

УДК 619:615.015.2+33+38:615.099:615.9:615.284+285:616-091+091.8

DYNAMICS OF MICROSTRUCTURAL CHANGES OF WHITE RAT LIVER UNDER THE INFLUENCE OF E-SELEN IN COMPLEX WITH CLOSAVERM-A

O. L. Tishyn¹, H. I. Kotsiumbas²
oleksandr.tishyn@gmail.com

¹State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives; 11, Donetsk st., Lviv, 79019, Ukraine

²Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies after S. Z. Gzhytsky; 50, Pekarska st., Lviv, 79010, Ukraine

The aim of the study was to examine the histostructural changes of liver at administration of E-selen in complex with Closaverm-A in therapeutic dose during 14 days. To this end, we used 48 white rats at the age of 2-3 months with body weight of 170-185 g. Were used 2 analogous groups with 24 animals in each were formed. The first group was control one. Closaverm-A in therapeutic dose (0.05 ml/kg) daily during 14 days and E-selen in dose of 0,02 ml/kg at the beginning of experiment and on the 8th day of Closaverm-A administration were administered to animals of the 2nd group. On the 7th and 14th day application and on the 21st and 28th day of recovery period the animals decapitated. The postmortem examination was carried out, liver was weighted, the weight coefficients were determined and collected liver parts and fixed in formalin solution. Dehydration of material and embedding in paraffin were conducted by well-known method. The histocuts were stained with hematoxyline and eosine. At histological test of liver of the 1st control group it was determined that lamellar structure was distinctly expressed. Hepatocytes of polygonal form with big round nuclei were observed. Duringt histological test of rat liver on the 7th day of administration we observed expressed discomplexation of gulches. In central part of particles radial structure of gulches was expressed, boundary between cells is observed, cytoplasm of hepatocytes is stained, nuclei of round form with chromatine location under karyolemma. On the periphery of particles most of hepatocytes were swollen, their cytoplasm is heterogeneously stained, granular, outlines between cells are degraded, not clear. Hepatocytes with were observed among such cells. On the 14th day in rat liver we observed strengthening of hepatocyte renewal in peripheral area of particles that caused significant increasing of cell content with polyploidy nuclei. New regenerated hepatocytes with intensively stained, basophilic cytoplasm and 2–3 nuclei were observed. It is known that cell polyploidization causes cell division and renewal of functional activity of organ. After stopping of administration on the 21st day renewal of histostructure of hepatocytes and lamellar liver structure were observed. Reparative processes were expressed in whole particle. On the 28th day of renewal period after last administration well-structured lamellar structure of particles was observed. The weight coefficients of liver in experimental animals in comparison with control group on the 7th day of administration of Closaverm-A were decreasing and on the 14th day — were increasing. On the 21st day of renewal, body weight coefficient in the experimental group was decreasing by 10,3 % ($p < 0.05$), and on the 28th day of renewal we observed insignificant tendency to decreasing. So, according to results of conducted histological tests of white rat liver using Closaverm-A in therapeutic dose in complex with E-selen, it was determined that on the 7th day of administration we observed the development of dystrophic changes with lamellar structure disorder in peripheral area of particles, on the 14th day of administration — activation of regeneration processes in peripheral area and full renewal of particle structure was observed on the 21st day.

Keywords: CLOSAVERM-A, E-SELEN, RATS, LIVER, TOXICOLOGICAL AND PATHOMORPHOLOGICAL TESTS

ДИНАМІКА МІКРОСТРУКТУРНИХ ЗМІН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ «Е-СЕЛЕНУ» В КОМПЛЕКСІ З «КЛОЗАВЕРМОМ-А»

