

МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

НАУКОВО-ТЕХНІЧНИЙ БЮЛЕТЕНЬ

ДЕРЖАВНОГО НАУКОВО-ДОСЛІДНОГО КОНТРОЛЬНОГО ІНСТИТУТУ
ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК

І
ІНСТИТУТУ БІОЛОГІЇ ТВАРИН



Львів, 2017. — Випуск 18, № 2

ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ ГОСТРОЇ І ПІДГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ АНТИБІОТИКА ДОКСИЦИКЛІН

І. П. Патерега, канд. вет. наук, с. н. с.

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

У статті наведені результати вивчення токсичності препарату основі антибіотика доксицикліну гіклату - доксал. Встановлено, що препарат Доксал належить до 4-го класу токсичності, тобто до малотоксичних речовин. Результати тривалого (14 днів) застосування препарату Доксал білим щурам свідчать, що підтримання гомеостазу показників червоної і білої крові відбувалося за рахунок витрат запасів депо селезінки і втрати маси тіла тварин. При введенні білим щурам даного препарату в дозі, яка в 10 разів перевищує терапевтичну, відбуваються функціональні зміни в печінці і легенях, зменшуються обмінні процеси в організмі тварин, підтримуються імунітет і окисно-відновні процеси за рахунок використання резервів. Макроскопічна та мікроскопічна структура досліджуваних внутрішніх органів щурів, яким застосовували препарат Доксал впродовж 14 днів збережена. Гістологічно встановлено вогнищеве дистрофічно-некротичне ураження гепатоцитів та застійні явища у печінці, клітинне спустошення білої пульпи та наявність великої кількості еритроцитів у селезінці щурів які отримували 10-кратну терапевтичну дозу.

Ключові слова: ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ, ПІДГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ, ВЕТЕРИНАРНІ ПРЕПАРАТИ, ЛАБОРАТОРНІ ТВАРИНИ.

Антибіотики нині є одними із найбільш поширених лікарських препаратів. При цьому практика їх застосування рясніє прикладами нераціонального і малоефективного призначення, які можна пояснити недостатнім знанням їх властивостей, токсичності та методів застосування.

Завданням роботи було встановлення токсичності препарату Доксал (діюча речовина препарату – антибіотик доксицилін) на лабораторних тваринах при одноразовому (“гостра токсичність”) та довготривалому введенні (“підгостра токсичність”).

Дослідження проводили відповідно до методичних рекомендацій “Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин”, “Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів” і “Доклінічні дослідження лікарських засобів” [1–3].

Матеріали і методи. Вивчення гострої токсичності препарату

Параметри гострої токсичності препарату Доксал досліджували на 30 білих мишах 2-3-місячного віку, масою 19–22 г та 30 білих щурах, віком 2–3 місяці, масою 180–200 г. Препарат вводили внутрішньошлунково, одноразово.

Для встановлення токсичності препарату Доксал для білих мишей і білих щурів було застосовано дози: 2500, 7500 та 12500 мг/кг на тварину. На кожну дозу було використано по 6 лабораторних тварин.

Дозу 12500 мг/кг маси тіла тварини було введено повторно на подвійній кількості білих мишей і щурів.

Після введення препарату, спостереження за лабораторними тваринами вели протягом 14 днів. При цьому враховували такі показники: зовнішній вигляд, поведінку тварин, стан шерсті, видимих слизових оболонок, відношення до корму, ритм, частоту дихання, час

виникнення та характер інтоксикації, її важкість, перебіг.

Вивчення токсичності препарату Доксал у підгострому досліді

При вивченні підгострої токсичності керувалися результатами, отриманими під час проведення гострої токсичності. Препарат вводили внутрішньошлунково щоденно. Упродовж досліді проводили спостереження за клінічним станом та поведінкою тварин.

