мелких ветвей легочной артерии. Гистологических признаков тромбообразования в сосудах не установлено (рис. 4).

Сердце. Эндокард выстлан уплощенными эндотелиальными клетками, которые располагаются на поверхности базальной мембраны. Субэндокардиальные отделы представлены тонкими прослойками соединительной ткани с полнокровными сосудами. Миокард представлен кардиомиоцитами, которые образуют мышечные пучки, состоящие из продолговатых прямоугольных клеток мономорфного строения с центрально расположенным одним, реже двумя, ядром овальной формы. Миоплазма эозинофильная, поперечная исчерченность сохранена в большинстве клеток, лишь в отдельных кардиомиоцитах имеются нарушения исчерченности в виде сочетания утолщенных, резко эозинофильных полос сокращения при отсутствии исчерченности на соседних участках миоцита. Данные изменения, известные также под названием контрактурных повреждений миокарда, по степени выраженности относятся к обратимым и указывают на изменения миокарда в терминальном периоде. Окружающая мышечные волокна строма полнокровна, с очаговым, слабо выраженным периваскулярным отеком (рис. 5).

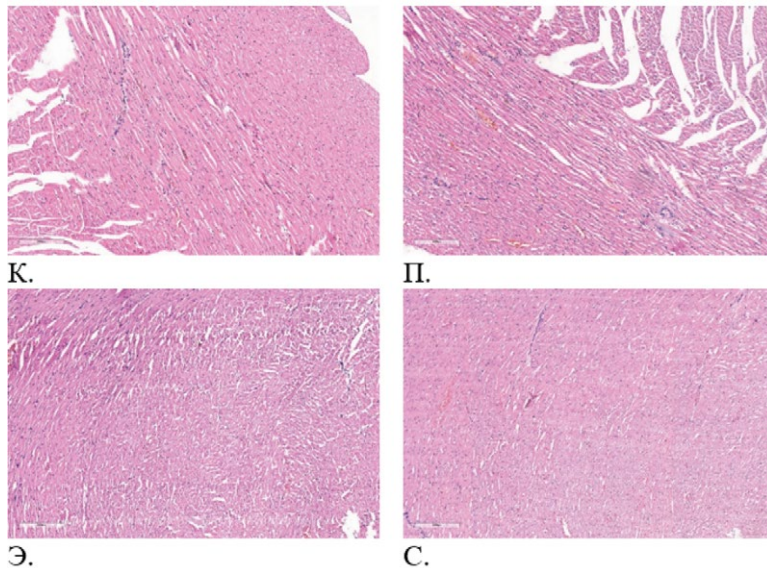


Рис. 5. Миокард животных 4 исследуемых групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$
Fig. 5. Myocardium of animals of the four studied groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 10$

Висцеральный перикард выстлан мезотелием. Под мезотелием находится соединительнотканная основа из рыхлой волокнистой соединительной ткани, скопления липоцитов.

Печень. Строение печени не нарушено, с хорошо различимыми дольками. Печеночные дольки имеют полигональную форму, гепатоциты в них располагаются рядами и направляются от периферии дольки к центральной вене. Гепатоциты в подавляющем большинстве случаев имеют многогранную форму с четким ядром. Между гепатоцитами располагаются тонкие синусоиды. Портальные тракты треугольной или полигональной формы со слабо выраженным соединительнотканным компонентом содержат в составе триад мелкие артериальные и венозные сосуды, а также желчные протоки. Признаков фиброза нет. Вены в портальных трактах имеют тонкую стенку и широкий просвет, внутренняя поверхность стенки выстлана эндотелием. Артерии портальных трактов имеют узкий просвет и более толстую стенку. Желчные протоки выстланы кубическим эпителием. В портальных трактах определяются единичные круглоклеточные элементы (рис. 6).

