

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ «БІОТОН» НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТА МОРФОЛОГІЧНУ СТРУКТУРУ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЩУРІВ

*І. Я. Коцюмбас, д-р вет. наук, професор, академік НААН,
М. І. Жила, д-р вет. наук, доцент,
О. М. П'ятничко, канд. с.-г. наук,
О. Й. Сободош, канд. вет. наук,
В. П. Бассараб, О. А. Максимович, молодші наукові співробітники*

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

*У статті представлені результати біохімічних та гістологічних досліджень отримані при вивченні токсичності нового ветеринарного препарату імуномодуючої дії «Біотон», який містить комплекс біологічно активних речовин метаболізму грибів-ендофітів *Cylindrocarpum Magnusianum*, виділених з кореня женьшеню.*

Встановлено, що застосування препарату «Біотон» щурам не викликало макро- та мікроскопічних змін у тканинах та внутрішніх органах на 15 і 30 добу експерименту. Проте його введення впродовж 60 діб спричиняло зростання у сироватці крові вмісту креатиніну, активності ферментів АЛАТ, АсАТ і ЛФ, концентрації середньомолекулярних пептидів та зниження сечовини, а гістологічно відмічали наявність зернисто-вакуольної дистрофії у гепатоцитах, нефроепітеліоцитах, вогнищезового серозно-катарального ентериту, що вказувало на структурно-функціональні порушення у внутрішніх органах досліджуваних тварин.

Ключові слова: БІОТОН, ІМУНОМОДУЛЯТОРИ, ЩУРИ, ПІДГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ, БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ, ВНУТРІШНІ ОРГАНИ, МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Дотримання системи доклінічних та клінічних випробувань ветеринарних лікарських засобів, яка відповідає міжнародним вимогам, є основною запорукою розробки ефективних, безпечних та конкурентоспроможних препаратів. Проведення оцінки активності і нешкідливості препаратів імуномодуючої дії пов'язане з певними труднощами, оскільки більшість із них містять декілька біологічно активних речовин (комплексні препарати), які спричиняють фармакологічну та біокорегуючу дію на різні ланки імунної системи організму [4, 7, 12, 13].

Усі імунотропні лікарські засоби прямої дії об'єднують в одну велику групу імуномодуляторів (ІМ). Сутність явища імуномодуляції полягає в тому, що при застосуванні фармакологічного засобу в певних дозах та часових режимах відбуваються бажані зрушення в імунній системі внаслідок безпосереднього впливу препарату на функціональну активність клітин імунного захисту, або в результаті зміни взаємодії імунокомпетентних клітин чи їх продуктів. Серед ІМ виділяють імуностимулятори, імунокоректори та імунодепресанти [5, 6, 14-16].

Метою нашої роботи було встановити параметри безпечності та фармакологічної дії препарату «Біотон» за багаторазового введення лабораторним тваринам.

Матеріал і методи. Дослідження підгострої токсичності препарату «Біотон» проводили на щурах-самцях, масою тіла 170-180 г, сформованих у дві групи по 30 щурів у кожній: I група (контроль) – отримувала воду; II групі задавали перорально препарат «Біотон» із розрахунку 170 мг/кг маси тіла щура. Тварин утримували в умовах віварію

ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, з сталою температурою приміщень та вологістю. Годівля передбачала стандартний раціон з постійним доступом до води.

На 15, 30 і 60 доби досліду по 10 тварин з кожної групи декапітували, за умов легкого ефірного наркозу, відбирали кров для лабораторних досліджень та проводили повний патологоанатомічний розтин, визначали коефіцієнти маси внутрішніх органів із забором матеріалу для гістологічного дослідження. Морфологічні показники визначали у стабілізованій крові, біохімічні – у сироватці крові за допомогою тест-наборів згідно загальноприйнятих методик [1, 7, 9, 11].

Матеріал для гістологічного дослідження (шматочки внутрішніх органів і тканин) фіксували в 10 % нейтральному розчині формаліну з наступною заливкою в парафін. Гістозрізи виготовляли на санному мікротомі МС-2. Для дослідження загальної морфологічної структури органів і тканин та морфометричних показників гістозрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Мікроскопію проводили з допомогою мікроскопа OLIMPUS CX-41 і морфометричної програми DP-SOFT [3, 10].

Отримані результати обробляли статистично з врахуванням середніх арифметичних величин (M), середньої квадратичної похибки (m) і ступеня вірогідності різниці (p), між показниками з використанням статистичного програмного пакету Statistica 5,0 для Windows XP. Вірогідність розходжень між показниками оцінювали за критерієм Стьюдента [4].

Результати й обговорення. Вивчення фармакотоксикологічних параметрів нового ветеринарного препарату імуномодуючої дії «Біотон», який містить комплекс біологічно активних продуктів (амінокислоти, насичені і ненасичені жирні кислоти, полісахариди) метаболізму грибів-ендофітів (*Cylindrocarpon magnusianum*) виділених з кореня женьшеню, полягали у визначенні біологічної активності препарату, гострої та підгострої токсичності на білих мишах і щурах, місцево-подразнювальній дії на шкіру та слизову оболонку ока кролів.

За встановленими параметрами гострої токсичності, місцево-подразнюючої дії препарат «Біотон», відповідно до загальноприйнятої класифікації за СОУ 85.2-37-736:2011, належить до малотоксичних речовин – 4 клас токсичності.

Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено, що застосування препарату «Біотон» щурам у дозі 170 мг/кг м. т. впродовж 60 діб не спричиняло загибелі тварин. На 15 і 30 доби спостереження піддослідні тварини зберігали апетит, поведінкова реакція адекватна. На 60 добу відмічали дещо пригнічений стан у дослідній групі щурів, шерстний покрив втрачав блиск, набував скуйовдженого вигляду. Маса тіла щурів дослідної групи була достовірно вищою на 15 і 30 доби досліду, тоді, як на 60 добу фіксували зворотній процес, а саме: зменшення маси тіла на 12,7 % у щурів, що отримували препарат «Біотон», порівняно з тваринами інтактної групи.

При патоморфологічному дослідженні на 15 і 30 добу внутрішні органи щурів контрольної та дослідної груп зберігали характерну анатомічну будову, видимих макроскопічних змін не встановлено. На 60 добу у щурів дослідної групи слизова оболонка тонкого відділу кишечника була місцями почервоніла, набрякла, з нашаруваннями мутного слизу, печінка збільшених розмірів, краї заокруглені, забарвлення неоднорідне, темно-вишневе з наявними вогнищами світло-коричневого кольору, дряблї консистенції, повнокровна, структура на розрізі згладжена. Нирки бобовидної форми, дещо збільшені, повнокровні, темно-червоного кольору, на розрізі структура збережена, границя між кірковою і мозковою зонами наявна, повнокровні. Тимус зменшених розмірів, з крововиливами, селезінка темно-вишневого кольору, краї гострі, на розрізі зіскребок пульпи незначний, лімфатичні вузли брижі – без макроскопічних змін.

При аналізі коефіцієнтів маси внутрішніх органів відмічали достовірне ($p \leq 0,05$) збільшення маси тимуса на 15 і 30 доби досліду, селезінки і сім'яників на 30 добу, що вказувало на функціональну активність органів з високою проліферативною здатністю паренхіматозних елементів.

Показники коефіцієнтів маси внутрішніх органів тварин дослідної групи на 60 добу вказували на збільшення маси печінки на 25,7 % ($p \leq 0,01$) і нирок на 28,6 % ($p \leq 0,01$) та зменшення маси тимуса на 25,9 % ($p \leq 0,01$) і селезінки на 25,4 % ($p \leq 0,05$), порівняно до контролю, що свідчило про надмірне навантаження на дані органи щурів за тривалого застосування.

Проведеними біохімічними дослідженнями не було встановлено суттєвої різниці показників між дослідною та контрольною групами. На 30 добу у тварин дослідної групи відзначено підвищення вмісту загального білка на 6,6 % та дещо нижчу концентрацію середньомолекулярних пептидів (МСМ) у сироватці крові, що свідчило про більш активний білковий обмін (табл.).

Таблиця

Динаміка біохімічних показників крові щурів за тривалого застосування препарату «Біотон» ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Групи	Час проведення дослідю		
		15 доба	30 доба	60 доба
Загальний білок, г/л	К	64,11±2,09	70,32±1,18	68,55±1,44
	Д	66,25±1,62	76,54±1,51*	61,22±2,33*
АлАТ, мккат/л	К	0,51±0,03	0,44±0,02	0,54±0,02
	Д	0,40±0,04	0,46±0,02	0,77±0,04**
АсАТ, мккат/л	К	1,94±0,04	1,83±0,03	1,76±0,06
	Д	1,90±0,05	1,84±0,06	2,33±0,09**
ЛФ, мккат/л	К	1,51±0,04	1,84±0,03	1,55±0,08
	Д	1,42±0,05	1,04±0,03	2,47±0,10**
Сечовина, ммоль/л	К	8,61±0,24	9,23±0,18	10,32±0,21
	Д	9,02±0,15	9,45±0,09	8,71±0,16**
Креатинін, мкмоль/л	К	68,05±2,28	73,61±2,09	70,61±1,16
	Д	64,08±2,14	70,02±2,47	79,03±2,06**
МСМ, г/л	К	1,48±0,07	0,98±0,02	0,94±0,03
	Д	1,33±0,06	0,84±0,06	1,41±0,05**

Примітки: різниця статистично вірогідна порівняно до контролю: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$

За тривалого (60 діб) застосування щурам препарату «Біотон» встановлено вірогідне ($p < 0,01$) зростання у сироватці крові вмісту креатиніну на 11,5 %, активності ферментів АлАТ, АсАТ і ЛФ, відповідно, на 43,1 %, 32,6 % і 61,5 %, концентрації МСМ на 45,7% та зниження концентрації загального білка на 10,6 % і сечовини на 16,8 %, що вказувало на наявні функціональні порушення в печінці й нирках щурів і було підтверджено гістологічним дослідженням. Так, у печінки щурів дослідної групи на 60 добу виявляли дископлексацію пластинчастої будови часточок. Гепатоцити розріджені переважно розміщувалися окремими групами, цитоплазма неоднорідна, зерниста, з дрібними вакуольними прозорими включеннями, ядра слабо зафарбовані, деякі в стані пікнозу і лізису, що вказувало на розвиток переважно зернистої, рідше вакуольної дистрофії (рис. 1). У сполучнотканинних прошарках наявні лімфоїдно-гістіоцитарні інфільтрати навколо триад, що вказувало на розвиток деструктивного холангіту (рис. 2). Тоді, як у щурів контрольної групи гепатоцити добре контуровані, цитоплазма однорідна, ядра збережені (рис. 3).

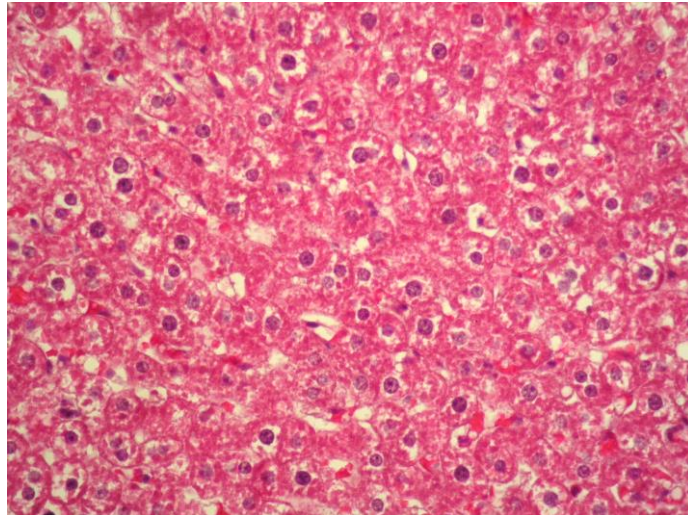


Рис. 1. Печінка щурів дослідної групи на 60 добу. Цитоплазма гепатоцитів зерниста, з вакуольними включеннями, каріопікноз, каріолізис. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40

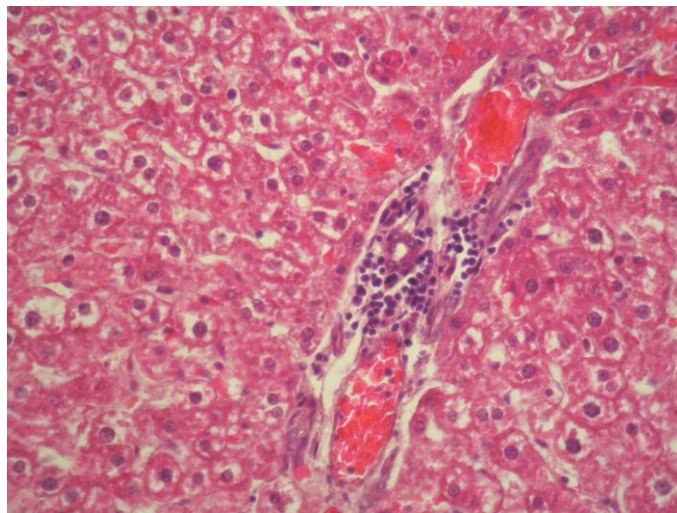


Рис. 2. Клітинні інфільтрати в ділянці печінкової триади, застійні явища у щурів дослідної групи на 60 добу. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40

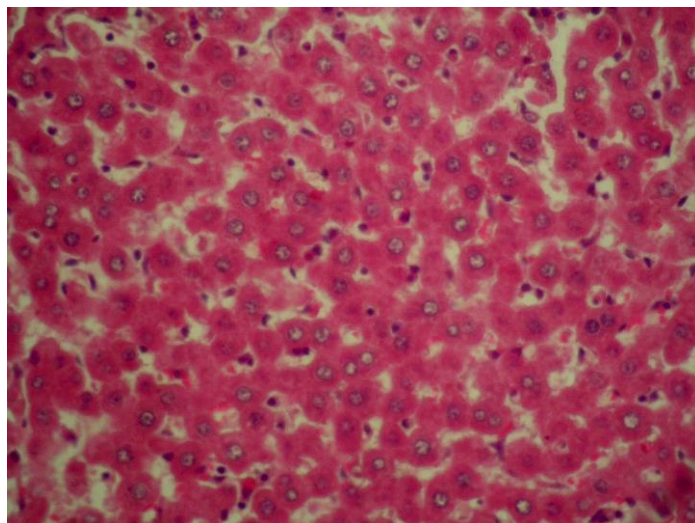


Рис. 3. Печінка щурів контрольної групи на 60 добу. Цитоплазма гепатоцитів однорідна, добре забарвлена, ядра збережені. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40

При гістологічному дослідженні слизова оболонка тонкої кишки інфільтрована лімфоцитами, поліморфноядерними лейкоцитами. Судини були розширені і переповнені кров'ю. Доволі типовою була картина деструкції ворсинок, десквамацією епітеліального покриву, що супроводжувалось їх вкороченням, а іноді деформацією, що вказувало на розвиток вогнищового катарального ентериту (рис. 4). У внутрішніх органах порушення геодинаміки поєднувались із застійними явищами та дистрофічними процесами.

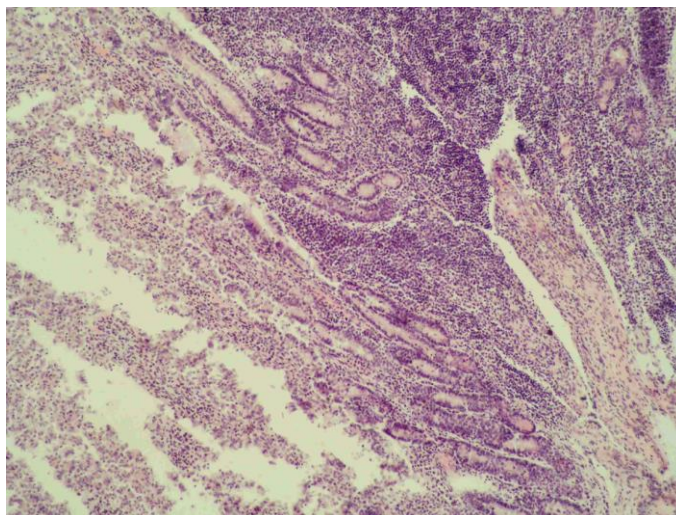


Рис. 4. Десквамація епітелію, клітинні інфільтрати слизової оболонки тонкої кишки. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 10

В епітелії звивистих каналців нирок простежувалися різного ступеня дистрофічні зміни, звуження просвіту каналців. Клітини епітелію збільшені, цитоплазма дрібнозерниста, місцями вакуолізована, ядра нефроепітеліоцитів пікнотичні з ознаками каріолізису (рис. 5).

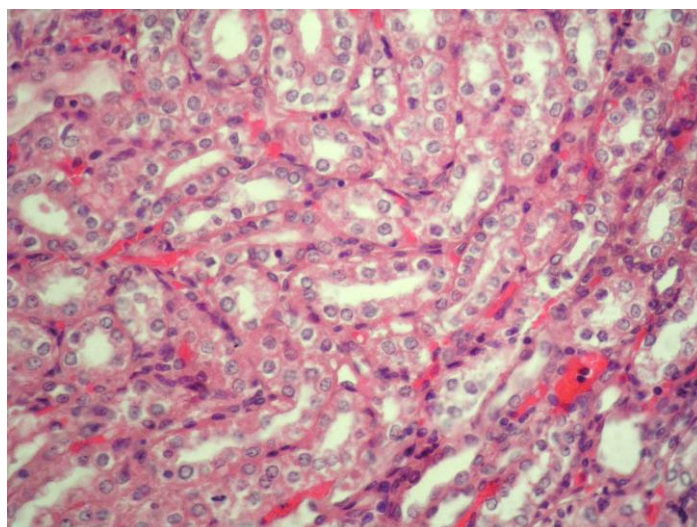


Рис. 5. Звивисті каналці нирок щурів дослідної групи на 60 добу. Цитоплазма нефроепітеліоцитів неоднорідна, зерниста. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40

ВИСНОВКИ

1. За встановленими параметрами гострої токсичності, місцево-подразнюючої дії на шкіру та слизову оболонку, препарат «Біотон», розчин для перорального застосування, який містить комплекс біологічно активних речовин метаболізму грибів-ендофітів (*Cylindrocarpon*

Magnusianum, виділених з кореня женьшеню, відповідно до загальноприйнятої класифікації за СОУ 85.2-37-736:2011, належить до малотоксичних речовин – 4 клас токсичності.

2. Провівши ряд експериментів із вивчення параметрів токсичності нового ветеринарного препарату імуномодуючої дії «Біотон» дало можливість встановити показники гомеостазу, виявити побічні реакції, найбільш чутливі органи та системи організму лабораторних тварин за дії лікарського засобу.

3. Застосування препарату «Біотон» щурам у дозі 170 мг/кг м. т. не викликало макро- та мікроскопічних змін у тканинах та внутрішніх органах на 15 і 30 добу експерименту. Проте, введення впродовж 60 діб спричиняло зростання у сироватці крові вмісту креатиніну, активності ферментів АЛАТ, АсАТ і ЛФ, концентрації середньомолекулярних пептидів та зниження концентрації сечовини. Гістологічним дослідженням встановлено наявність зернисто-вакуольної дистрофії у гепатоцитах, нефроепітеліоцитах, вогнищезового серозно-катарального запалення слизової оболонки тонких кишок, що вказувало на структурно-функціональні порушення в організмі досліджуваних тварин за довготривалого застосування препарату «Біотон».

Перспективи досліджень. Оцінка морфофункціонального стану органів імунної системи щурів за вивчення підгострої токсичності препарату «Біотон».

INFLUENCE OF «BIOTONE» FOR BIOCHEMICAL INDICES OF BLOOD AND MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF INTERNAL ORGANS OF RATS

I. Kotsymbas, M. Zhyla, O. Pyatnychko, O. Sobodosh, V. Bassarab, O. Maksymovych

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The article presents the results of biochemical and histological studies obtained in the study of toxicity of the new veterinary preparation immunomodulatory effect «Biotone», with immunomodulatory effect which contains a complex biologically active substance from mushrooms-endophytes *Cylindrocarpon Magnusianum* metabolism abstracted from Ginseng root, are presented in the article.

It was establish that the use of the drug «Biotone», in rats did not cause macroscopic and microscopic changes in tissues and internal organs on the 15 and 30 day of the experiment. However, its administration for 60 days led to an increase in serum creatinine content, activity of the enzymes ALAT, ASAT and ALP, the concentration of medium molecular peptides and decrease in urea, and histologically noted the presence of granular and vacuolar degeneration in hepatocytes, epithelial cells in the renal, focal serous-catarrrhal enteritis, indicating on structural and functional disorders in the internal organs of the animals under study.

Keywords: BIOTONE IMUNOMODULYATORI, RATS, SUBACUTE TOXICITY, BIOCHEMICAL INDEXES, INTERNAL ORGANS, MORPHOLOGICAL INVESTIGATIONS

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «БИОТОН» НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС

*И. Я. Коцюмбас, Н. И. Жила, О. М. Пятничко, О. И. Сободош,
В. П. Бассараб, О. А. Максимович*

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

АННОТАЦІЯ

В статті представлені результати біохімічних і гистологічних досліджень отримані при вивченні токсичності нового ветеринарного препарату імуномодулюючого дії «Біотон», який містить комплекс біологічно активних речовин метаболізму грибів-ендофітів *Cylindrocarpon Magnusianum*, виділених з корня женьшеня.

Установлено, що застосування препарату «Біотон» мишинам не викликало макро- і мікроскопічних змін в тканинах і внутрішніх органах 15 і 30 днів експерименту. Однак його введення в період 60 днів викликало збільшення в сироватці крові вмісту креатиніну, активності ферментів АлАТ, АсАТ і ЩФ, концентрації середньомолекулярних пептидів і зниження мочевины, а гистологічно відзначали наявність зернисто-вакуольної дистрофії в гепатоцитах, нефроцитоплазми, осередки серозно-катарального ентериту, що вказувало на структурно-функціональні порушення в внутрішніх органах досліджуваних тварин.

Ключові слова: БІОТОН, ІМУНОМОДУЛЯТОРИ, МИШИ, ПОДОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, БІОХІМІЧЕСКІ ПОКАЗАТЕЛІ, ВНУТРІШНІ ОРГАНИ, МОРФОЛОГІЧЕСКІ ДОСЛІДЖЕННЯ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ветеринарна клінічна біохімія / Левченко В. І., Влізло В. В., Кондрахін І. П. [та ін.]; за ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. – Біла Церква, 2002. – 400 с.
2. Визначення параметрів підгострої токсичності нового ветеринарного препарату імуномодулюючої дії «Біотон» / І. Я. Коцюмбас, М. І. Жила, Г. М. Михалусь, О. В. Михалюк, В. П. Бассараб // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. – Львів, – 2017 – випуск 18, № 2. – С. 310-315.
3. Горальський Л. П. Основи гистологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський // Навчальний посібник. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
4. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас, О. Г. Малик, І. П. Патерега [та ін.]; За ред. І. Я. Коцюмбаса. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.
5. Жила М. І. Фармакологічна та клінікоморфологічна оцінка імуномодулюючих і пробіотичних засобів (клінічні дослідження, документація, фармакологічний контроль ефективності дії): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра вет. наук: 16.00.04 «Ветеринарна фармакологія та токсикологія» і 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин» / М. І. Жила. – Львів, 2017. – 40 с.
6. Ільїнська І. Ф. Загальна характеристика імуномодуляторів та їх класифікація [FTP архів]. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: URL [ftp://ftp 1. ifp.kiev.ua /original /2007/ ilyinskaya. Pdf](ftp://ftp1.ifp.kiev.ua/original/2007/ilyinskaya.Pdf).
7. Імуноксикологічний контроль ветеринарних препаратів та кормових добавок: Методичні рекомендації / І. Я. Коцюмбас, М. І. Жила, О. М. Пятничко [та ін.] За ред. І. Я. Коцюмбаса. – Львів, 2014. – 116 с.
8. Клиническая фармакология / Д. Р. Лоуренс, П. Н. Бенит. – в 2-х т. – М.: Медицина, 1991. – Т. I. – 656 с
9. Лабораторні методи дослідження у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич [та ін.]; за ред. В. В. Влізла. – Львів: Сполом, 2012. – 764 с.

10. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина. – 1969. – 423 с.
11. Посібник з лабораторної імунології / Л. Є. Лаповець, Б. Д. Луцик, Г. Б. Лебедь, В. М. Акімова. – Львів, 2008 – 266 с.
12. Розробка, апробація та впровадження системи токсикологічного контролю ветеринарних препаратів / І. Я. Коцюмбас, О. Г. Малик, І. П. Патерега [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 7. – С. 30–33.
13. Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин: методичні рекомендації / М. В. Косенко, О. Г. Малик, І. Я. Коцюмбас [та ін.]. – К., 1997. – 34 с.
14. Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Panax ginseng* / T. Lim, K. Na, E. Choi [et al.] // J. Med. Food. – 2004. – V. 7. – P. 1–6.
15. *Singh V.* Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract / V. Singh, A. Agarwal, G. Gupta // *Planta Med.* – 1984. – Vol. 48. – P. 462–465.
16. New plant growth regulators: basic research and technologies of application / S. P. Ponomarenko, H. O. Iutynska, E. I. Andreyuk [et al.] // Kyiv: Nichlava, 2010. – 211 p

Рецензент – І. П. Патерега, к. вет. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.