О. Л. Тішин¹, Г. І. Коцюмбас²
oleksandr.tishyn@gmail.com

¹Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

Метою досліджень було вивчити гістоструктурні зміни печінки білих щурів за ін'єкції їм препарату «Е-селен» в комплексі з введенням 14 діб поспіль терапевтичної дози «Клозаверму-А». Для цього було використано 48 білих щурів 2–3-місячного віку, масою 170–185 г. Із них було сформовано 2 аналогічні групи по 24 тварини у кожній. Перша група тварин була контрольною. Тваринам другої групи вводили «Клозаверм-А» у терапевтичній дозі (0,05 мл/кг) щодобово 14 діб та препарат «Е-селен» у дозі 0,02 мл/кг на початку досліджу та на 8 добу введення «Клозаверму-А». На 7 і 14 добу введення та на 21 і 28 добу періоду відновлення, тварин декапітували, за умов легкого ефірного наркозу. Проводили їх патологоанатомічний розтин, відділяли і зважували печінку, визначали її коефіцієнти маси та відбирали шматочки печінки, фіксували в 10 % нейтральному формаліні. Обезводнення матеріалу і заливку в парафін проводили за загальноприйнятими методиками. Гістозрізи фарбували гематоксиліном та еозином. При гістологічному дослідженні печінки щурів контрольної групи встановлено, що часточкова і пластинчата будова чітко виражені. Гепатоцити полігональної форми з великими круглими ядрами. При гістологічному дослідженні печінки щурів на 7 добу введення відзначали місцями виражену дисконфлексію пластинок по периферії часточок. У центральній частині часточок радіальна будова пластинок виражена, границя між клітинами проглядається, цитоплазма гепатоцитів помірно забарвлена, ядра округлої форми з розміщенням хроматину під каріолемою. На периферії часточок більшість гепатоцитів набубнявіла, їх цитоплазма неоднорідно забарвлена, зерниста, контури між клітинами розмиті, погано виражені. Часто визначалися серед таких клітин, гепатоцити з лізованими ядрами. На 14 добу в печінці щурів, яким вводили «Клозаверм-А» та «Е-селен», відзначали у периферичній ділянці часточок посилення процесів відновлення гепатоцитів, що відобразилося значним збільшенням вмісту клітин з поліплоїдними ядрами. На тлі загальної картини часточок вирізнялися молоді регенеровані гепатоцити з інтенсивно забарвленою, базофільною цитоплазмою і двома-, трьома ядрами. Відомо, що поліплоїдизація клітин призводить до клітинного поділу та відновлення функціональної діяльності органа. Після припинення введення препаратів на 21 добу, на тлі помірної гіперемії, відзначали відновлення гістоструктури гепатоцитів та пластинчатої будови печінки. Репаративні процеси виражені у всій часточці. На 28 добу періоду відновлення проглядається добре структурована пластинчата будова часточок. Вагові коефіцієнти маси печінки у дослідних тварин, порівняно з контрольною групою, на 7 добу введення «Клозаверму-А», мали незначну тенденцію до зниження, а на 14 добу — до збільшення. На 21 добу відновлення, показник коефіцієнтів маси печінки у дослідній групі тварин знижувався на 10,3 % ($p < 0,05$) від такої контрольної групи, а на 28 добу періоду відновлення ми відмічали вже незначну тенденцію до зниження. Отже, за результатами проведених гістологічних досліджень печінки білих щурів, яким поспіль 14 діб парентерально вводили «Клозаверм-А» у терапевтичній дозі в поєднанні з двофазовою ін'єкцією «Е-селену», встановлено на 7 добу введення розвиток дистрофічних змін з порушенням пластинчатої будови у периферичній ділянці часточок, на 14 добу введення — активацію процесів регенерації у периферичній ділянці, а повне відновлення структури часточок наставало на 21 добу після останнього введення «Клозаверму-А».

Ключові слова: КЛОЗАВЕРМ-А, Е-СЕЛЕН, ЩУРИ, ПЕЧІНКА, ТОКСИКОЛОГІЧНІ ТА ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ДИНАМИКА МИКРОСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ «Е-СЕЛЕНА» В КОМПЛЕКСЕ С «КЛОЗАВЕРМОМ-А»

