



ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ, ФАРМАЦИЯ

УДК:619:615.637.07

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НОВОГО ПРОТИВОМАСТИТНОГО ПРЕПАРАТА «АЛЬВЕСОЛ»

Британ М.Н. – старший преподаватель, Сайтханов Э.О. – к.б.н., доц., зав.каф. ветеринарно-санитарной хирургии, акушерства и внутренних болезней животных, ФГБОУ ВО ВГАТУ, Капай Н.А. – руководитель научного отдела ООО «Алекс-Анн».

Ключевые слова: хроническая токсичность, аллергизирующие свойства, противомаститный препарат, доклиническое исследование. **Key words:** chronic toxicity, allergic properties, anti-mastitis drug, pre-clinical study



РЕФЕРАТ

Целью данного исследования явилось изучение хронической токсичности и определение аллергизирующих свойств нового противомаститного препарата «Альвесол». Изучение хронической токсичности были выполнены на 3-х опытных и 1-ой контрольной группах крыс линии Wistar.

Для определения аллергизирующих свойств препарата использовали метод накожных аппликаций и конъюнктивальную пробу на кроликах породы «Шиншилла» обоих полов. За время исследования были определены гематологические и биохимические показатели крови, физиологические показатели (ЭКГ, ЧСС, ЧДД, тест «Отрытое поле», суточный диурез, общий анализ мочи). Патоморфологическому исследованию подвергали 30% животных каждой группы через 14 дней после последнего введения препарата. При клиническом осмотре животных опытных и контрольных групп кожа и слизистые имели естественный цвет. По результатам данных динамики живой массы отмечено, что животные опытных групп имели большую скорость роста в сравнении с контрольной. Показатели при периодической поголовной термометрии не выходили за рамки референтного значения физиологической нормы 37,5-39,0 °С. За время проведения эксперимента гибели лабораторных крыс не зарегистрировано. При исследовании аллергизирующих свойств препарата за весь период участки кожи, были без раздражений, эритем, инфильтраций. Результаты исследований конъюнктивальной пробы показали, что число отреагировавших животных составляет менее 50% от группы, а наблюдаемый эффект рассматривается как проявление индивидуальной чувствительности препарата, в соответствии с чем нельзя отнести препарат «Альвесол» к потенциальным аллергенам. На основании комплекса исследований, установлено, что препарат «Альвесол» при длительном применении безвреден для теплокровных животных, не обладает токсичными свойствами при длительном применении, аллергизирующие и местнораздражающие свойства не выражены.

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное решение проблемы обеспечения населения страны полноценным питанием в немалой степени зависит от совершенствования технологии ветеринарно-профилактических мероприятий на основе внедрения в производство новых методов и средств предупреждения и лечения болезней животных [4]. В настоящее время заболеваемость маститами молочных коров является одной из самых острых проблем в молочном скотоводстве. Самой распространённой формой мастита является субклиническая, которая регистрируется у 40-60% лактирующих коров, что снижает качество производимых молочных продуктов [2]. В связи с выше сказанным изыскание новых экологически чистых и эффективных средств профилактики и лечения мастита у коров, не обладающих побочным действием на организм животных и не оказывающих влияние на технологические свойства молока, является актуальной задачей ветеринарной науки и практики [1].

Сотрудниками общества с ограниченной ответственностью «АлексАнн» разработано новое комплексное лекарственной средство «Альвесол» для лечения субклинического мастита и снижения числа соматических клеток в молоке коров. В состав препарата «Альвесол» входят такие природные компоненты как подорожник большой (*Plantago major*), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*), змеиный яд (*Lachesis mutus*), чеснок (*Allium sativum*), биологически активные вещества, которые обладают противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами (стимулируют фагоцитоз), способствуют элиминации патогенной микрофлоры (снижают патогенность и препятствуют размножению микроорганизмов), способствуют регенерации эпителия молочной железы. Необходимым этапом разработки препарата «Альвесол» являлась доклиническая оценка его безопасности. В связи с этим цель наших исследований заключалась в оценке хронической токсичности препарата «Альвесол», а также определе-