Центральные вены широкие, заполнены свободно лежащими или агрегированными эритроцитами. Гепатоциты портальной зоны с эозинофильной цитоплазмой, гепатоциты централобулярной и интермедиарной зон со светлой зернистой цитоплазмой. В части гепатоцитов имеется два ядра.

В одном случае у животного ♀П1 отмечена умеренно выраженная круглоклеточная инфильтрация портальных трактов и очаговые круглоклеточные воспалительные пролифераты в печеночной паренхиме.

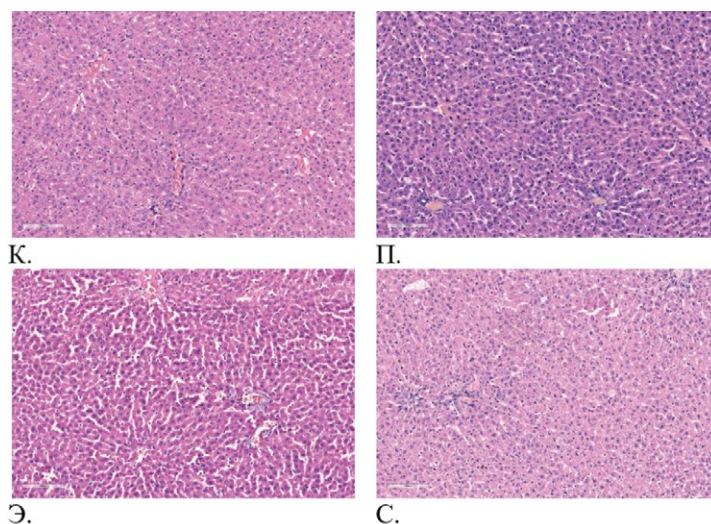


Рис. 6. Печень животных 4 исследуемых групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$
Fig. 6. Liver of animals of four study groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 20$

Почки. Разделение на корковый и мозговой слои отчетливое. В коре содержатся равномерно расположенные основные структуры нефронов, включающие почечные тельца, их капсулы, проксимальные и дистальные отделы, представленные извитыми канальцами нефрона. Сосудистые клубочки, образованные кровеносными капиллярами, умеренно полнокровны, просвет капсул свободен (рис. 7).

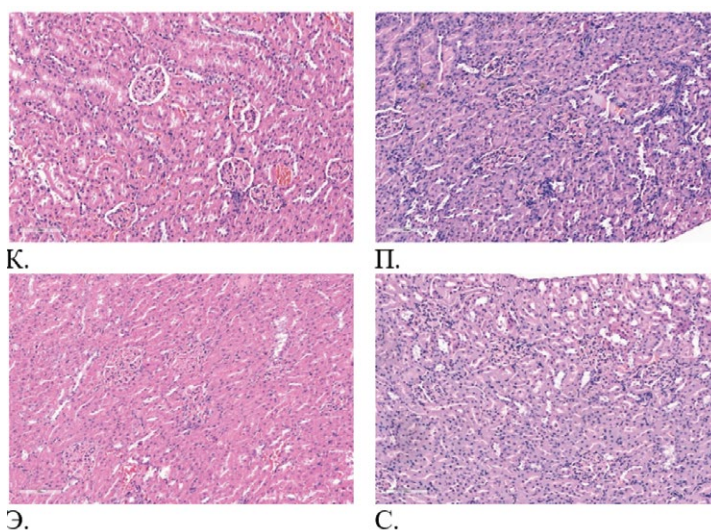


Рис. 7. Почки животных 4 исследуемых групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$
Fig. 7. Kidneys of animals from four study groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 20$

Проксимальные отделы извитых канальцев образованы высоким цилиндрическим каемчатым эпителием, извитые канальцы дистального отдела нефрона образованы цилиндрическим эпителием, лишенным щеточной каемки. Петли нефронов, расположенные в мозговом слое, состоят из светлых плоских эпителиальных клеток. Собираательные трубки многочисленные, распределены равномерно, выстланы однослойным кубическим и цилиндрическим эпителием, цитоплазма большинства клеток светлая. Сосуды почек умеренно полнокровны, что наиболее выражено в юкстамедуллярной зоне.

