

Токсикологическая оценка препарата при парентеральном введении

О.А. Грачёва, к.в.н., М.Г. Зухрабов, д.в.н., профессор, З.М. Зухрабова, к.в.н., ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ

В соответствии с задачей обеспечения животноводства страны высокоэффективными и безопасными ветеринарными препаратами всё более актуальными становятся вопросы изучения токсических свойств новых лекарственных средств. Основой лекарственной токсикологии является оценка соотношения терапевтической ценности препарата и тех нежелательных эффектов, которые могут возникнуть при его применении. Это значит, что экспериментальное исследование безвредности нового лекарственного средства имеет в настоящее время не меньшее значение, чем оценка его фармакологической активности.

Целью настоящего исследования явилось определение острой и хронической токсичности при парентеральном введении новой композиции, разработанной на кафедре терапии и клинической диагностики с рентгенологией ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ».

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнялись на белых нелинейных крысах обоего пола массой 200–210 г и кроликах-самцах породы шиншилла со средней массой 2,0–2,3 кг. Животных распределяли по группам методом аналогов. Основные условия содержания и ухода соответствовали Приказу МЗ СР РФ № 708н от 23 августа 2010 г. «Правила лабораторной практики» [1], а также правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.).

Объектом для токсикологического исследования была новая композиция, включающая янтарную кислоту и органическое соединение фосфора.

Для определения острой токсичности препарата методом Кербера было сформировано пять групп крыс, в каждой по 12 особей с массой тела 190–210 г, в качестве контроля – животные, которым внутримышечно вводили однократно дистиллированную воду в максимально допустимом объёме, равном 10 мл. Диапазон исследуемых доз препарата составлял 1–26,4 мл/кг массы тела. Дозы рассчитывали в соответствии с установленными требованиями [2].

Регистрировали следующие показатели: оценка общего состояния (клиническая картина, масса тела, смертность, признаки токсичности, ректальная температура), в конце опыта проводили патоморфологическое исследование (вскрытие).

Определение хронической токсичности проводили с учётом результатов исследования острой токсичности и ранее проведённого подробного исследования хронической токсичности при

пероральном введении препарата [3, 4]. Были сформированы пять групп кроликов, по три особи в каждой. Испытывались дозы препарата, аналогичные ранее проведённым исследованиям (1/20 ЛД₅₀ – 1/80 ЛД₅₀ соответственно 1,32; 0,66; 0,495; 0,33 мл/кг). Пятая группа была интактной. Длительность опыта составляла 30 сут. ежедневного введения препарата в соответствии с требованиями по оценке хронической токсичности [5–8].

У животных до опыта, на 15-е и 30-е сут. проводили отбор крови для исследования гематологических показателей. По окончании опытов кролики подвергались эвтаназии в СО₂-камере для вскрытия и патоморфологического исследования.

Результаты исследования. При определении острой токсичности препарата при парентеральном введении в дозах включительно до 26,4 мл/кг летальных эффектов достичь не удалось. Зависимые от дозы препарата эффекты представлены в таблице 1.

1. Токсичность препарата при внутримышечном введении крысам

Доза, мл/кг	6,4	11,4	16,4	21,4	26,4
Эффект, пало/всего	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Клиническим наблюдением установлено, что поведение подопытных крыс всех групп, которым внутримышечно вводили препарат, не отличалось от такового интактных животных на всём протяжении опыта. Клинически выраженных признаков интоксикации выявлено не было.

Не было обнаружено статистически достоверного изменения массы тела крыс, которым вводили препарат, в сравнении с показателями у интактных животных (табл. 2).

После окончания эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии для патоморфологического исследования. По данным вскрытия и макроскопического исследования изучаемых органов различий между животными, получившими различные дозы препарата, не установлено.

Проведённое исследование по определению хронической токсичности показало, что при использовании испытуемого препарата живая масса животных в течение эксперимента увеличивалась как в контрольной, так и в опытных группах. Увеличение живой массы тела у подопытных животных относительно исходных показателей на 15-е сутки в I опытной группе составляло 15,0%, во II – 15,5%, в III – 12,8%, в IV – 13,3%, а в контрольной группе – 6,4%, на 30-е сутки – соответственно на 20,2; 28,5; 23,6; 21,2 и 12,8%.

По результатам морфологических исследований у кроликов I опытной группы по содержанию в периферической крови эритроцитов на 15-е сутки опыта отмечали достоверное ($P < 0,05$) относительно фоновых величин увеличение на 7,2%, на 30-е сутки количество увеличилось на 5,1%, но статистически было недостоверно ($P > 0,05$); во II гр. на 15-е сутки опыта отмечали достоверный ($P < 0,05$) относительно фоновых и величин контрольной группы рост на 10,2%, на 30-е сутки сохранялось достоверное увеличение на 8,4% ($P < 0,05$), в III гр. показатели увеличились соответственно на 5,6 и 3,5%.

Регистрировали увеличение содержания гемоглобина в крови кроликов I гр. на 15-е и 30-е сутки на 7,2 и 5,0% соответственно ($P > 0,05$), II – соответственно срокам на 10,2 и 8,4% ($P < 0,05$), III – на 7,5 и 5,4% ($P > 0,05$) соответственно. В крови кроликов IV и V подопытных групп достоверного изменения содержания эритроцитов, гемоглобина, а лейкоцитов во всех группах не отмечали. При изучении лейкоцитарной формулы крови кроликов всех подопытных групп достоверных изменений не выявлено.

Таким образом, проведённое исследование показало, что испытуемый препарат при длительном введении в рацион кроликов в вышеприведённых дозах не вызывает негативного воздействия на морфологические параметры. Препарат оказывает стимулирующее действие, наиболее выражено оно было при использовании в дозе 1/40 от максимально вводимой дозы.

Данные биохимического анализа белкового обмена достоверных изменений относительно контрольной группы не выявили. Содержание общего белка в сыворотке крови кроликов I–IV опытных групп к 15-м суткам увеличилось на 8,1 ($P > 0,05$); 13,5 ($P < 0,05$); 10,0 и 4,7% ($P > 0,05$) соответственно по сравнению с исходными величинами. На 30-е сутки в сыворотке крови животных I, II, III и IV опытных групп увеличение количества общего белка составляло 6,2 ($P > 0,05$); 12,0 ($P < 0,05$); 7,5 ($P > 0,05$) и 3,3% ($P > 0,05$) соответственно. Следует отметить, что по содержанию белка наблюдался выраженный дозозависимый эффект, который сохранялся более длительно у животных, получавших препарат в дозе 0,66 мл/кг.

Процентное содержание различных фракций белка в сыворотке крови кроликов опытных групп на всех сроках исследования по сравнению с контролем и фоновыми показателями достоверно не изменялось ($P > 0,05$) и было в пределах физиологических границ.

Результаты проведённого иммунологического исследования представлены в таблице 3. При введении препарата в дозе 1/20 от максимально вводимой на 15-е сутки исследования отмечали увеличение фагоцитарной активности (ФА) на 3,9%, к 30-м суткам – незначительное снижение. Фагоцитарное число к 15-м и 30-м суткам опыта увеличилось соответственно на 4,5 ($P > 0,05$) и 0,9% ($P > 0,05$); фагоцитарный индекс (ФИ) практически не изменился; лизоцимная активность (ЛАСК) возросла на 12,9 ($P > 0,05$) и 6,5% ($P > 0,05$); фагоцитарная ёмкость (ФЕ) возросла к 15-м суткам на 9,1% ($P > 0,05$) и незначительно снизилась к 30-м. Количество Т-лимфоцитов к 15-м и 30-м суткам возросло на 6,8 ($P > 0,05$) и 3,0% ($P > 0,05$), В-лимфоцитов – на 17,5 ($P > 0,05$) и 5,4% ($P > 0,05$) относительно исходных данных.

При введении препарата в дозе 1/40 от максимально вводимой на 15-е и 30-е сутки исследования отмечали увеличение фагоцитарной активности соответственно на 8,9 и 5,9% ($P > 0,05$). Фагоцитарное число к 15-м и 30-м суткам опыта увеличилось соответственно на 9,4 и 5,2% ($P > 0,05$), фагоцитарный индекс практически не изменился, лизоцимная активность возросла на 16,8 и 5,1% ($P > 0,05$), фагоцитарная ёмкость – на 16,2 и 9,3% ($P > 0,05$). Количество Т-лимфоцитов к 15-м и 30-м суткам повысилось на 9,0 и 6,0% ($P > 0,05$), В-лимфоцитов – на 22,0 и 5,2% ($P > 0,05$) относительно исходных данных.

При введении препарата в дозе 1/60 от максимально вводимой на 15-е и 30-е сутки исследования отмечали увеличение фагоцитарной активности соответственно на 6,2 и 2,1% ($P > 0,05$). Фагоцитарное число к 15-м и 30-м суткам опыта увеличилось соответственно на 6,1 и 2,0% ($P > 0,05$), фагоцитарный индекс практически не изменялся, лизоцимная активность возрастала на 16,2 и 2,5% ($P > 0,05$), фагоцитарная ёмкость – возрастала на 11,4 и 4,0% ($P > 0,05$). Количество Т-лимфоцитов к 15-м и 30-м сут. увеличилось на 6,6 и 4,4%

2. Масса тела крыс при внутримышечном введении препарата, г ($n=6$; $X \pm S_x$)

Группа животных, доза препарата	Фон		14-е сут.	
	самцы	самки	самцы	самки
I – 6,4 мл/кг	204,67±4,7	205,50±4,22	205,00±4,65	205,50±4,32
II – 11,4 мл/кг	200,33±4,18	204,50±4,77	200,33±4,23	201,17±5,47
III – 16,4 мл/кг	205,17±4,51	200,50±5,68	204,67±4,52	202,50±5,80
IV – 21,4 мл/кг	200,00±5,00	203,67±4,32	205,83±5,29	205,33±4,46
V – 26,4 мл/кг	205,40±4,77	205,10±4,36	203,38±4,48	200,83±4,24
Дист. вода	201,83±4,94	203,50±4,71	202,50±5,10	204,15±4,75
Контроль	200,00±5,00	204,17±4,33	204,17±5,32	207,50±4,52

3. Иммунологические показатели крови кроликов в опыте по изучению хронической токсичности препарата ($X \pm Sx$)

Доза препарата	Срок исследования, масса тела, кг		
	фон	15-е сут.	30-е сут.
I гр., 1/20 LD ₅₀			
ФА, %	57,07±3,01	59,36±0,78	57,05±2,05
ФЧ	3,63±0,22	3,80±0,14	3,66±0,14
ФИ	6,36±0,22	6,40±0,18	6,43±0,26
ФЭ, ×10 ³	29,00±2,47	31,65±2,29	28,87±1,82
ЛАСК, %	25,66±0,81	29,00±1,87	27,33±1,63
Т-лимфоциты, %	43,66±1,08	46,66±0,81	45,00±0,70
В-лимфоциты, %	24,66±2,16	29,00±2,54	26,00±1,87
II гр., 1/40 LD ₅₀			
ФА, %	51,59±1,48	56,20±1,41	54,32±0,79
ФЧ	3,16±0,14	3,46±0,10	3,33±0,10
ФИ	6,13±0,10	6,16±0,04	6,13±0,10
ФЭ, ×10 ³	24,08±1,95	27,98±1,94	26,32±1,69
ЛАСК, %	25,66±1,77	30,00±1,41	27,00±0,70
Т-лимфоциты, %	44,33±1,77	48,33±0,81	47,00±0,70
В-лимфоциты, %	25,66±0,40	31,33±1,08	27,00±0,70
III гр., 1/60 LD ₅₀			
ФА, %	52,35±2,94	55,62±1,16	53,46±0,81
ФЧ	3,26±0,22	3,46±0,10	3,33±0,10
ФИ	6,23±0,10	6,23±0,16	6,23±0,14
ФЭ, ×10 ³	25,28±1,81	28,18±1,59	26,31±1,95
ЛАСК, %	26,66±2,16	31,00±1,41	27,33±1,77
Т-лимфоциты, %	45,33±1,77	48,33±1,08	47,33±1,08
В-лимфоциты, %	25,66±2,16	28,66±1,77*	26,66±1,08
IV гр., 1/80 LD ₅₀			
ФА, %	56,67±2,53	57,71±1,71	57,06±2,85
ФЧ	3,5±0,25	3,6±0,18	3,46±0,24
ФИ	6,16±0,21	6,23±0,17	6,06±0,14
ФЭ, ×10 ³	25,47±3,08	26,45±3,06	25,78±3,03
ЛАСК, %	27,66±1,63	29,33±0,81	28,33±1,08
Т-лимфоциты, %	44,00±2,54	47,00±1,87	44,66±1,08
В-лимфоциты, %	25,00±0,70	26,33±1,47	25,66±0,40
V гр., интактная			
ФА, %	50,77±1,46	52,46±1,71	51,33±0,64
ФЧ	3,13±0,17	3,23±0,10	3,20±0,12
ФИ	6,16±0,22	6,16±0,17	6,23±0,21
ФЭ, ×10 ³	23,30±3,65	24,02±2,93	23,68±2,91
ЛАСК, %	26,66±2,16	27,33±1,08	27,33±1,63
Т-лимфоциты, %	43,66±1,77	44,66±1,08	44,00±1,41
В-лимфоциты, %	24,66±1,47	25,33±1,63	25,00±0,70

Примечание: * – различия с контролем достоверны, $P < 0,05$

($P > 0,05$), В-лимфоцитов – на 11,6 и 3,8% ($P > 0,05$) относительно исходных данных.

При введении препарата в дозе 1/80 от максимально вводимой на 15-е и 30-е сутки исследования отмечали лишь незначительные и статистически недостоверные ($P > 0,05$) изменения фагоцитарной активности, фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса. Таким образом, значения изучаемых функциональных и количественных показателей иммунной системы опытных кроликов на фоне длительного применения препарата в течение первых 15 суток исследования имели тенденцию к повышению и нормализации в дальнейшем к контрольным значениям. Наиболее выраженное благоприятное воздействие препарата отмечено в дозе 1/40 от максимально вводимой дозы (0,66 мл/кг живой массы).

Живая масса животных с течением эксперимента увеличивалась как в контрольной, так и в опытных группах. Увеличение живой массы тела у подопытных животных относительно исходных показателей на 15-е сутки в I опытной группе составляло 15,0%, во II – 15,5%, в III – 12,8%, в IV – 13,3%, а в контрольной группе – 6,4%. Увеличение живой массы тела у подопытных животных относительно исходных показателей на 30-е сутки в I опытной группе было выше на 20,2%, во II – на 28,5%, в III – на 23,6%, в IV – на 21,2%, а в контрольной группе – на 12,8%.

Таким образом, проведенное исследование показало, что при использовании испытуемого препарата на 15-е и 30-е сутки эксперимента в опытных группах прирост живой массы кроликов был выше, чем в контроле.

В ходе гистологического исследования кроликов подопытных групп и биологического контроля какие-либо отклонения от нормы не были выявлены. Во всех представленных образцах печени строение на дольки было слабо выраженное, сосуды расширены, неравномерно заполнены эритроцитами и эритроцитами, гомогенными эозинофильными массами. Дольки были разделены тонкими прослойками соединительной ткани. Вены в центре долек тонкие, просветы их расширены, содержали эритроциты. Гепатоциты эозинофильно окрашены, в некоторых определялось по два ядра.

Выводы. По результатам исследования острой токсичности препарата при внутримышечном введении кроликам обоего пола установлено, что препарат не оказывает токсического действия. Результаты исследования острой токсичности позволяют отнести препарат к VI классу относительно безвредных лекарственных веществ [9] или к IV классу малотоксичных соединений (ГОСТ 12.1.007-76).

По результатам исследования хронической токсичности препарата на кроликах установлено, что препарат в дозах 1/20–1/80 ЛД₅₀ не оказывает токсического действия. Введение препарата внутримышечно в течение 30 суток не оказывает отрицательного воздействия на общее состояние животных, прирост массы тела, морфологические показатели крови, биохимические показатели сыворотки крови, показатели неспецифической резистентности.

Данные некропсии продемонстрировали, что препарат не вызывает у животных патологических изменений внутренних органов, многократное вве-

дение не сопровождается местно-раздражающим действием в месте введения. При гистологическом исследовании печени отклонения от нормы и признаки токсического поражения печени не выявлены.

При этом наилучшие результаты по итогам исследования получены при использовании испытуемого препарата в дозе 1/40 от максимально вводимой (0,66 мл/кг живой массы). Достоверно выраженный стимулирующий эффект достигается достаточно быстро – уже на второй неделе применения.

Литература

1. Правила лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н, г. Санкт-Петербург. Зарегистрирован в Минюсте РФ 13 октября 2010 г. Регистрационный № 18713.
2. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунытян, А.Н. Васильев [и др.]. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
3. Грачева О.А., Зухрабов М.Г. Изучение эмбриотоксических и тератогенных свойств препарата «Янтовет» // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. № 2. С. 281–284.
4. Грачева О.А., Мухутдинова Д.М. Острая токсичность и кумулятивные свойства нового метаболического препарата // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. № 2. С. 284–286.
5. Курляндский Б.А. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского и В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. 606 с.
6. Прозоровский В.Б., Прозоровская М., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и её ошибки // Фармакология и токсикология. 1978. № 4. С. 497–502.
7. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / Под ред. проф. И.В. Саноцкого. М.: Медицина, 1970. 343 с.
8. Трахтенберг И.М. Проблема нормы в токсикологии / Под ред. проф. И.М. Трахтенберга. М.: Медицина, 1991. 204 с.
9. Hodge H. Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimore, 1975. 427 p.