ние его алергизирующих и местнораздражающих свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены в условиях научно-исследовательской лаборатории нанотехнологий в животноводстве и растениеводстве ФГБОУ ВО РГАТУ. Хроническую токсичность оценивали на половозрелых самках и самцах крыс линии Wistar, массой 180-200 г и 200-240 г соответственно. Алергизирующие свойства препарата «Альвесол» исследовали в экспериментах на половозрелых самках и самцах кроликов породы «Шиншилла», массой 1,8-2,0 кг и 2,0-2,4 кг соответственно. Лабораторные животные были завезены из питомника Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и корму. Исследования хронической токсичности были выполнены на 3-х опытных группах и 1-ой контрольной группе крыс линии Wistar. Трём опытным группам препарат «Альвесол» вводили внутримышечно ежедневно на протяжении 14 дней в дозах: 0,1 г/кг; 3,6 г/кг; 7,1 г/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор в течение двух недель в дозировке 7,1 г/кг живой массы для моделирования стресса от процедуры введения веществ. Для каждого животного производился перерасчет в соответствии с весом животного. Для определения алергизирующих свойств препарата использовали метод накожных аппликаций и конъюнктивальную пробу. Метод накожных аппликаций был выполнен на 2-х группах животных (кроликах породы «Шиншилла», $m=2\pm0,42$ кг.): опытной с препаратом «Альвесол» и контрольной группе с физиологическим раствором. Аппликации наносились на выстриженный непигментированный участок кожи размером 2×2 см по 5 аппликаций в неделю, на протяжении 14 дней. Действие препарата «Альвесол» на слизистые оболочки глаз определяли однократным нанесением 2 капель растворов на конъюнктиву глаз кроликов: в правый глаз закапывали исследуемый препарат, а в

Таблица №1

Число сердечных сокращений, длительность интервалов ЭКГ
и амплитуда зубцов, n=10 (M±m)

Группа	ЧСС	Продолжительность интервалов, сек				Амплитуда зубцов (П стандартное отведение), mV		
		P	PQ	QRS	QT	P	R	T
Контроль	413,3±4,2	0,012 ±0,003	0,035 ±0,003	0,015 ±0,001	0,05 ±0,01	0,10 ±0,06	0,4 ±0,08	0,2 ±0,03
Опыт 1	397,2±3,1	0,015 ±0,005	0,045 ±0,002	0,020 ±0,004	0,03 ±0,01	0,15 ±0,06	0,6 ±0,04	0,3 ±0,03
Опыт 2	389,7±1,7	0,014 ±0,003	0,040 ±0,004	0,015 ±0,002	0,04 ±0,02	0,10 ±0,04	0,4 ±0,07	0,2 ±0,06
Опыт 3	401,3±2,2	0,017 ±0,004	0,035 ±0,005	0,010 ±0,001	0,02 ±0,01	0,10 ±0,03	0,5 ±0,05	0,2 ±0,04

левый – физиологический раствор. Учет реакции проводили спустя 15 минут, через 24 часа и через 48 часов в баллах по степени покраснения слезного протока. Дизайн исследования, необходимые методы и определяемые параметры регламентировались действующим Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [5]. В экспериментах использовались следующие оборудование: установка «Открытое поле», цифровой термометр Microlife MT 1931 GT, лабораторные весы 2 класса точности ВСТ-600/0,01, потенциометр «Статус-2», автоматический гематологический анализатор ABACUS JUNIOR VET, автоматический биохимический и иммуноферментный анализатор ChemWell 2910 Combi, электрокардиограф «Аксион» ЭК1Т-1/3-07 и др. Гематологические и биохимические показатели крови, физиологические показатели (ЭКГ, ЧСС, ЧДД, тест «Открытое поле», суточный диурез, общий анализ мочи) определяли дважды за период исследования. Патоморфологическому исследованию подвергали 30% животных каждой группы через 14 дней после последнего введения препарата. Патоморфологическое исследование включало в себя аутопсию, макроскопическую оценку состояния органов и тканей, массомет-

рию внутренних органов, а также выборочное гистологическое исследование. Для оценки достоверности разности выборочных средних показателей применяли критерий Стьюдента (t) [7]. Обработка данных проведена на ПК с использованием программы «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам изучения данных динамики живой массы подопытных крыс по сравнению с фоновыми значениями можно отметить, что животные опытных групп отличались более активным приростом массы и набрали в среднем на 8,1% больше, чем животные контрольной группы. Пищевая и питьевая активность у крыс опытных групп была идентична контролю. Полученные данные периодической поголовной термометрии не выявили статистически достоверных различий между животными сравниваемых групп, все показатели не выходили за рамки референтного значения физиологической нормы (37,5-39,0 °C). Функциональное состояние центральной нервной системы изучали при помощи поведенческого теста «Открытое поле». В результате данного эксперимента нами было установлено, что представители всех групп имели характерную для Wistar двигательную [3]. В среднем для всех групп длительность реакции принюхивания составила 46,5 секунд, продол-