Желудок. Железистая часть слизистой оболочки покрыта однослойным железистым эпителием без признаков повреждения и десквамации. Желудочные ямки обычной глубины, выстланы уплощенным эпителием. Железы по размеру и клеточному составу соответствуют норме, содержат обычные по строению главные и обкладочные клетки (рис. 8).

В подслизистой определяются лимфоциты, плазматические клетки, эозинофильные лейкоциты, располагающиеся в виде одиночных клеток или мелких групповых скоплений. Безжелезистая часть слизистой желудка покрыта многослойным плоским эпителием с явлениями ороговения. В собственной пластинке и подслизистой определяются единичные макрофаги, лимфоциты и сегментоядерные лейкоциты. На границе железистой и безжелезистой (фундальной) частей слизистой определяется эпителиальный гребень.

Селезенка. Капсула селезенки состоит из плотной соединительной ткани, от которой внутрь отходят соединительнотканые анастомозирующие между собой тяжи –

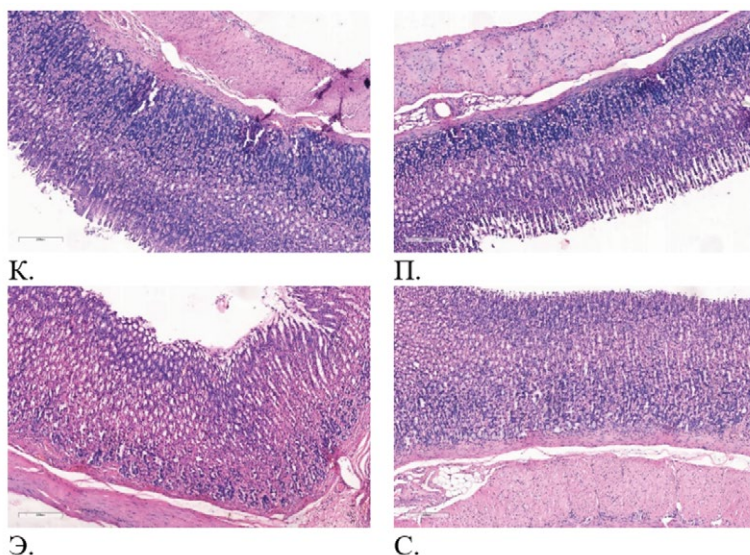


Рис. 8. Слизистая желудка (железистая часть) животных 4 исследуемых групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$
Fig. 8. Gastric mucosa (glandular part) animals of the four study groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 10$

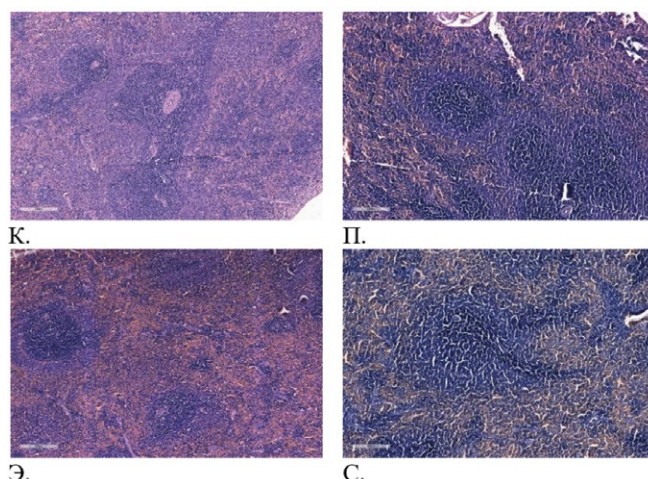


Рис. 9. Селезенка животных 4 исследуемых групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$
Fig. 9. The spleen of the animals of the four study groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 10$

трабекулы селезенки. Белая пульпа представлена лимфоидной тканью расположенных периартериально в виде шаровидных или вытянутых образований лимфатических фолликулов селезенки с различимыми в них центрами размножения, мантийной и маргинальной зонами. Красная пульпа состоит из большого количества эритроцитов, содержит также макрофаги и небольшое количество лимфоцитов. В красной пульпе встречаются единичные гранулы гемосидерина (рис. 9).

