



ТРИБУНА МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

УДК 619:615:636.2+619:618.14-002:636.2

Э.Р. Рафикова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ПРЕПАРАТА «ВЕТОМ 21.77» НА МЫШАХ

E.R. Rafikova

THE DETERMINATION OF CHRONIC TOXICITY OF NEW PREPARATION "VETOM 21.77" ON MICE

Рафикова Э.Р. – асп. каф. ветеринарной фармакологии и общей патологии Новосибирского государственного аграрного университета, г. Новосибирск. E-mail: pchelka_leta@mail.ru

Rafikova E.R. – Post-Graduate Student, Chair of Veterinary Pharmacology and General Pathology, Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk. E-mail: pchelka_leta@mail.ru

Цель исследования – изучение основных токсических эффектов нового препарата «Ветом 21.77» на основе нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans*, поражаемых органов-мишеней, латентного периода развития и обратимости эффектов. Для достижения цели были поставлены задачи: ежедневно регистрировать физиологическое состояние и прирост абсолютной массы, исследовать гематологические показатели и провести патоморфологическое исследование, включающее морфометрию внутренних органов мышей. Было сформировано 5 групп (контрольная и 4 опытные) по 20 мышей в каждой. Опыт проводили на базе Научно-исследовательской ветеринарной лаборатории Агротехнопарка при Государственном университете им. Шакарима (г. Семей, Казахстан). Опытным группам «Ветом 21.77» назначали перорально в дозах 2, 5, 50 и 300 мкл/кг массы ежедневно на протяжении 6 месяцев; в контрольной группе препарат не применяли. Для учета результатов проводили ежедневный клинический осмотр, еженедельное взвешивание, регистрировали прирост абсолютной массы; изучали влияние препарата на гематологические показатели и проводили морфометрию отдельных внутренних органов до исследования и через 1,5; 3; 4 и 6 мес. после применения препарата. По результатам исследования выяснено, что при длительном использовании в дозах 2, 5, 50 и 300 мкл/кг массы «Ветом 21.77» не оказывал токсического влияния на организм мышей – установлена стопроцентная сохранность животных. У животных опытных групп наблюдались высокие приросты живой массы. По физиологическому состоянию организма, гематологическим показателям и морфометрическим параметрам изучаемых органов отклонений от нормы во всех опытных группах не выявлено, что позволяет отнести «Ветом 21.7» к IV классу токсичности – «вещества малоопасные».

Ключевые слова: препарат «Ветом 21.77», хроническая токсичность, доза, мыши, нематофаговый гриб *Duddingtonia flagrans*.

The research objective was studying the main toxic effects of new preparation "Vetom 21.77" on the basis of nematophage mushroom of *Duddingtonia flagrans*, struck target organs, latent period of the development and reversibility of effects. 5 groups (control and 4 experimental) having 20 mice in each were created. The experiment was made on the basis of Research Veterinary Laboratory of Agrosience and Technology Park at the State University of Shakarim (Families, Kazakhstan). To experimental groups "Vetom 21.77" was appointed orally in the doses 2, 5, 50 and 300 mkl/kg masses daily for 6 months; in control group the preparation was not applied. For the results accounting of performed daily clinical examination, weekly weighing, registered the gain of absolute weight; studied the influence of the preparation on hematologic indicators and carried out the morphometry of separate internal to research and through 1,5; 3; 4 and 6 months after application of the preparation. By the results of the research it was found out that at long using in the doses of 2, 5, 50 and 300 mkl/kg weight "Vetom 21.77" had no toxic impact on the organism of mice, i.e. absolute safety of animals was detected. In the animals of experimental groups high gain of live weight was observed. According to the physiological state, hematological indices and morphometric parameters of studied organs, there were no deviations from the norm in the treatment groups, i.e. Vetom 21.77 was defined as the fourth toxicity class drug – 'low-hazard substances'.

Keywords: preparation "Vetom 21.77", chronic toxicity, dose, mice, nematophage mushroom *Duddingtonia flagrans*.

Введение. К настоящему времени в научной литературе получил довольно обширное освещение вопрос применения хищных грибов в качестве биологических регуляторов численности личинок паразитических нематод. Работы, представленные зарубежными и отечественными исследователями, свидетельствуют о высокой нематоцидной активности некоторых видов грибов-гифомицетов в отношении гельминтов животных и птиц.

Одним из них является хищный гриб *Duddingtonia flagrans*, на основе которого был изготовлен микробиологический препарат, ставший предметом настоящих научно-экспериментальных исследований.