жительность реакции замирания 39,8 секунд; длительность реакции груминга 26,4 секунды; вертикальная двигательная активность 11,3; горизонтальная двигательная активность 111,8; актов дефекации 2,2 раза. Состояние сердечно-сосудистой системы оценивали по результатам общеклинического обследования и электрокардиографии. При клиническом осмотре животных опытной и контрольных групп кожа и слизистые имели естественный цвет, сердечный толчок прощупывался и характеризовался умеренной силой, данные аускультации посторонних шумов не выявили. ЭКГ снимали во 2-ом стандартном отведении. Как видно по результатам, представленным в таблице 1, на протяжении всего периода воздействия препарата «Альвесол» со стороны изучавшихся показателей электрокардиограммы всех подопытных групп не отмечено существенных отличий от контроля.

Функциональное состояние почек определяли по результатам общего анализа мочи и данных суточного диуреза. По результатам общего анализа мочи не было выявлено наличия кетонов, лейкоцитов, эритроцитов, нитратов и билирубина. Удельный вес мочи во всех группах не выходил за рамки референтного значения и составлял на 7-й день исследования 1,021 г/см³, на 14 день – 1,022 г/см³. Показатели pH во всех группах приближались к верхней границе физиологической нормы, и составили в среднем 7,0 ед. pH. Изменение показателей глюкозы в моче у животных опытных групп не имели дозозависимого характера и незначительно превышали результаты в контрольной группе. У лабораторных крыс опытных групп введение препарата «Альвесол» не вызвало достоверных изменений в суточном диурезе и составило в среднем на 14 день 13,13 мл, в контроле 13,19 мл. В результате исследований статистически достоверной разницы по общеклиническим показателям крови между сравниваемыми группами крыс не установлено. В среднем на 14 день исследования в опытных группах количество лейкоцитов $7,78 \times 10^9/\text{л}$; эритроцитов

$7,67 \times 10^9/\text{л}$; гемоглобина 145,2 г/л. У контрольных животных количество лейкоцитов $7,53 \times 10^9/\text{л}$; эритроцитов $7,54 \times 10^9/\text{л}$; гемоглобина 141,5 г/л. Для изучения токсического действия препарата «Альвесол» на печень исследовали АЛТ и АСТ в сыворотке крови. Достоверной разницы между опытными группами и контролем выявлено не было. В среднем в опытных группах АЛТ составило 87,5 Ед/л, АСТ 63,9 Ед/л и соответствовало физиологической норме. За время проведения эксперимента гибели лабораторных крыс не зарегистрировано. В результате патолого-анатомического вскрытия установили, что все опытные животные нормально упитаны, имеют правильное телосложение, волосяной покров равномерно прилегает к телу, блестящий, аллопеции отсутствуют, целостность зубов сохранена. Видимые слизистые оболочки бледной окраски, блестящие, целостность не нарушена. Скопление жидкости в грудной и брюшной полостях не выявлено. Внутренние органы грудной и брюшной полости топографически правильно расположены. Паритетальный и висцеральный листки плевры и брюшины тонкие, блестящие, гладкие. Определение относительной массы органов подопытных крыс не выявило существенных отличий от контроля при воздействии препарата в изученных дозах. По результатам микроскопического исследования, каких либо отклонений от нормального строения органов не выявлено, признаков дистрофических изменений не установлено.

Печень имеет характерное, балочное строение (рисунок 1). Признаков токсического повреждения печени не выявлено. Кровенаполнение умеренное, признаки дистрофии гепатоцитов отсутствуют. Гепатоциты обычных размеров, ядра округлой формы, расположены центрально. Цитоплазма имеет отдельные вакуоли и нежную зернистость.

За весь период исследования участки кожи, были без раздражений, эритем, инфильтраций. Температура тела кроликов в контрольной группе оставалась в пределах физиологической нормы, ее есте-

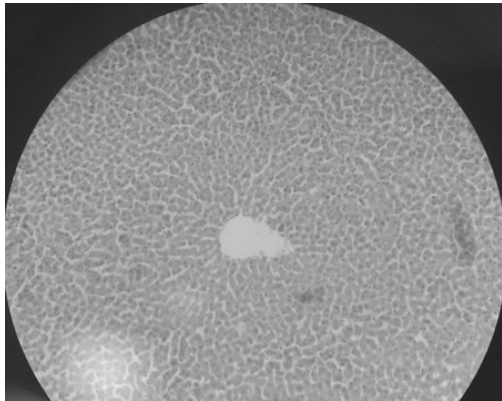


Рис.1 - Гистологическое исследование срезов печени крыс (опытная группа)