А. Л. Тишин¹, Г. И. Коцюмбас²
oleksandr.tishyn@gmail.com

¹Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

²Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

Целью исследований было изучить гистоструктурные изменения печени белых крыс при инъекции им препарата «Е-селен» в комплекс с введением 14 суток подряд терапевтической дозы «Клозаверма-А». Для этого было использовано 48 белых крыс 2–3-месячного возраста, массой 170–185 г. Из них было сформировано 2 аналогичные группы по 24 животных в каждой. Первая группа животных была контрольной. Животным второй группы вводили «Клозаверм-А» в терапевтической дозе (0,05 мл/кг) ежедневно 14 суток и препарат «Е-селен» в дозе 0,02 мл/кг в начале опыта и на 8 сутки введения «Клозаверма-А». На 7 и 14 сутки введения и на 21 и 28 сутки периода восстановления, животных декапитировали при легком эфирном наркозе. Проводили их патологоанатомическое вскрытие, отделяли и взвешивали печень, определяли ее коэффициенты массы и отбирали кусочки печени, фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Обезвоживание материала и заливку в парафин проводили по общепринятым методикам. Гистосрезы окрашивали гематоксилином и эозином. При гистологическом исследовании печени крыс контрольной группы установлено, что дольковое и пластинчатое строение четко выражены. Гепатоциты полигональной формы с большими круглыми ядрами. При гистологическом исследовании печени крыс на 7 сутки введения отмечали местами выраженную дископлексацію пластинок на периферии долек. В центральной части долек радиальное строение пластинок выражено, граница между клетками просматривается, цитоплазма гепатоцитов умеренно окрашена, ядра округлой формы с расположением хроматина под кариоломой. На периферии долек большинство гепатоцитов набухло, их цитоплазма неоднородно окрашенная, зернистая, контуры между клетками размыты, плохо выражены. Часто определялись среди таких клеток, гепатоциты с лизованными ядрами. На 14 сутки в печени крыс, которым вводили «Клозаверм-А» и «Е-селен», отмечали в периферической области часточек усиление процессов восстановления гепатоцитов, что отразилось значительным увеличением содержания клеток с полиплоидными ядрами. На фоне общей картины часточек выделялись молодые регенерированные гепатоциты с интенсивно окрашенной, базофильной цитоплазмой и двумя, тремя ядрами. Известно, что полиплоидизация клеток приводит к клеточному делению и восстановлению функциональной деятельности органа. После прекращения введения препаратов на 21 сутки, на фоне умеренной гиперемии, отмечали восстановление гистоструктуры гепатоцитов и пластинчатого строения печени. Репаративные процессы выражены во всей дольке. На 28 сутки периода восстановления просматривается хорошо структурированное пластинчатое строение долек. Весовые коэффициенты массы печени у подопытных животных, по сравнению с контрольной группой, на 7 сутки введения «Клозаверма-А», имели незначительную тенденцию к снижению, а на 14 сутки — к увеличению. На 21 сутки восстановления, показатель коэффициентов массы печени в опытной группе животных снижался на 10,3 % ($p < 0,05$) от такого контрольной группы, а на 28 сутки периода восстановления мы отмечали уже незначительную тенденцию к снижению. Итак, по результатам проведенных гистологических исследований печени белых крыс, которым подряд 14 суток парентерально вводили «Клозаверм-А» в терапевтической дозе в сочетании с двукратной инъекцией «Е-селена», установлено на 7 сутки введения развитие дистрофических изменений с нарушением пластинчатого строения в периферической области часточек, на 14 сутки введения — активацию процессов регенерации в периферической области, а полное восстановление структуры долек наступало на 21 сутки после последнего введения «Клозаверма-А».

Ключевые слова: КЛОЗАВЕРМ-А, Е-СЕЛЕН, КРЫСЫ, ПЕЧЕНЬ, ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Introduction. The perspective direction of creation new peculiarities and the improvement of therapeutic ones of anthelmintic drugs is the development of multi componential medicinal products, the composition of which consists of few active substances that amplify each other and can show high efficacy either against adult or larvae parasites. Such requirements are satisfied by antiparasitic medicinal product of wide range of action, the efficacy of which is based on the peculiarities of two active substances — closantel and aversectine C developed by «Ukrzooverprompostach» under the name of Closaverm-A [1]. Anthelmintic drugs negatively influence the parasites and simultaneously have unfavourable effect on the animal organism exposed to worming. That is why for elimination of negative influence the medicinal products are used allowing to achieve not only high efficacy during treatment but also to grade the negative effect of anthelmintic medicinal product. One of such medicinal product is E-selen that contains vitamin E and selenium. Selenium — important microelement for organism that provides functional state of cell membranes and strengthens antioxidant effect. Vitamin E is strong antioxidant and protects cell membranes, controls reproductive function, participates in protein synthesis, stimulates ferment synthesis, some hormones, activates blood formation and is necessary for renewal of other fat-soluble vitamins [2].

