

Ветеринария

УДК 619:[577.18:615.9]:636.028

DOI: <https://doi.org/10.31857/S2500-26272019455-58>ИЗУЧЕНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ ПРЕПАРАТА ТРИОЛАКТ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА БЕЛЫХ КРЫСАХС.В. Шабунин, академик РАН, Г.А. Востроилова, доктор биологических наук,
П.А. Паршин, доктор ветеринарных наук,
А.А. Корчагина, Н.А. Григорьева, Н.А. Хохлова*Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии,
394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б
E-mail: gvostroilova@mail.ru*

Изучено влияние комплексного антимикробного препарата триолакт на морфо-биохимические параметры крови в подостром эксперименте на белых крысах. В ходе опыта было установлено, что доза 500,0 мг/кг является пороговой, а 100,0 мг/кг – максимально недействующей. При многократном внутримышечном введении триолакта в течение 14 дней в дозах 100,0 и 250,0 мг/кг препарат не оказывает отрицательного воздействия на клинический статус, морфологические и биохимические показатели крови животных как во время применения препарата, так и в восстановительный период. Те изменения, которые вызваны дозой 500,0 мг/кг (повышение уровня α -глобулинов на 6,9%, креатинина – на 22,9% и мочевины – на 15,1%), имеют обратимый характер, так как в течение 10 дней восстановительного периода данные показатели у опытных животных возвращались к норме. С учетом морфометрического анализа, макро- и микроскопического исследования органов, изучения морфологической картины крови и биохимических показателей можно заключить, что в формате настоящего эксперимента токсической дозы установить не удалось.

STUDYING THE HARMLESSNESS OF TRIOLACT IN EXPERIMENT ON WHITE RATS

Shabunin S.V., Vostroilova G.A., Parshin P.A., Korchagina A.A., Grigorieva N.A., Khokhlova N.A.

*All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy,
394087, Voronezh, ul. Lomonosova, 114-b
E-mail: gvostroilova@mail.ru*

The aim of the research was to study the effect of the complex antimicrobial drug Triolact on blood morphological and biochemical parameters of white rats in a subacute experiment. It was established in the course of the experiment that the dose of 500.0 mg/kg is the threshold dose, and 100.0 mg/kg is the maximum no-effect dose. Triolact does not have a negative effect on the clinical status, morphological and biochemical parameters of animal blood in case of repeated intragastric administration for 14 days in doses of 100.0 mg/kg and 250.0 mg/kg both during the application of the drug and in the recovery period. The changes caused by the dose of 500.0 mg/kg are reversible (increase of α -globulin level by 6.9%, creatinine - by 22.9% and urea - by 15.1%), as these indicators in experienced animals returned to normal within the 10 days recovery period. It can be concluded that the determination of the toxic dose in the format of the present experiment was failed, taking into account the morphometric analysis, macro- and microscopic examination of organs, and studying the morphological picture of blood and biochemical parameters.

Ключевые слова: триолакт, белые крысы, безвредность, подострая токсичность, морфология и биохимия крови

Key words: triolact, white rats, harmless, subacute toxicity, blood morphology and biochemistry

В обеспечении потребностей населения страны в продуктах питания животного происхождения важное место отводится молочному скотоводству. Среди многих проблем отрасли актуальной и устойчивой остается проблема возникновения у коров воспаления молочной железы – мастита, основными возбудителями которого являются *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.* [1-3]. В среднем по стаду заболеваемость маститом составляет 20-50%. При этом хозяйства несут ощутимый экономический ущерб вследствие недополучения молока, ухудшения его санитарных и технологических качеств, стоимости лекарств и ветеринарных расходов, ранней выбраковки коров и снижения воспроизводительной функции животных [4-6].

В настоящее время для лечения мастита назначаются различные виды антибиотиков. Однако успех их терапии, как правило, низкий из-за патологических изменений в паренхиме вымени, неизбежного использования антибактериальных препаратов, развития антибиотикорезистентности [6-8].

Препараты для терапии мастита у коров занимают лидирующую позицию в общем объеме используемых ветеринарных лекарственных средств. Значительную

долю из них составляют препараты импортного производства. Между тем список противомаститных средств каждый год пополняется, их лекарственная форма постоянно совершенствуется. Ежегодное появление на мировом рынке новых лекарственных препаратов как для гуманной, так и ветеринарной медицины, обязывает отечественных производителей к здоровой конкуренции с зарубежными компаниями.

При разработке новых лекарственных средств одной из ключевых стадий является проведение доклинических испытаний, цель которых состоит в оценке безвредности, специфической биологической активности и эффективности препарата [9-11].

На этапе доклинических исследований определяют безопасные и эффективные дозы и схемы применения лекарственного средства, устанавливают потенциальные органы-мишени его побочного действия, а также исследуют обратимость выявленных токсических эффектов [12,13].

Необходимость расширения спектра лекарственных препаратов для лечения мастита за счет изыскания новых антимикробных средств привела к разработке во Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте патологии, фармакологии и терапии

Табл. 1. Масса тела белых крыс и ее среднесуточный прирост, г

Показатель	Группа			
	I	II	III	IV
Масса на начало опыта	193,3±0,90	198,9±1,10	191,8±0,68	196,8±1,45
Масса на 14-й день	237,5±2,95	244,5±6,69	237,2±3,17	240,1±7,17
Среднесуточный прирост массы за 14 дней	3,16±0,12	3,26±0,21	3,24±0,16	3,09±0,34
% к контролю	100,0	103,2	102,5	97,8
Масса на 24-й день	278,4±3,81	285,5±3,91	277,7±7,32	281,0±6,08
Среднесуточный прирост массы за 24 дня	3,55±0,19	3,61±0,32	3,58±0,36	3,51±0,27
% к контролю	100,0	101,7	100,8	98,9

(ВНИВИПФиТ) комплексного антимикробного препарата триолакт, в котором представлено сочетание антибиотиков пенициллиновой группы (амоксциллина и клаксациллина) и противовоспалительного компонента (преднизолона).

Целью настоящих исследований была оценка безвредности препарата триолакт, предложенного для лечения мастита коров в лактационный период, в эксперименте на белых крысах при многократном внутрижелудочном введении.

Методика. Испытания проведены на половозрелых линейных белых крысах-самцах Wistar массой 190-200 г. Все манипуляции на животных были рассмотрены и одобрены биоэтической комиссией ВНИВИПФиТ и соответствовали «Принципам надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ 33044-2014), European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986 и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Лабораторных животных содержали в условиях вивария при 24-часовом фоторежиме (12 ч день, 12 ч ночь), при температуре 22±2 °С, влажности воздуха 65±5%, свободном доступе к воде и стандартному корму (гранулированный комбикорм ПК-120 ГОСТ Р 51849-2011 производства ООО «Лабораторкорм», Москва).

Для проведения эксперимента было подобрано 4 группы животных-аналогов по 16 крыс в каждой. Препарат вводили внутривентрикулярно в течение 14 дней в следующих дозах: I группа – контроль (препарат не давали); II группа – 100,0 мг/кг (1/50 от ЛД₅₀); III группа – 250,0 мг/кг (1/20 от ЛД₅₀) и IV группа – 500,0 мг/кг (1/10 от ЛД₅₀). При выборе доз триолакта руководствовались результатами, полученными ранее при изучении параметров его токсичности в остром опыте [14], в результате которого было установлено, что ЛД₅₀ препарата превышает 5000,0 мг/кг и была максимально возможной для введения *per os* в соответствии с ГОСТ 32644-2014.

В течение всего периода опыта проводили клинические наблюдения за общим состоянием и поведением белых крыс, возможной их гибелью, потреблением корма и воды, оценивали изменение массы тела и внешние

Табл. 2. Относительная масса органов белых крыс, мг/100 г

Орган	Группа			
	I	II	III	IV
Через 14 дней				
Тимус	0,78±0,07	0,79±0,06	0,73±0,06	0,98±0,05*
Селезенка	2,30±0,19	2,21±0,08	2,23±0,17	2,41±0,14
Печень	34,0±1,39	32,2±1,02	33,9±1,56	33,4±1,53
Почки	5,07±0,06	5,12±0,10	5,18±1,07	5,85±0,19**
Надпочечники	0,22±0,01	0,22±0,02	0,23±0,01	0,26±0,01*
Сердце	2,99±0,12	3,01±0,11	3,03±0,10	2,96±0,07
Легкие	5,47±19	5,31±0,35	5,52±0,30	5,40±0,33
Через 10 дней восстановительного периода				
Тимус	0,77±0,11	0,75±0,07	0,79±0,06	0,81±0,09
Селезенка	2,76±0,26	2,69±0,07	2,72±0,15	2,82±0,16
Печень	29,6±1,94	29,9±0,15	28,8±0,66	28,7±0,72
Почки	5,73±0,49	5,64±0,23	5,68±0,05	5,77±0,08
Надпочечники	0,21±0,02	0,22±0,02	0,22±0,01	0,20±0,03
Сердце	3,12±0,20	2,99±0,16	2,97±0,08	3,16±0,14
Легкие	5,88±0,56	5,73±0,35	5,81±0,43	5,77±0,24

* p < 0,05; ** p < 0,005 по сравнению с контролем.

Табл. 3. Морфологические показатели крови белых крыс

Показатель	Группа			
	I	II	III	IV
Через 14 дней				
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,47±0,10	6,39±0,13	6,46±0,22	6,14±0,17
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	9,70±0,36	9,86±0,30	9,61±0,67	10,9±0,90
Гемоглобин, г/л	134,0±3,05	133,7±1,98	136,9±2,92	135,0±2,36
Гематокрит, %	29,9±1,46	30,8±0,62	31,1±1,14	32,0±0,47
Нейтрофилы, %:				
палочкоядерные	2,42±0,45	1,75±0,22	1,83±0,42	2,33±0,40
сегментоядерные	26,7±2,29	31,7±3,76	33,5±2,74	30,8±3,46
Эозинофилы, %	2,50±0,58	1,12±0,52	2,34±0,48	1,50±0,28
Базофилы, %	-	-	-	-
Лимфоциты, %	66,3±2,39	63,9±2,44	60,3±3,14	63,0±4,11
Моноциты, %	2,08±0,29	1,58±0,23	2,00±0,30	2,36±0,58
Через 10 дней восстановительного периода				
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,08±0,09	6,13±0,12	5,92±0,15	5,95±0,13
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	10,1±0,26	9,91±0,54	10,9±0,72	9,84±0,54
Гемоглобин, г/л	131,3±2,88	132,0±3,62	133,9±3,17	133,6±1,93
Гематокрит, %	30,7±0,76	31,8±1,06	31,8±1,08	31,2±0,64
Нейтрофилы, %:				
палочкоядерные	1,33±0,36	0,73±0,30	1,25±,22	0,83±0,21
сегментоядерные	32,3±2,46	29,1±3,88	30,8±1,88	34,3±2,06
Эозинофилы, %	1,33±0,31	1,42±0,43	1,50±0,34	1,50±0,39
Базофилы, %	-	-	-	-
Лимфоциты, %	63,6±2,46	67,2±3,64	65,0±2,10	61,7±2,26
Моноциты, %	1,42±0,23	1,58±0,23	1,42±0,34	1,67±0,40

Табл. 4. Биохимический статус белых крыс

Показатель	Группа			
	I	II	III	IV
Через 14 дней				
Общий белок, г/л	68,7±0,68	69,5±1,11	68,0±1,24	70,2±1,59
Альбумины, г/л	37,6±0,58	38,8±0,75	38,1±0,90	39,8±1,21
α-глобулины, г/л	6,26±0,31	6,04±0,13	5,98±0,23	6,69±0,14
β-глобулины, г/л	13,9±0,31	13,4±0,31	13,7±0,78	13,2±0,26
γ-глобулины, г/л	10,9±0,43	11,3±0,90	10,2±0,67	10,5±0,43
Мочевина, мМ/л	4,70±0,29	4,75±0,41	4,68±0,24	5,31±0,14*
Креатинин, мкМ/л	44,6±2,38	45,8±1,60	47,0±2,19	54,8±1,65**
Липиды, г/л	1,83±0,12	1,79±0,10	1,81±0,14	1,85±0,09
Холестерин, мМ/л	2,61±0,39	2,59±0,14	2,60±0,21	2,58±0,11
Глюкоза, мМ/л	5,22±0,24	5,18±0,08	5,06±0,16	5,35±0,09
Щелочная фосфатаза, Ед/л	61,1±5,12	57,3±2,77	62,2±5,44	58,0±4,39
АсАТ, Ед/л	92,1±7,11	85,8±6,94	84,8±3,64	85,0±7,54
АлАТ, Ед/л	40,2±2,95	39,4±1,65	39,4±3,09	37,8±2,34
Фосфор, мМ/л	1,85±0,16	1,79±0,09	1,78±0,13	1,81±0,10
Кальций, мМ/л	3,03±0,35	2,98±0,06	2,92±0,04	3,02±0,03
Через 10 дней восстановительного периода				
Общий белок, г/л	67,3±2,38	70,1±1,48	68,7±0,61	67,1±0,99
Альбумины, г/л	32,3±1,18	35,5±0,78	34,7±1,16	33,5±0,75
α-глобулины, г/л	5,82±0,49	5,74±0,62	5,70±0,47	6,05±0,67
β-глобулины, г/л	14,5±0,67	13,8±0,77	14,0±0,60	14,1±0,79
γ-глобулины, г/л	14,7±0,51	15,1±0,49	14,3±0,77	13,5±0,87
Мочевина, мМ/л	4,77±0,38	4,86±0,40	4,68±0,18	4,71±0,26
Креатинин, мкМ/л	51,5±3,94	52,6±2,29	49,3±2,77	53,3±4,54
Липиды, г/л	1,87±0,10	1,89±0,09	1,85±0,15	1,90±0,18
Холестерин, мМ/л	2,32±0,09	2,31±0,13	2,40±0,21	2,34±0,16
Глюкоза, мМ/л	4,79±0,33	4,80±0,27	4,92±0,36	4,80±0,22
Щелочная фосфатаза, Ед/л	63,0±6,67	58,2±6,65	56,5±5,19	63,0±7,05
АсАТ, Ед/л	70,1±6,34	72,1±5,52	66,0±4,59	74,1±6,05
АлАТ, Ед/л	32,0±3,86	31,9±2,27	33,3±2,51	29,1±1,82
Фосфор, мМ/л	1,83±0,07	1,76±0,04	1,81±0,16	1,79±0,23
Кальций, мМ/л	2,72±0,03	2,70±0,03	2,77±0,02	2,69±0,04

* p < 0,05; ** p < 0,001 по сравнению с контролем.

признаки интоксикации. По 8 особей из каждой группы были подвергнуты эвтаназии под эфирным наркозом и некропии через сутки после последнего применения триолакта и 10-дневного восстановительного периода. Изучены морфологические показатели крови на гематологическом анализаторе «АВХ Micros 60» («АВХ Diagnostics», Франция); лейкоцитарная формула – общепринятым методом; биохимические исследования сыворотки крови – на анализаторе «Hitachi-902»; фракции белка – электрофорезом в агарозном геле; количе-

ство общего белка, липидов и билирубина – наборами фирмы «Витал» (С.-Петербург). Была определена масса органов (тимус, селезенка, печень, почки, сердце, легкие, надпочечники), рассчитаны их массовые коэффициенты и проведены макро- и микроскопические исследования.

Результаты исследований статистически обработаны с помощью компьютерного пакета программ Statistica, версия 6 и представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$). Разность считали статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В течение эксперимента при многократном (14 дней) внутрижелудочном введении препарата в дозах 100,0; 250,0 и 500,0 мг/кг гибели крыс и симптомов интоксикации не было установлено. Психоэмоциональное состояние, аппетит, частота дыхательных движений у всех подопытных животных как во время применения препарата, так и в восстановительном периоде, оставались в пределах референтных значений, также не выявлено функциональных нарушений пищеварительной и мочевыделительной систем.

Достоверно значимых различий в приросте массы самцов белых крыс контрольной и II, III опытных групп в течение опыта не фиксировали (табл. 1). В IV группе наблюдали тенденцию снижения среднесуточных приростов массы животных по сравнению с крысами контрольной группы на 2,2% за 14 дней опыта. По окончании восстановительного периода не было обнаружено статистически достоверных различий по этому показателю.

Результаты морфометрического анализа внутренних органов крыс, которым вводили перорально триолакт в дозах 100,0 и 250,0 мг/кг, свидетельствовали об отсутствии статистически значимых различий по их относительной массе. Внутрижелудочное введение триолакта в дозе 500,0 мг/кг в течение 14 дней приводило к увеличению относительной массы тимуса на 25,6% ($p < 0,05$), почек – на 15,4% ($p < 0,005$), надпочечников – на 18,2% ($p < 0,05$). Однако по истечении срока восстановительного периода у опытных животных IV группы данные показатели достигали физиологических значений (табл. 2).

Макро- и микроскопическое исследование органов, полученных от животных, которым вводили триолакт в дозах 100,0; 250,0 и 500,0 мг/кг, не выявило патологических изменений.

При морфологическом исследовании проб крови от животных II и III групп на 14-й день опыта не было отмечено достоверно значимых изменений по сравнению с таковыми у группы контроля (табл. 3). Триолакт в дозе 500,0 мг/кг массы тела при внутрижелудочном введении в течение двух недель также не влиял на большинство морфологических показателей крови животных. Отмечена лишь тенденция увеличения лейкоцитов (на 12,4%), снижения эритроцитов (на 5,1%), которая находилась в границах физиологической нормы для белых крыс [12].

При анализе результатов, полученных при оценке биохимического статуса животных, было установлено отсутствие достоверных изменений в показателях биохимии крови по сравнению с таковыми у животных группы контроля (табл. 4).