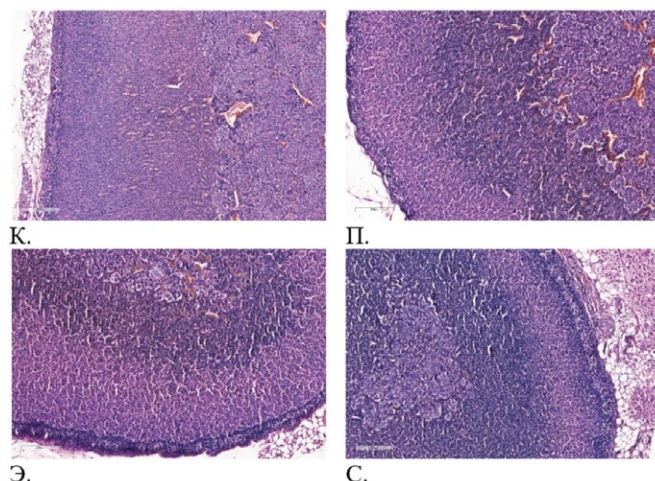


Рис. 10. Надпочечники животных 4 исследуемых групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$
Fig. 10. The adrenal glands of the animals of the four studied groups. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 10$

Надпочечники. Во всех наблюдениях строение коркового и мозгового слоев было сохранено. Деление коркового слоя на клубочковую, пучковую и сетчатую зоны визуализировалось четко. Корковое вещество клубочковой, пучковой и сетчатой зон состоит из эпителиальных тяжей, разделенных нежными прослойками соединительной ткани. Мозговое вещество представлено сравнительно крупными округлыми клетками, расположенными между кровеносными сосудами. Определялось очаговое полнокровие сосудов, преимущественно в мозговом слое (рис. 10).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты патологоанатомических и гистологических исследований показали отсутствие выраженных, обусловленных наружным действием жидкого экстракта полыни горькой и комбинированного спрея на его основе признаков токсического поражения внутренних органов лабораторных животных по истечении 21 дня эксперимента. Имеются единичные случаи морфологических изменений в головном мозге животных как контрольных, так и испытываемых групп, возникающие в агональный период при эвтаназии крыс.

Комбинированный спрей противовоспалительного действия для наружного применения, содержащий ибупрофен (5%) и жидкий экстракт полыни горькой (10%), может считаться безопасным при многократных наружных аппликациях. Это обуславливает возможность его применения не только при острых воспалительных заболеваниях или синдроме острой боли, но и длительно в терапии хронических заболеваний.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sushinskaya O.A., Golyak N.S. Assessment of the locally irritating and skin-resorptive effects of liquid wormwood extract and a combined spray based on it. *Vestnik VGMU*. 2024;3(23):69-78. doi. org/10.22263/2312-4156.2024.3.69 (in Russian)
2. Resolution No. 131 of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus dated December 14, 2004 on approval of the Instruction 1.1.11-12-35-2004 "Requirements for setting up experimental studies for primary toxicological assessment and hygienic regulation of substances". Available at: https://minzdrav.gov.by/upload/lcfiles/text_tnpa/Инструкция_1.1.11-12-35-2004.pdf
3. Resolution No. 131 of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus dated October 31, 2006 on the approval of sanitary Rules and Regulations 2.1.2.12-18-2006 "Design, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)". Available at: http://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/000349_92043_Gigiena_2136_2006.doc
4. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Available at: <https://rm.coe.int/168007a67b>
5. Directive 2010/63/EC of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf