

minimum weight of food and hatching eggs (45 g) is indicated, below which the implementation and incubation of eggs is not recommended [1]. In studies, the following indicators were taken into account: large and small diameter of eggs, egg density, egg shape index of laying hens of different groups. To assess the state of the internal contents of the egg after opening, the following indicators were taken into account: protein mass, yolk mass, shell mass, egg volume.

An external examination of the eggs assessed the condition of the shell, the presence of cracks, growths and depressions. The study indicates a positive effect of the feed additive "Prinarovskaya" on the egg productivity of birds in all periods of egg laying

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 31654-2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия

2. Бессарабов Б.Ф. Птицеводство и технология производства яиц и мяса птиц / Б.Ф. Бессарабов, Э.И. Бондарев, Т.А. Столляр. 2-изд. - СПб.: Лань, 2005.- 352 с.
3. Иванова, И.В., Яковлева В.В., Кузнецов А.Ф. Материалы II-го Международного ветеринарного конгресса VETistambul Group – 2015/- 2015.- с.188
4. Кузнецов А.Ф. Промышленное птицеводство: содержание, разведение и кормление сельскохозяйственной птицы / А.Ф. Кузнецов, Г.С. Тюрин, В.Г. Семенов, К.А. Рожков [и др.]. - СПб.: КВАДРО, 2017. - 392 с.
5. Tona, K. Effects of broiler breeder's age on egg weight loss and embryonic mortality / K. Tona, F. Bamelis, V. Bruggeman, E. Decuypere // Int. Hatchery Pract. - 2000. - Vol. 15. - № 2. - P. 23.

УДК 615.012.6: 615.038

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.3.52

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА

Николаев С.В. - к.в.н., научный сотрудник Институт агrobiотехнологий им. А.В. Журавского Коми научного центра УрО РАН; Конопельцев И.Г. – д.в.н., профессор, Глухова М.В. – к.в.н., доцент, Сапожников А.Ф. . – к.в.н., доцент, Норкин А.Г. – соискатель ФГБОУ ВО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия».

Ключевые слова: доклинические исследования, наносеребро, протеолитические ферменты, острая и хроническая токсичность. **Keywords:** preclinical studies, nanosilver, a proteolytic enzyme, acute and chronic toxicity.



РЕФЕРАТ

Одним из актуальных направлений ветеринарной науки является поиск новых, безопасных с экологической точки зрения, антимикробных препаратов. С этой позиции особое внимание стоит уделять средствам на основе ионизированного серебра. В рамках доклинических исследований было проведено определение токсических свойств у нового комплексного препарата, содержащего в качестве действующих веществ наносеребро и протеолитический фермент. Исследование токсичности проводили на здоровых половозрелых аутбредных белых мышках-самцах живой массой 20-24 грамма. Влияние разовой дозы определяли при внутрижелудочном (n=7) и внутрибрюшинном введении (n=7), хроническую ток-

сичность устанавливали путем интробрюшинного введения препарата в течение 14 дней (n=12). Контрольной группе мышей применяли физиологический раствор. Токсическое воздействие лекарства оценивали по изменению поведенческой реакции, аппетита, массы тела, количеству летальных исходов. По окончании эксперимента выживших мышей подвергали эвтаназии, оценивали гематологические свойства крови и состояние внутренних органов. В ходе исследований не удалось установить летальной дозы препарата, так как максимально допустимый объем для внутрижелудочного и интробрюшинного введения (1,0 мл) ее не вызывал. Переносимая доза данного лекарства при однократном и многократном введении составила более 40 000 мг/кг массы тела, что в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 позволяет его отнести к 4 классу токсичности (более 5 000 мг/кг при введении в желудок). Применение препарата в течение двух недель вызывало у мышей незначительные обратимые морфологические изменения крови: гиперхромиию (увеличение гемоглобина на 2,3 г/мл; $P < 0,05$) и более выраженный анизоцитоз эритроцитов (на 2,7%; $P < 0,001$), без каких-либо макроскопических изменений внутренних органов. Таким образом, полученные результаты отражают слабое токсическое действие лекарства, что позволяет перейти непосредственно к клиническим его испытаниям.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск альтернативных способов лечения воспалительных заболеваний микробной этиологии у животных является актуальным направлением ветеринарной науки [4,5,9]. В первую очередь это обусловлено ростом резистентности микроорганизмов к проводимой этиотропной терапии и минимизации остаточных количеств химиотерапевтических препаратов в продуктах животноводства [1,6,8]. С этой позиции особое место стоит уделять препаратам содержащим наночастицы серебра. Серебро в ионном виде обладает бактерицидным, выраженным противогрибковым и антисептическим действием и служит высокоэффективным обеззараживающим средством в отношении патогенных микроорганизмов, вызывающих острые инфекции [2]. Механизм действия серебра на микробную клетку заключается в том, что ионы серебра поглощаются клеточной оболочкой микроба, в результате чего его клетка остается жизнеспособной, но при этом нарушаются ее функции [2,3].

Важным моментом предшествующим клиническому использованию любого лекарственного средства, является оценка его биологической безопасности и определение наличия нежелательных или непредвиденных эффектов от применения, которые устанавливаются на этапе доклинических испытаний.

Целью исследований явилось изучение острой и хронической токсичности комплексного препарата на основе наносеребра и протеолитического фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2020 году в лаборатории кафедры терапии, хирургии, акушерства и заразных болезней Вятской ГСХА. Доклиническое исследование комплексного препарата осуществляли согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [7].

Исследование токсичности проводили на здоровых половозрелых аутбредных белых мышах-самцах, живой массой 20-24 грамма, полученных из вивария Вятской ГСХА. Животные во время опыта находились в одинаковых условиях, получали идентичный корм и имели свободный доступ к воде. На первом этапе исследований была проведена оценка острой токсичности препарата. Влияние разовой дозы определяли при внутрижелудочном и интробрюшинном введении. Для этого сформировали 4 группы мышей (2 подопытных и 2 контрольных) по 7 в каждой. Комплектацию групп осуществлялось по принципу аналогов. Животным подопытных групп, соответствующим способом вводили изучаемое средство в дозе 1,0 мл на животное, контрольным - физиологический раствор. За мышами наблюдали в течение 14 су-

ток, первые 6 часов животные находились под постоянным наблюдением. На втором этапе исследований провели токсикологическую оценку препарата при длительном его применении. Для этого мышам подопытной группы (n=12) в течение 14 дней интробрюшинно инъецировали исследуемый препарат в дозе 1,0 мл, контрольной (n=12) группе применяли физиологический раствор.

Взвешивание лабораторных животных всех групп проводили до кормления перед началом эксперимента, на 1, 3, 7 и 14-е сутки от начала опыта. Интоксикацию организма экспериментальных животных оценивали по клинической картине и выживаемости. При этом учитывали изменения поведения и двигательной активности, массы тела, аппетита и жажды, характера фекальных масс, состояния волосяного и кожного покрова, окраски слизистых оболочек, частоты дыхательных движений. Через 14 дней по окончании опыта экспериментальных животных наркотизировали эфиром, проводили декапитацию и оценивали макроскопические изменения внутренних органов. При оценке хронической токсичности дополнительно часть мышей (n=6) подвергали эвтаназии через сутки после последней инъекции. Во время декапитации получали кровь, которую собирали в пробирки с антикоагулянтом и проводили морфологические исследования на гематологическом анализаторе URIT-3020.

Цифровой материал обработан методом вариационной статистики на достоверность различия сравниваемых показате-

телей в программе Microsoft Excel с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты оценки острой токсичности препарата при внутрижелудочном введении, показали, что в течение первых 10-15 минут после манипуляции, животные как подопытной, так и контрольной групп были незначительно угнетены, затем проявляли рефлекс умывания, а двигательная активность и аппетит у них полностью возвращались по истечению первого часа. Динамика массы тела мышей в подопытной и контрольной группе не отражала достоверно значимых изменений (таблица 1).

При однократном интробрюшинном введении препарата установили, что у мышей подопытной группы в первый час после введения лекарства отсутствовал аппетит, наблюдалось снижение двигательной активности, животные сидели, сгорбившись, глаза были полузакрытые. У единичных мышей наблюдалась кратковременная отдышка. В контрольной группе отмечалась схожая картина. Динамика изменений массы тела животных в обеих группах не имела достоверного отличия, также не отмечена значительная потеря массы тела у отдельных особей (таблица 1). При наблюдении за мышами в течение 14 дней, после однократного введения исследуемого препарата летального исхода не наблюдалось.

Результаты исследования крови от животных подопытных и контрольных

Таблица 1
Динамика массы тела мышей при однократном введении препарата

Время взвешивания	Динамика средней массы животных				К-во мышей со снижением массы тела более чем на 5%	
	внутрижелудочное введение		интробрюшинное введение			
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Исходная масса	23,1±0,9	22,7±0,6	21,9±0,7	21,5±0,8	-	-
Через сутки	23,1±0,9	22,6±0,6	21,8±0,7	21,5±0,7	0	0
Через 3 дня	23,2±0,7	22,7±0,6	22,0±0,8	21,6±0,7	0	0
Через 7 дней	23,1±0,7	22,7±0,6	21,9±0,6	21,7±0,6	0	0
Через 14 дней	23,2±0,7	22,7±0,6	22,0±0,6	21,7±0,6	0	0

Таблица 2
Гематологические показатели мышей при определении острой токсичности препарата (внутрибрюшинное введение)

Показатель	Опыт	Контроль
Лейкоциты, 10^9 /л	12,1±3,0	9,1±0,9
Эритроциты, 10^{12} /л	7,2±0,7	8,2±0,4
Гемоглобин, г/л	83,2±3,1	90,0±5,8
Гематокрит, %	42,5±1,1	44,7±1,7
Средний объем эритроцитов, фл	53,2±0,9	54,5±0,6
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг/мл	10,6±0,3	10,9±0,3
Показатель анизоцитоза эритроцитов, %	13,7±0,5	13,2±0,2
Тромбоциты, 10^9 /л	867,4±45,5	651,0±97,2
Средний объем тромбоцита, фл.	6,0±0,2	6,0±0,1
Показатель анизоцитоза тромбоцитов, %	7,8±0,4	7,7±0,3

Таблица 3
Динамика массы тела мышей при многократном введении препарата

Дни	Средняя масса животных		К-во мышей со снижением массы тела более чем на 5%		Погибло мышей	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Исходная масса	22,3±0,6	21,5±0,5	-	-	-	-
Через сутки	22,3±0,6	21,5±0,5	0	0	0	0
Через 3 дня	22,2±0,6	21,4±0,4	0	0	0	0
Через 7 дней	22,1±0,6	21,3±0,4	2	1	0	0
Через 14 дней	22,3±0,7	21,4±0,3	0	0	1	0
Через 28 дней	23,4±0,5	22,2±0,3	0	0	0	0

групп не имели достоверных отличий (таблица 2).

Таким образом, однократное внутрижелудочное и внутрибрюшинное применение максимально разрешенного объема для введения (1,0 мл) препарата, не вызывало летального исхода, что в пересчете составило 40 000 мг/кг массы одной особи.

При длительном применении исследуемого средства, после каждой инъекции у подопытных животных наблюдалось непродолжительное угнетение, и отсутствие аппетита в первые 30-60 минут, затем двигательная активность полностью восстанавливалась, и животные начинали

поедать корм. Динамика изменений массы в подопытной и контрольной группах (таблица 3) не имела достоверного отличия, однако у двух мышей, которым инъецировали исследуемый препарат и одной, получавшей физиологический раствор через 7 дней после начала эксперимента наблюдалось снижение массы тела более чем на 5% от исходной. На восьмые сутки одна из мышей подопытной группы перестала употреблять корм и погибла, а масса остальных животных вернулась к исходным значениям.

При вскрытии погибшей мыши установили покраснение и гиперемии орга-

Таблица 4

Гематологические показатели при длительном применении препарата

Показатель	Через сутки		Через 14 дней	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Лейкоциты, 10^9 /л	8,7±1,3	9,8±1,3	13,0±4,1	11,7±2,1
Эритроциты, 10^{12} /л	7,7±0,1	7,4±0,8	8,1±0,2	7,2±0,7
Гемоглобин, г/л	86,8±2,8	78,0±3,6	85,3±1,3	74,2±9,4
Гематокрит, %	45,2±1,0	40,3±3,7	45,3±0,7	41,5±2,8
Средний объем эритроцитов, фл	58,7±1,1	55,0±1,2	55,9±1,7	54,1±1,1
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг/мл	10,9±0,3*	8,6±0,7	10,5±0,2	9,8±0,7
Показатель анизоцитоза эритроцитов, %	15,6±0,5**	12,9±0,2	13,2±0,5	13,3±0,4
Тромбоциты, 10^9 /л	769,2±45,6	548,0±126,3	722,5±128,9	639,6±138,8
Средний объем тромбоцита, фл.	6,2±0,2	5,7±0,2	5,3±0,2	5,9±0,2
Показатель анизоцитоза тромбоцитов, %	7,9±0,3	7,7±0,4	6,9±0,5	7,7±0,4

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ по отношению к контролю

нов брюшной полости, а также обширное кровоизлияние на брыжейке толстой кишки, что, по видимости, явилось следствием механического воздействия инъекции. У мышей, подвергнутых эвтаназии через первые сутки и 14 дней после последней инъекции, каких-либо макроскопических изменений со стороны внутренних органов установлено не было.

Сравнивая гематологические показатели (таблица 4), выяснили, что у мышей через сутки после последней инъекции препарата, в подопытной группе наблюдался более выраженный анизоцитоз эритроцитов – на 2,7% ($P < 0,001$), а также большая концентрация гемоглобина в эритроците на 2,3 пг/мл ($P < 0,05$). Морфология крови через две недели после последней инъекции не имела достоверного отличия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов токсикологических исследований комплексного препарата содержащего в своем составе наночастицы серебра и протеолитический

фермент можно заключить, что переносимая доза данного лекарства составляет более 40 000 мг/кг массы тела, что в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 позволяет его отнести к 4 классу токсичности (более 5 000 мг/кг при введении в желудок). Применение препарата в течение двух недель вызывает незначительные обратимые морфологические изменения в крови (гиперхромия и анизоцитоз эритроцитов), без каких-либо макроскопических изменений внутренних органов.

TOXICITY ASSESSMENT OF THE DRUG BASED ON SILVER NANOPARTICLES AND PROTEOLYTIC ENZYME

Nikolaev S. V. - candidate of veterinary Sciences, researcher of the Institute of agrobiotechnology them. A. V. Zhuravsky, Komi scientific center, Ural branch of RAS; Konopeltsev I. G. – doctor of veterinary Sciences, Professor, Glukhova M. V. – candidate of veterinary Sciences, associate Professor, F. A. Sapozhnikov. – candidate of veterinary Sciences, associ-

ate Professor, Norkin, A. G. – applicant of the "Vyatka state agricultural Academy".

ABSTRACT

One of the most relevant areas of veterinary science is the search for new, environmentally safe, antimicrobial drugs. From this position, special attention should be paid to products based on ionized silver. As part of preclinical studies, the toxic properties of a new complex drug containing nanosilver and a proteolytic enzyme as active substances were determined. The toxicity study was performed on healthy sexually mature outbred white male mice with a live weight of 20-24 grams. The effect of a single dose was determined by intragastric (n=7) and intraperitoneal administration (n=7), chronic toxicity was determined by intraperitoneal administration of the drug for 14 days (n=12). A control group of mice was given saline. The toxic effects of the drug were assessed by changes in behavioral response, appetite, body weight, and the number of fatalities. At the end of the experiment, the surviving mice were euthanized, the hematological properties of the blood and the state of internal organs were evaluated. In the course of studies, it was not possible to establish a lethal dose of the drug, since the maximum allowable volume for intragastric and intraperitoneal administration (1.0 ml) did not cause it. The tolerated dose of this drug with single and multiple administration was more than 40,000 mg/kg of body weight, which in accordance with GOST 12.1.007-76 allows it to be classified as class 4 toxicity (more than 5,000 mg/kg when administered in the stomach). The use of the drug for two weeks caused minor reversible morphological changes in the blood in mice: hyperchromia (an increase in hemoglobin by 2.3 PG / ml; P<0.05) and more pronounced anisocytosis of red blood cells (by 2.7%; P<0.001), without any macroscopic changes in internal organs. Thus, the results obtained reflect the weak toxic effect of the drug, which allows us to go directly to its clinical trials.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бледных Л.В. Антимикробные и токсикологические свойства озонированного льняного масла/ Л.В.Бледных, С.В. Николаев, И.Г.

Конопельцев //Ветеринарный врач, 2017.- №3. - С.44-51.

2. Буиклиский В.Д., Сирота А.В., Зайцев А.С., Беспалов А.В., Письменская Н.Д., Сиса Ф., Коба И.С. Формирование биологически активной композиции наночастиц серебра, стабилизированных сополимером акриловой кислоты и акриламида // Нанотехника. - 2008. - №13. - С. 88-93.

3. Муха Ю.П., Еременко А.М., Смирнова Н.П., Мищенко А.И., Корчак Г.И., Горчев В.Ф., Чунихин А.Ю. Антимикробная активность стабильных наночастиц серебра заданного размера//Прикладная биохимия и микробиология. -2013. -Т. 49, № 2. -С. 215.

4. Николаев С.В. Эффективность озонированной эмульсии при профилактике послеродового эндометрита у коров и ее влияние на эндометрий/ С.В. Николаев, И.Г. Конопельцев // Вопросы нормативно - правового регулирования в ветеринарии. - 2019. - № 1. - С. 69 - 74.

5. Новикова Е.Н. Применение нового средства для лечения эндометрита бактериальной и микозной этиологии / Е.Н. Новикова, М.Б. Решетка, И.С. Коба, М.С. Дубовикова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2014. № 3. С. 138-140.

6. Филатов А.В. Антимикробные средства озонированных растворов/А.В.Филатов, И.Г.Конопельцев, Е.В.Черных // Нижегородский медицинский журнал. Озонотерапия. - 2003.

7. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.

8. Bademkiran, S. Comparison of Pelargoniumsidoides, Placebo and Antibiotic Treatment of Chronic Endometritis in Dairy Cows: A Field Trial/S. Bademkiran,D. Kurt,B. Yokusand, R. Celik//Journal of Animal and Veterinary Advances-2009, Volume: 8, Issue: 4, Pages 788-793.

9. Cheong S.H., Nydam D.V., Galvão K.N., Crosier B.M., Gilbert R.O. Cow and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. J. Dairy Sci. 2011, Pages 762-770. DOI: 10.3168/jds.2010-3439