Підгостру токсичність вивчали на 18 білих щурах, масою 180–200 г. Було сформовано 3 однакові за кількістю та масою групи, по 6 щурів кожна. I група тварин була контрольною. Їм вводили воду. Тваринам інших двох груп вводили ДОКСАЛ у дозах: II група – терапевтична – 50 мг/кг маси тіла, та III група – десятикратна терапевтична – 500 мг/кг маси тіла. У підгострому досліді Доксал вводили щурам протягом 14 діб.

На наступну добу після закінчення введення препарату лабораторних тварин декапітували, відбирали проби крові, проводили гематологічні і біохімічні дослідження за загальноновизнаними методиками та розтинали і визначали масу органів, порівняно з контрольною групою. Тварин зважували на початку і в кінці досліді, вираховували коефіцієнти маси внутрішніх органів [4].

Для гематологічних досліджень використовували кров стабілізовану ЕДТА, а для біохімічних досліджень – сироватку крові. В стабілізованій крові визначали: вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів, гематокрит, кількість лейкоцитів – за допомогою гематологічного аналізатора Mythic-18. У сироватці крові визначали: загальний білок за допомогою рефрактометра РФ-22, активність ферментів (АлАТ, АсАТ, ЛДГ), вміст загального білірубину, креатиніну, сечовини за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора HumaLyzer 3000 з використанням стандартних наборів фірми Human. Фракційний склад білків (альбуміни, α_1 -, α_2 -, β - і γ -глобуліни) сироватки крові визначали методом електрофорезу на ацетаті целюлози за допомогою приладу для мікронального електрофорезу Scan Power 300 та Scanion Lira 400, Hospitex Diagnostics.

Матеріал для гістологічного дослідження фіксували в 10 % нейтральному розчині формаліну з наступною заливкою в парафін. Гістозрізи виготовляли на санному мікротомі МС-2, фарбували гематоксиліном та еозином. Мікроскопію проводили з допомогою мікроскопа OLIMPUS CX-41 [5].

Результати й обговорення. Вивчення гострої токсичності

У результаті досліджень встановлено, що після введення препарату в дозах 2500, 7500 і 12500 мг/кг всі тварини залишалися живими. Змін в клінічному стані тварин дослідних груп не спостерігали. Дані досліджень подані в таблицях 1 і 2.

Таблиця 1

Показники токсичності препарату на білих мишах

Кількість тварин у групі	Доза препарату, мг/кг	Число загиблих тварин		
		всього	у %	середній час загибелі
6	2500	0	0	0
6	7500	0	0	0
6	12500	0	0	0
12	12500	0	0	0

Таблиця 2

Показники токсичності препарату на білих щурах

Кількість тварин у групі	Доза препарату, мг/кг	Число загиблих тварин		
		всього	у %	середній час загибелі
6	2500	0	0	0
6	7500	0	0	0
6	12500	0	0	0
12	12500	0	0	0

Таким чином, препарат Доксал належить до малотоксичних речовин – 4 клас згідно зі СОУ 85.2-37-736:2011 [6]. ЛД₅₀ за його внутрішньошлункового введення лабораторним тваринам (білим мишам і щурам) є більшою за 12500 мг/кг.

Результати дослідження токсичності препарату Доксал у підгострому досліді

При проведенні дослідів з вивчення підгострої токсичності загибелі лабораторних щурів не встановлено. На 14-ту добу дослідів за введення препарату у 2 дослідній групі (10-кратна терапевтична доза) виявлено достовірне збільшення маси печінки, а в двох дослідних групах достовірне зменшення ваги дослідних тварин. (табл. 3).