The important stage in development of new medicinal product are toxicological tests. Pathomorphological tests are the final and very important stage of work in assessment of toxicological effect of medicinal product since they give an opportunity to determine the primary changes, adaptive processes of different organs. In the process of studying of medicinal product effect the determination of morphofunctional liver condition is very important [3]. Occupying the central place in control of metabolism, elimination of toxic

products, liver actively reacts on the effect of unfavourable factors [4].

We highlighted the liver pathomorphology at continued administration of Closaverm-A to white rats in different doses [5, 6]. However, structural state of liver of white rats at administration of E-selen in complex with Closaverm-A is not defined as yet.

The aim of the study was to examine the histostructural changes of liver at administration of E-selen in complex with Closaverm-A in therapeutic dose during 14 days.

Materials and methods

For studying of dynamics of pathomorphological changes of liver at administration of medicinal products 48 white rats at the age of 2-3 months with body weight of 170-185 g. Were used 2 analogous groups with 24 animals in each were formed. The first group was control one. The solution of distilled water and propylene glycol was administered to animals during 14 days. Closaverm-A in therapeutic dose (0.05 ml/kg) daily during 14 days and E-selen in dose of 0.02 ml/kg at the beginning of experiment and on the 8th day of Closaverm-A administration were administered to animals of the 2nd group. The medicinal products were administered subcutaneously. On the 7th and 14th day after administration of Closaverm-A and on the 21st and 28th day of recovery period the animals decapitated. The postmortem examination was carried out, liver was weighted, the weight coefficients were determined and collected liver parts and fixed in formalin solution. Dehydration of material and embedding in paraffin were conducted by well-known method. The histocuts were stained with hematoxyline and eosine according to Van-Hizon method [7].

Results and discussion

At histological test of liver of the 1st control group it was determined that lamellar structure was distinctly expressed. Hepatocytes of polygonal form with big round nuclei were observed. Chromatine of nuclei

was localized near karyolemma. Cell membranes were outlined. Cytoplasm was homogeneously stained, basophilic. We observed hepatocytes with two nuclei. Kupffer cells in centrolobular area were of prolonged form and on periportal areas they were rounded (fig. 1).

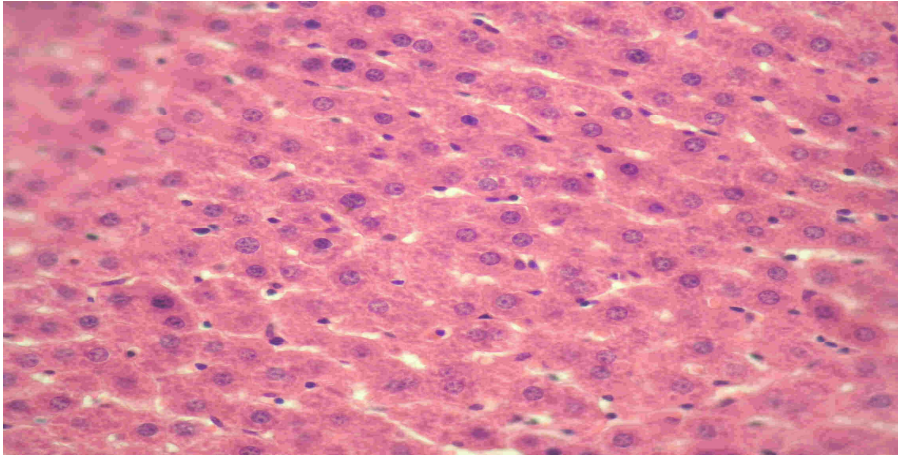


Fig. 1. Liver of rats of the 1st group. Radial lamellar structure. Hematoxyline and eosine stain. Ocular 10, objective 40

Duringt histological test of rat liver of the 2nd group on the 7th day of administration of Closaverm-A with E-selen we observed expressed discomplexation of gulches. In central part of particles radial structure of gulches was expressed, boundary between cells is observed, cytoplasm of hepatocytes is stained, nuclei of round form with chromatine location under karyolemma. On the periphery of particles most of hepatocytes were swollen,

their cytoplasm is heterogeneously stained, granular, outlines between cells are degraded, not clear (fig. 2). The nuclei of most cells are of round form with chromatine on all karyoplasm. Hepatocytes with were observed among such cells (fig. 3). Cells were becoming round and went out into capillaries. Detected changes caused stenosis of capillaries in peripheral area of particles and resulted in development of dystrophic changes in liver.