При применении препарата в дозе 500,0 мг/кг было отмечено повышение уровня α-глобулинов (на 6,9%) и более напряженное функционирование мочевыделительной системы организма самцов белых крыс. При

14-дневном пероральном введении препарата у животных IV группы в сыворотке крови увеличивался уровень креатинина на 22,9% ($p < 0,001$) и мочевины – на 15,1% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми в контрольной группе. Через 10 дней восстановительного периода показатели, характеризующие функционирование мочевыделительной системы, у опытных крыс возвращались к референтным значениям.

Обобщая полученные данные, можно констатировать, что при многократном внутрижелудочном поступлении триолакта в течение 14 дней в дозах 100,0 и 250,0 мг/кг препарат не оказывает отрицательного воздействия на клинический статус, морфо-биохимические показатели крови животных. Те изменения, которые вызваны дозой 500,0 мг/кг, имеют обратимый характер, так как в течение 10 дней восстановительного периода морфологические и биохимические показатели у опытных животных возвращаются к физиологическим значениям. С учетом морфометрического анализа, макро- и микроскопического исследования органов, изучения морфологической картины крови и ее биохимических показателей можно заключить, что в настоящем эксперименте токсической дозы установить не удалось. Дозу 500,0 мг/кг массы тела можно считать пороговой, а 100,0 мг/кг – максимально недействующей.

Литература.

1. Артемьева О.А., Никанова Д.А., Котковская Е.Н., Гладырь Е.А., Доцев А.В., Зиновьева Н.А. Антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока высокопродуктивных коров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2016. – Т. 51. – №6. – С. 867-874.
2. Sankar P. New therapeutic strategies to control and treatment of bovine mastitis // *Vet. Med. Open J*. – 2016. – № 1(2). – P. 7-8.
3. Karanvir Singh, Mudit Chandra, Gurpreet Kaur, Deepti Narang, Dhiraj Kumar Gupta Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern among the Mastitis Causing Microorganisms // *Open Journal of Veterinary Medicine*. – 2018. – Vol.08. – № 04. – P. 54-64.
4. Климов Н.Т., Зимников В.И., Ерин Д.А., Пашенцев А.В., Манжурина О.А., Пархоменко Ю.С., Чернышова И.С., Тюрина Е.В. Проблема мастита у коров и повышение качества молока // *Молочная промышленность*. – 2018. – №7. – С. 68-70.
5. Климов Н.Т., Паришин П.А., Зимников В.И., Ерин Д.А., Манжурина О.А., Чернышова И.С. Прогнозирование исхода субклинического мастита у лактирующих коров // *Ветеринарная патология*. – 2018. – № 3(65). – С. 24-28.
6. Hossain M.K., Paul S., Hossain M.M., Islam M.R. and Alam M.D.S. Bovine Mastitis and Its Therapeutic Strategy Doing Antibiotic Sensitivity Test // *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*. – 2017. – № 4 (1). – P. 1030-1042.
7. Лоскутова И.В., Щанникова М.П., Фурсова К.К., Шепеляковская А.О., Артемьева О.А., Никанова Д.А., Зиновьева Н.А., Бровка Ф.А. Выявление антигенов, специфичных к энтеротоксинам стафилококков, в сыворотке крови и молозиве коров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2017. – Т.52. – № 6. – С. 1273-1278. Doi:10.15389/agrobiology.2017.6.1273rus
8. Shahab Jamaran, Bahareh Rahimian Zarif Synergistic Effect of Silver Nanoparticles with Neomycin or Gentamicin Antibiotics on Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* // *Open Journal of Ecology*. – 2016. – Vol.06. – № 07. – P. 452-459.
9. Иванютин В.А., Недорезов В.Л. Доклинические исследования лекарственных средств // *Труды БГУ*. – 2010. – № 5 (1). – С. 291-295.
10. Лопатин П.В. Биозтика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 240 с.
11. Меньшикова Л.А., Печенкина И.Г., Береза Н.С. Особенности доклинических исследований инновационных лекарственных препаратов (короткое сообщение) // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2013. – № 2 (2). – С. 62-65.
12. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных: Справочник. Под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. – С.-Пб.: «ЛЭМА», 2013. – 116 с.
13. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
14. Востроилова Г.А., Корчагина А.А., Брюхова И.В., Григорьева Н.А., Канторович Ю.А. Параметры токсичности комплексного препарата триолакт в остром опыте // *Ветеринарный фармакологический вестник*. – 2018. – № 2(3). – С. 25-29.

Поступила в редакцию 12.03.19

После доработки 01.04.19

Принята к публикации 15.04.19