Таблиця 3

Коефіцієнти маси внутрішніх органів білих щурів на 15-ту добу за вивчення підгострої токсичності препарату Доксал (M±m, n=18)

Внутрішні органи	Дози препарату		
	Контрольна	1 група	2 група
Печінка	31,3±1,3	30,6±1,2	36,6±1,0**
Нирка права	3,58±0,11	3,68±0,15	3,73±0,09
Нирка ліва	3,4±0,07	3,5±0,11	3,5±0,06
Селезінка	3,98±0,16	3,45±0,17*	3,87±0,18
Серце	3,4±0,16	3,67±0,19	3,6±0,07
Легені	7,4±0,4	9,2±0,8	10,03±0,8*
Маса тіла тварин	247,5±7,0	205,0±4,2***	212,0±5,2**

Примітка: у цій і наступних таблицях: * - p<0,05, ** - p<0,01

Аналіз отриманих результатів після 14-добового застосування препарату Доксал (табл. 3) показує, що у білих щурів знижується жива маса тіла. Десятикратна доза препарату приводила до вірогідного підвищення коефіцієнтів маси печінки, легень у тварин; при цьому проявляється тенденція до зменшення кількості лейкоцитів на тлі достовірного підвищення рівня лімфоцитів та зменшення нейтрофілів (табл. 4), статистично збільшувався об'єм еритроцитів (MCV).

Таблиця 4

Морфологічні показники крові білих щурів на 15-ту добу тривалого дослідів за вивчення підгострої токсичності препарату Доксал (M±m, n=18)

Показники	Контрольна група	1 група (терапевтична доза)	2 група (10-кратна доза)
Гемоглобін, г/л	141,0±2,8	135,8±3,5	131,0±6,4
Еритроцити, Т/л	6,7±0,2	6,6±0,1	6,1±0,3
Лейкоцити, г/л	16,2±2,5	16,0±1,3	10,8±0,5
Нейтроф. (сегм),%	18,0±1,2	18,0±3,4	10,7±0,7*
Лімфоцити, %	71,3±4,0	74,7±4,0	84,0±1,2*
Моноцити, %	7,3±0,7	7,3±0,7*	5,3±0,7
Гематокрит, %	38,4±0,8	37,3±0,7	36,2±1,8
МСН, пг	20,9±0,2	20,4±0,3	21,5±0,2
МСНС, г/дл	36,5±0,2	36,4±0,3	36,3±0,3
MCV, мкм	57,3±0,6	56,5±0,8	59,3±0,4*

За умов застосування терапевтичної дози препарату в сироватці крові проявляється тенденція до підвищення активності ензимів АлАТ і АсАТ, α-глобулінів (табл. 5), зниження коефіцієнтів маси селезінки (табл. 5). 14-добове застосування 10-кратної дози препарату приводило до зниження в сироватці активності АлАТ, збільшення рівня сечовини, α і γ-глобулінів, зменшення рівня β-глобулінів. Підвищення концентрації в крові сечовини, α і γ-глобулінів, збільшення коефіцієнтів маси печінки і легень на тлі зменшення ваги тіла щурів може вказувати на зниження синтетичних процесів в організмі. Підвищення коефіцієнтів маси

легень, незмінність маси нирок на тлі зниження маси тіла тварин вказує на затримку процесів виділення, перевантаження імунної системи організму.

Таблиця 5

Біохімічні показники крові білих щурів на 15-ту добу дослідження при вивченні підгострої токсичності препарату Доксал ($M \pm m$, $n=18$)

Показники		Контрольна група	1 група (терапевтична доза)	2 група (10-кратна доза)
АлАТ, Од/л		88,0±6,4	95,9±5,4	64,6±3,7*
АлАТ _с , Од/л		173,2±20,6	233,6±8,5*	202,5±16,2
ЛДГ, Од/л		2811,3±117,2	2860±124,2	2733±323,4
Загальний білірубін		3,9±0,7	3,6±1,2	4,0±0,4
Креатинін		92,4±1,8	90,5±4,4	90,1±2,9
Сечовина		4,2±0,2	4,4±0,4	5,2±0,1**
Заг. білок		69,3±1,6	67,6±0,9	75,3±2,25
Альбуміни		49,0±0,9	50,2±0,99	50,08±2,3
Глобуліни, %	α1	1,9±0,9	3,08±0,2**	4,2±0,4**
	α2	6,6±1,0	7,9±1,3	8,8±0,1
	β	24,8±0,8	21,7±2,3	14,8±1,4**
	γ	17,6±1,0	17,2±1,5	22,1±1,2*

За умов застосування терапевтичної дози в щурів рівновага зі сторони червоної і білої крові здійснювалася за рахунок зниження маси тіла тварин та використання запасів депо селезінки.