ственные колебания не переходили за пределы статистической значимой разницы с исходным состоянием. Для постановки конъюнктивной пробы животных сенсibilizировали внутримышечным введением терапевтической дозой препарата «Альвесол» за 14 дней. В результате, после закапывания через 15 минут у одного животного (№11, опытная группа) отмечалось покраснение всей конъюнктивы в обоих глазах, у остальных животных изменений не отмечалось. Через 24 часа так же животные опытной группы не отличались от контрольных, кроме кролика №11, что могло быть обусловлено индивидуальными особенностями и повышенной иммунобиологической реактогенностью. Через 48 часов в опытной группе изменений не наблюдалось ни у одного животного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты опыта по установлению хронической токсичности при внутримышечном введении испытуемого препарата в дозах, составляющих 0,1 г/кг, 3,6 г/кг и 7,1 г/кг на животное не выявили его токсического действия на организм лабораторных животных. Результаты исследований алергизирующих свойств препарата показали, что число отреагировавших животных составляет менее 50% от группы (конъюнктивальная проба), а наблюдаемый эффект рассматривается как про-

явление индивидуальной чувствительности препарата, в соответствии с чем нельзя отнести препарат «Альвесол» к потенциальным алергенам. Таким образом, на основании комплекса исследований, установлено, что препарат «Альвесол» при длительном применении безвреден для теплокровных животных и не обладает токсичными свойствами. Аллергизирующие и местно-раздражающие свойства не выражены.

Determination of chronic toxicity and allergenic properties of the new anti-mastitis drug "Alvesol". Britan M.N., Saytkhanov E.O., Kapay N.A.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate chronic toxicity and determination of allergenic properties of new anti-mastitis preparation "Alvesol". Chronic toxicity studies were performed on 3 experimental and 1th control groups of Wistar rats. To determine the allergenic properties of the drug used the method of cutaneous applications and conjunctival test on rabbits of the breed "Chinchilla" of both sexes. During the study, hematologic and biochemical blood indices were determined, physiological parameters (ECG, HR, HR, "Open field" test, daily diuresis, general urine analysis). Pathomorphological examination was performed on 30% of the animals of each group 14 days after the last administration of the preparation. During clinical examination of animals of the experimental and control groups, the skin and mucous membranes had a natural color. According to the results of these dynamics of live weight, it was noted that the animals of the experimental groups had a high growth rate in comparison with the control one. The indicators for periodic thermometry were within the reference physiological norm of 37.5-39.0 ° C. During the experiment, no death of laboratory rats was recorded. In the study of allergic properties of the drug for the entire period of the skin, there were no irritations, erythema, infiltration. The results of the conjunctival test showed that the number of reacted animals is less than 50% of the group, and the observed effect is considered as a manifestation of the

individual sensitivity of the drug, according to which the "Alvesol" preparation can not be classified as a potential allergen. Based on the complex of studies, it is established that the drug "Alvesol" for long-term use is harmless for warm-blooded animals, does not have toxic properties during long-term use, allergic and local irritant properties are not expressed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Войтенко, Л.Г. Нетрадиционная терапия коров при мастите/ Л.Г. Войтенко, А.А. Дробышевская, В.В. Чекрышева, А.С. Картушина// Ветеринарная патология. - 2013. - №1 - С.8-11.
2. Ирхина, В.К. Эффективность гомеопатического препарата «Мастометрин» при лечении мастита молочных коров/ В.К. Ирхина, Н.С. Голайдо, М.Е. Остякова, Н.Н. Малкова, Е.В. Воскобойникова// Вестник КрасГАУ. - 2015. - №12. - С.260-264.
3. Мельников, А.В. Сравнение поведения в тесте «открытого поля» крыс линии Wistar и белых беспородных крыс/ А.В. Мельников, М.Р. Новикова, М.А. Куликов// Материалы VI Международной междисциплинарной конференции по биологической психиатрии «Стресс и поведение». - 2001. - №6 - С.563.
4. Ржанникова, И.С. Фармакотоксикологическая оценка препарата/ И.С. Ржанникова// Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. - 2010. - №2. - С.324-330.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ под общей редакцией члена корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. М.: ОАО Издательство «Медицина». – 2005. – 832 с.
6. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина. -1975. – 290 с.

ИНФОРМАЦИЯ

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц. Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургской академии ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35, Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**