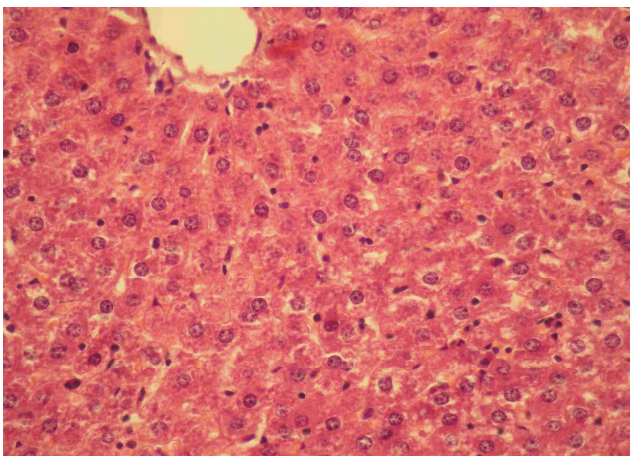


Fig. 2. Liver of rats of the 2nd group on the 7th day of administration. Discomplexation of gulches on the periphery of particles. Hematoxyline and eosine stain. Ocular 10, objective 20

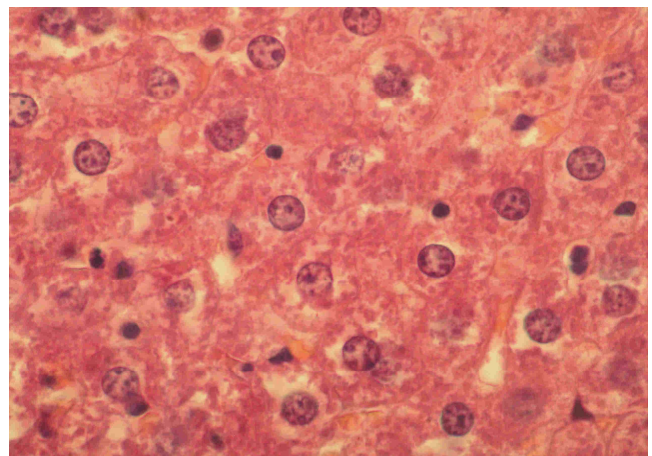


Fig. 3. Liver of rats of the 2nd group on the 7th day of administration. Granular dystrophy of hepatocytes. Hematoxyline and eosine stain. Ocular 10, objective 100

On the 14th day in rat liver we observed strengthening of hepatocyte renewal in peripheral area of particles that caused significant increasing of cell content with polyploidy nuclei. New regenerated hepatocytes with intensively stained, basophilic cytoplasm and 2–3 nuclei were observed. Intensively stained nuclei were the result of chromatine content. Among swollen

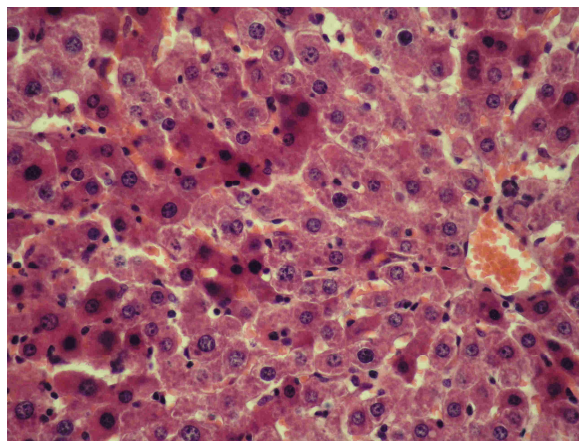


Fig. 4. Liver of rats of the 2nd group on the 14th day of administration. Strengthening of regenerative processes. Hematoxyline and eosine stain. Ocular 10, objective 40

After stopping of administration on the 21st day renewal of histostructure of hepatocytes and lamellar liver structure were observed. Reparative processes were expressed in whole particle. Hepatocytes with intensively stained cytoplasm and large hyperchrome nuclei predominated (fig. 6).