Десятикратне збільшення дози препарату призводило до значних зсувів рівнів показників білої і червоної крові, обмінних процесів у тканинах печінки і легень, зниження маси тіла щурів після 14-денного застосування.

При патоморфологічному дослідженні на 15 добу внутрішні органи щурів контрольної та дослідних груп зберігали анатомічну будову без видимих макроскопічних змін за винятком щурів 2 дослідної групи. У яких відмічали печінку збільшених розмірів, краї заокруглені, забарвлення неоднорідне, з наявністю вогнищ світло-коричневого кольору, дряблості консистенції, повнокровна, структура на розрізі дещо згладжена. Нирки бобовидної форми, повнокровні, темно-червоного кольору, на розрізі структура збережена, границя між кірковою і мозковою зонами наявна. Селезінка темно-вишневого кольору, краї заокруглені, на розрізі повнокровна зіскребок наявний.

При гістологічному дослідженні печінки щурів дослідних груп на 14 добу виявляли дискмплексацію пластинчастої будови часточок, центральні вени і синусоїдні капіляри розширені заповнені кров'ю, гепатоцити розріджені, цитоплазма неоднорідна, зерниста, слабо забарвлена, з дрібними поодинокими вакуольними включеннями, ядра гіпертрофовані, окремі лізовані, що вказувало на розвиток дистрофічно-некротичних змін (рис. 1, 2).

Більш вираженими зміни були у щурів 2 дослідної групи, які отримували 10-кратну терапевтичну дозу препарату Доксал. Тоді як у щурів контрольної групи гепатоцити добре контуровані, цитоплазма однорідна, ядра збережені.

У гістологічній структурі селезінки щурів, яким застосовували препарат Доксал впродовж 14 діб, поділ на червону і білу пульпу збережений. В червоній пульпі виявляли значне нагромадження еритроцитів (рис. 3). Лімфоїдні вузлики переважно округлої форми, невеликих розмірів, з ознаками клітинного спустошення, переважно у щурів, які отримували 10-кратну терапевтичну дозу досліджуваного препарату (рис. 4).

Суттєвої відмінності між контрольною та дослідними групами у гістоструктурі нирок, міокарду, органів шлунково-кишкового тракту та легень не відмічали.

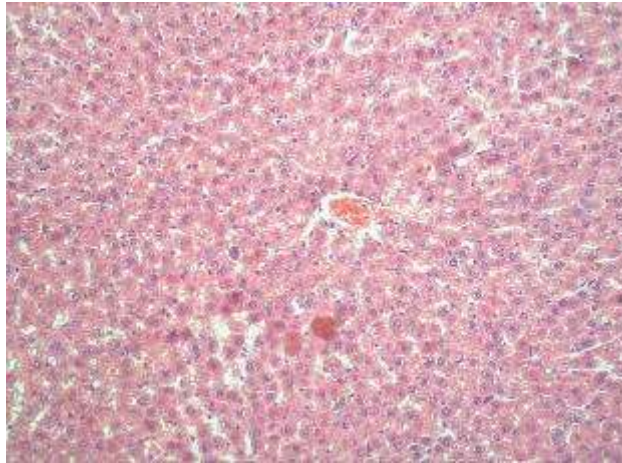


Рис. 1. Печінка щура 2 дослідної групи на 14 добу. Дисконплексація пластинчатої будови часточки, розширення центральної вени. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 10