D. flagrans является перспективным инструментом биоконтроля кишечного микробиоценоза животных и птиц, так как данный гриб способен производить большое количество толстостенных, устойчивых хламидоспор, которые выживают в неблагоприятных средах, например, таких, как кишечник животного [1]. В этой связи заслуживает внимания, в частности, исследование Кампос с соавторами. Была изучена динамика прохождения конидий, хламидоспор и мицелия гриба *D. flagrans* через пищеварительные тракты коз. По итогам опыта было отмечено, что хламидоспоры и конидии *D. flagrans* продемонстрировали способность к выживанию при прохождении через пищеварительный процесс коз, с сохранением своих хищных свойств [2].

В целом лярвицидная эффективность биопрепарата была экспериментально доказана на множестве паразитических нематод различных животных: овец [3], лошадей [4], коз [5].

Цель исследований: изучение основных токсических эффектов микробиологического препарата «Ветом 21.77» на основе *D. flagrans*, действия препарата на поражаемые органы-мишени, а также (при установлении токсических свойств образца) латентного периода развития и обратимости эффектов.

Объекты и методы исследований. Опытный образец – препарат «Ветом 21.77», представляющий собой лиофилизированный изолят нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans* на сухих иммобилизующих носителях, обладающих пребиотическими, сорбирующими и антитоксическими свойствами.

Определение хронической токсичности препарата «Ветом 21.77», согласно ГОСТ 32519-2013 [6], проводили на клинически здоровых мышах двухмесячного возраста в количестве 105 голов. Начальная масса мышей состави-

ла ($20 \pm 0,2$) г. Для проведения эксперимента было сформировано 5 групп – контрольная и 4 опытные по 20 голов в каждой. Дополнительно использовали 5 мышей для гематологического анализа, проводимого до начала исследования. В качестве группы контроля использовали мышей, которые получали стандартный лабораторный комбикорм. Мышам 1-й опытной группы «Ветом 21.77» назначали перорально, ежедневно на протяжении 6 месяцев в дозе 2; 2-й группы – 5; 3-й группы – 50; 4-й группы – 300 мкл/кг массы. Ежедневно проводили клинический осмотр. Взвешивание производили до начала опыта, затем через 14 сут, 1, 5, 3, 4 и 6 мес.

Контроль за сохранностью и падежом осуществляли ежедневно. Основными критериями оценки хронической токсичности служили следующие показатели: внешний вид лабораторных мышей, поведенческие реакции, изменение абсолютной массы, абсолютный среднесуточный прирост, относительный прирост по Броди, морфологические и биохимические показатели крови, патоморфологические изменения внутренних органов. Для проведения морфометрического анализа мыши в количестве 5 голов из каждой группы подвергались эвтаназии путем декапитации и вскрытию согласно методике спустя 1,5; 3; 4 и 6 мес. от начала эксперимента.

Полученные цифровые экспериментальные данные обрабатывались с помощью U-критерия Манна-Уитни (программа StatsDirect 3.1.14). Различия считали статистически значимым при $P < 0,05$.

Результаты исследований. На протяжении всего периода наблюдения (6 мес.) не регистрировали гибели подопытных животных. Физиологическое состояние мышей контрольной и опытной групп на протяжении всего исследования не имело достоверных различий: мыши были клинически здоровы в течение всего эксперимента. Изменений внешнего вида, поведения, двигательной активности животных не выявлено. Данные по влиянию препарата на массу тела опытных и контрольных лабораторных животных представлены в таблице.

Абсолютная масса подопытных животных, г

Период наблюдения	Группа (доза препарата, мкл/кг)				
	Контрольная (0)	1-я опытная (2)	2-я опытная (5)	3-я опытная (50)	4-я опытная (300)
Учет результатов, взвешивание					
До исследования	20,31±0,61	20,15±0,8	20,35±0,85	20,09±0,89	20,28±0,76
Через 24 ч	20,39±0,61	20,29±0,79	20,41±0,88	20,18±0,9	20,38±0,74
На 7 сут	22,71±0,71	22,82±0,61	22,91±0,58	22,98±0,67	23,22±0,79*
На 14 сут	24,23±0,57	24,26±0,78	24,34±0,7	25,31±0,61***	25,44±0,61***
Через 1,5 мес.	30,43±0,95	30,59±0,76	30,79±0,71	31,72±0,56***	32,12±1,13***
Через 3 мес.	36,21±1,0	36,17±0,39	36,76±0,73	39,89±0,46***	40,92±0,56***
Через 4 мес.	37,34±1,09	37,02±0,3	37,61±0,3	41,49±0,39***	42,56±0,71***
Через 6 мес.	38,56±0,77	38,35±0,48	39,84±0,51**	43,44±0,25**	44,32±0,67**

Примечание. Различия достоверны на уровне значимости: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$.

Из данных таблицы 1 видно, что до исследования, в сравнении с контролем, в 1-й опытной группе среднее значение массы тела было ниже на 0,8 %, в 3-й – 1,1 %, 4-й – 0,1 %, во 2-й – выше на 0,2 %.