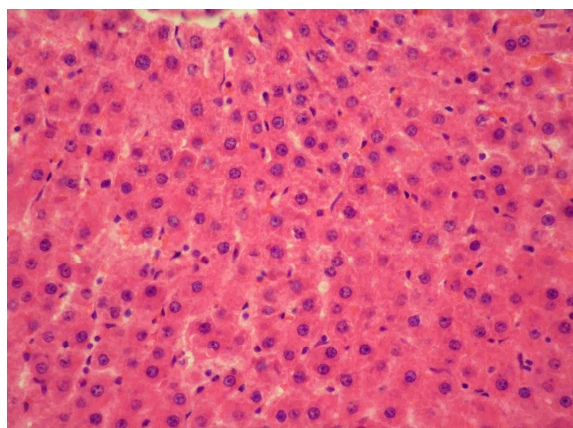


Fig. 6. Liver of rats of the 2nd group on the 21st day of renewal. Renewal of lamellar structure of particles. Hematoxyline and eosine stain. Ocular 10, objective 40

light pink hepatocytes in the condition of granular dystrophy, outlined hepatocytes with dark pink cytoplasm and dark blue nuclei were observed (fig. 4). It is known that cell polyploidization causes cell division and renewal of functional activity of organ. Moderate round cell infiltration was observed (fig. 5).

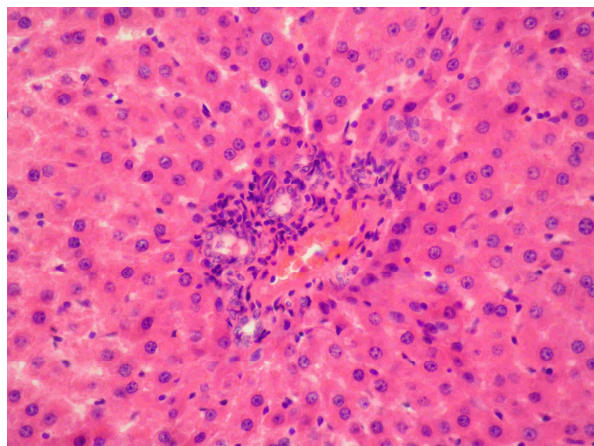


Fig. 5. Liver of rats of the 2nd group on the 14th day of administration. Round cell infiltrates. Hematoxyline and eosine stain. Ocular 10, objective 40

On the 28th day of renewal period after last administration of Closaverm-A well-structured lamellar structure of particles was observed. Outlines of cells are expressed, cytoplasm has intensive basophilic saturation, nuclei are rich, of round form with high content of chromatine. However, moderate round cell infiltration is preserved (fig. 7).

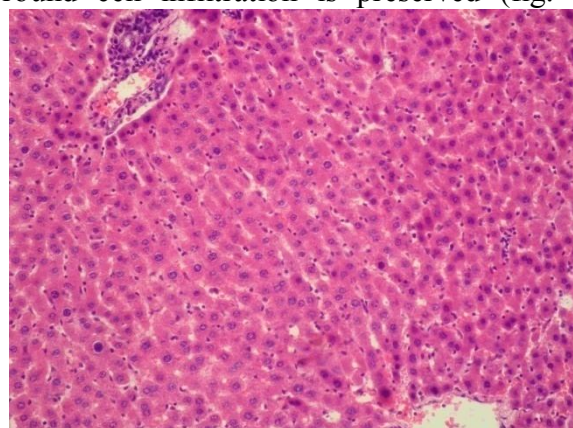


Fig. 7. Liver of rats of the 2nd group on the 28st day of renewal. Renewed gulch structure and hepatocytes. Round cell infiltration. Hematoxyline and eosine stain. Ocular 10, objective 20

It should be noted that body weight coefficients of liver in the 2nd group in comparison with control group on the 7th day of administration of Closaverm-A were decreasing and on the 14th day — were

increasing. On the 21st day of renewal, body weight coefficient in the 2nd group was decreasing by 10.3 % ($p < 0.05$), and on the 28th day of renewal we observed insignificant tendency to decreasing (table).