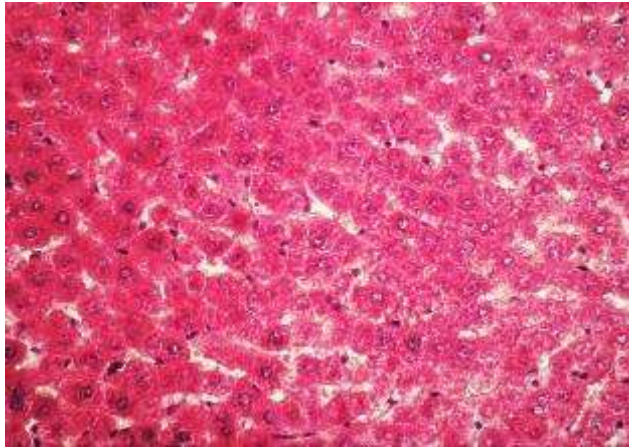


Рис. 2. Дистрофічно-некротичне вогнище у печінці щура 2 дослідної групи. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40

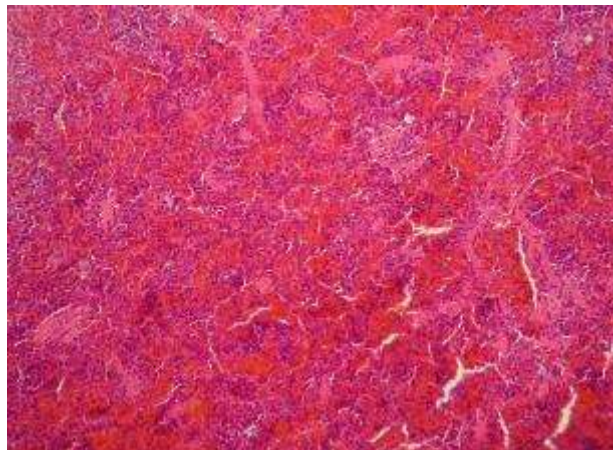


Рис. 3. Значне накопичення еритроцитів у червоній пульпі селезінки щура 2 дослідної групи на 14 добу. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 10

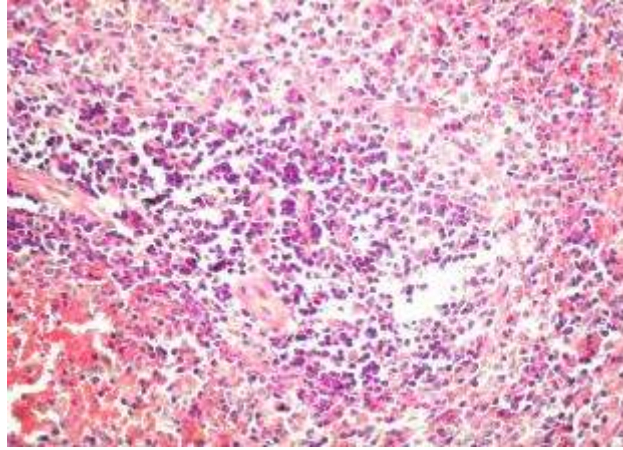


Рис. 4. Спустошення лімфатичного вузлика селезінки щура 2 дослідної групи на 14 добу.
Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 20

Отже, макроскопічна та мікроскопічна структура досліджуваних внутрішніх органів щурів, яким застосовували препарат Доксал впродовж 14 діб збережена. Гістологічно встановлено вогнищеве дистрофічно-некротичне ураження гепатоцитів та застійні явища у печінці, клітинне спустошення білої пульпи та наявність великої кількості еритроцитів у селезінці щурів які отримували 10-кратну терапевтичну дозу.

ВИСНОВКИ

1. Препарат Доксал належить до 4-го класу токсичності, тобто до малотоксичних речовин.
2. Результати тривалого (14 днів) застосування препарату Доксал білим щурам свідчать, що підтримання гомеостазу показників червоної і білої крові відбувалося за рахунок витрат запасів депо селезінки і втрати маси тіла тварин.
3. При введенні білим щурам даного препарату в дозі, яка в 10 разів перевищує терапевтичну, відбуваються функціональні зміни в печінці і легенях, зменшуються обмінні процеси в організмі тварин, підтримуються імунітет і окисно-відновні процеси за рахунок використання резервів.
4. В проведених дослідях встановлено, що макроскопічна та мікроскопічна структура досліджуваних внутрішніх органів щурів, яким застосовували препарат Доксал впродовж 14 діб збережена. Гістологічно встановлено вогнищеве дистрофічно-некротичне ураження гепатоцитів та застійні явища у печінці, клітинне спустошення білої пульпи та наявність великої кількості еритроцитів у селезінці щурів які отримували 10-кратну терапевтичну дозу.