Weight coefficients of liver at administration of Closaverm-A and E-selen and without it ($M \pm m$, $n = 6$)

Table

Groups of animals	Weight coefficients of liver at:			
	Administration of Closaverm-A		Renewal period	
	the 7 th day	the 14 th day	the 21 st day	the 28 th day
I	34.97 ± 0.98	37.1 ± 0.57	35.1 ± 0.41	36.6 ± 1.63
II	33.63 ± 0.87	37.6 ± 1.16	31.5 ± 0.93*	33.7 ± 1.02

Note: authenticity degree to animals of control group * — $p < 0.05$

So, according to results of conducted histological tests of white rat liver using Closaverm-A in therapeutic dose in complex with E-selen, it was determined that on the 7th day of administration we observed the development of dystrophic changes with lamellar structure disorder in peripheral area of particles, on the 14th day of administration — activation of regeneration processes in peripheral area and full renewal of particle structure was observed on the 21st day.

Conclusions

Daily administration of Closaverm-A during 7 days in therapeutic dose together with single injection of E-selen resulted in the development of dystrophic changes with lamellar structure disorder in peripheral area.

Twofold injection of E-selen on the background of 14-day administration of Closaverm-A in therapeutic dose activated the processes of reparative regeneration, lamellar structure renewal in peripheral area of particles together with round-cell infiltration.

At administration of Closaverm-A on the background of twofold injection of E-selen full renewal of particle structure was observed on the 21st day.

Perspectives of future findings. For determination of E-selen influence on the background of continued administration of Closaverm-A on organism it is reasonable to conduct histological tests of heart, kidneys, immune organs of white rats.

1. Kotsiumbas I. Ya., Serhiienko O. I., Kovalchuk L. M., Tishyn O. L., Khomiak R. V., Kopyichuk H. T., Krushelnytska N. V., Malynivskyi V. M. Suchasni pidkhody do

stvorennia ta zastosuvannia protyparazytarnykh preparativ [Modern approaches to the development and use of antiparasitic drugs]. *Veterynarna medytsyna Ukrainy — Veterinary Medicine of Ukraine*, 2010, no. 11, pp. 14-17 (in Ukrainian).

2. Kaniuka O. I., Faitelberh-Blank V. R., Lizogub Yu. P. et al. Ed. O. I. Kaniuka *Klinichna veterynarna farmakolohiia: navchalnyi posibnyk* [Clinical Veterinary Pharmacology: Manual]. Odessa, Astroprint Publ., 2006. 296 p. (In Ukrainian).

3. Kotsiumbas I. Ya., Malik O. G., Patereha I. P. et al. Ed. I. Ya. Kotsiumbas *Doklinichni doslidzhennia veterynarnykh likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of veterinar medicinal products]. Lviv, Triad Plus Publ., 2006. 360 p. (In Ukrainian).

4. Stefanov A. V., Maltsev V. I., Yefimov T. K. *Rukovodstvo po klinicheskim ispytaniiam lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for clinical trials of drugs]. Kyiv, Avitsenna Publ., 2001. 425 p. (In Russian).

5. Tishyn O. L. Dynamika morfolohichnykh zmin pechinky bilykh shchuriv za vyvchennia toksychnoi dii preparatu klozaverm-A [Dynamics of morphological changes in the liver of white rats at studying of the toxic effect of Closaverm-A]. *Visnyk Sumskoho natsionalnoho ahrarnoho universitetu: seriia «Veterynarna medytsyna» — Bulletin of Sumy National Agrarian University: Veterinary Medicine Series*, 2009, no 6 (25), pp. 125-131 (in Ukrainian).

6. Tishyn O. L., Kotsiumbas H. I., Vysotska K. O., Vysotska T. M. Morfofunktsionalnyi stan pechinky bilykh shchuriv za dii riznykh doz klozavermu-A [Morphofunctional condition of white rat liver at effect of different doses of Closaverm-A]. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universitetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii imeni S. Z. Gzhytskoho — Bulletin of the Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology*, 2009, vol. 11, no 2 (41), ch.2, pp. 287-295 (in Ukrainian).

7. Merkulov H. A. *Kurs patolohicheskoi tekhniki* [Course of pathohistological techniques]. Leningrad, Medicine Publ., 1969. 423 p. (In Russian).