Перспективи досліджень. Результати досліджень будуть використані для контролю якості препарату за показником “нешкідливість”.

DETERMINATION OF PARAMETERS OF ACUTE AND SUB-ACUTE TOXICITY THE DRUG BASED ON THE ANTIBIOTIC DOXYCYCLINE

I. P. Patereha

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

S U M M A R Y

The article presents the results of a study of the toxicity of the drug based on the antibiotic doxycycline giklat - doksal. Established that the drug Doksal belongs to the 4th class of toxicity, toxic substances. Results long-term (14 days) of the drug Doksal white rats show that maintain homeostasis, indicators of red and white blood is due to the distribution depot of the spleen and loss of body weight of the animals. With the introduction of white rats given the drug in a dose 10 times higher than therapeutic, functional changes occur in the liver and lungs, decrease the metabolic processes in the animal organism, immunity and redox processes through the use of reserves. Macroscopic and microscopic structure of the investigated internal organs of rats treated by this drug Doksal within 14 days saved. Histologically established campfire dystrophic-necrotic lesions of hepatocytes and congestion in the liver cell the devastation of the white pulp and the presence of a large number of red blood cells in the spleen of rats treated with 10-fold therapeutic dose.

Keywords: ACUTE TOXICITY, SUB-ACUTE TOXICITY, VETERINARY PREPARATIONS, LABORATORY ANIMALS.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ОСТРОЙ И ПОДОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ АНТИБИОТИКА ДОКСИЦИКЛИН

И. П. Патерега

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

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты изучения токсичности препарата основе антибиотика доксициклина гиклату - доксал. Установлено, что препарат Доксал относится к 4-му классу токсичности, то есть к малотоксичным веществам. Результаты длительного (14 дней) применение препарата Доксал белым крысам свидетельствуют, что поддержание гомеостаза показателей красной и белой крови происходило за счет расходов запасов депо селезенки и потери массы тела животных. При введении белым крысам данного препарата в дозе, которая в 10 раз превышает терапевтическую, происходят функциональные изменения в печени и легких, уменьшаются обменные процессы в организме животных, поддерживаются иммунитет и окислительно-восстановительные процессы за счет использования резервов. Макроскопическая и микроскопическая структура исследуемых внутренних органов крыс, которым применяли препарат Доксал в течение 14 суток, сохранена. Гистологически установлено очаговое дистрофически-некротическое поражение гепатоцитов и застойные явления в печени, клеточное опустошение белой пульпы и наличие большого количества эритроцитов в селезенке крыс, получавших 10-кратную терапевтическую дозу.

Ключевые слова: ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, ПОДОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин: Методичні рекомендації / М. В. Косенко, О. Г. Малик, І.Я. Коцюмбас та ін. – К., 1997. – 34 с.
2. 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.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / Н. В. Літвінова, М. А. Філоненко-Патрушева, С. Б. Французова, В. В. Храпак / Під ред. О. В. Стефанова. – К.:Авіценна, 2001. – 527 с.

4. *Влізла В. В.*. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарії: довідник / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В.В. Влізла // Львів: СПОЛОМ, 2012. – 764 с.

5. *Меркулов Г. А.* Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина. – 1969. – 423 с.

6. СОУ 85.2-37-736:2011 “Препарати ветеринарні. Визначання гострої токсичності”. – К: Мінагрополітики, 2011. – 16 с.

Рецензент – Т. Р. Левицький, к. с.-г. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.