Через 24 часа среднее значение массы тела в кон-

трольной группе составило 20,39 г (на 0,4 % выше относительно исходных данных), в 1-й опытной – 20,29 г (на 0,5 % ниже контроля и на 0,7 % выше относительно исходных данных), во 2-й опытной – 20,41 г (выше на 0,1 % и 0,3 % соотв.), в 3-й опытной – 20,18 г (ниже на 1,0 % и

выше на 0,5 % соотв.), в 4-й опытной – 20,38 г (на 0 % ниже и выше на 0,5 % соотв.).

Мыши 4-й опытной группы уже на 7-е сут превосходили аналогов из контроля на 2,3 % ($P < 0,05$). На 14-е сут статистически значимое ($P < 0,0001$) опережение контроля наблюдалось в 3-й (4,5 %) и 4-й (5 %) опытных группах.

Через 1,5 мес. среднее значение массы тела в контрольной группе составило 30,43 г (на 49,9 % выше исходных данных), в 1-й опытной – 30,59 г (на 0,5 % выше контроля и на 51,8 % – исходных данных), во 2-й опытной – 30,79 г (выше на 1,2 и 51,4 % соотв.), в 3-й опытной – 31,72 г (выше на 4,2 % ($P < 0,0001$) и на 57,9 % соотв.), в 4-й опытной – 32,12 г (выше на 5,6 ($P < 0,0001$) и 58,4 % соотв.).

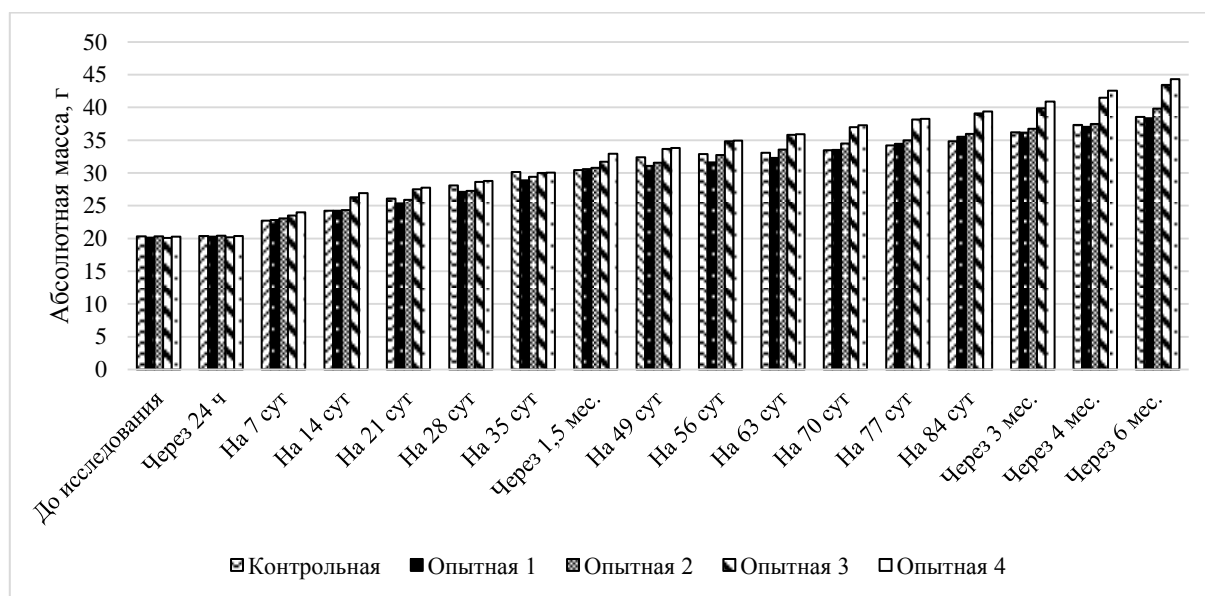
Через 3 мес. среднее значение массы тела в контроле составило 36,21 г (на 78,3 % выше исходных данных), в 1-й опытной – 36,17 г (ниже на 0,1 % относительно контроля и на 79,5 % выше исходных данных), во 2-й опытной – 36,76 г (выше на 1,5 и 80,7 % соотв.), в 3-й опытной – 39,89 г (выше на 10,2 ($P < 0,0001$) и на 98,6 % соотв.), в 4-й опытной – 40,92 г (выше на 13 ($P < 0,0001$) и 101,8 %

соотв.).

Через 4 мес. рассматриваемый показатель в контроле составил 37,34 г (на 83,9 % выше исходных данных), в 1-й опытной – 37,02 г (на 0,9 % ниже контроля и на 83,7 % выше исходных данных), во 2-й опытной – 37,61 г (выше на 0,7 и 84,9 % соотв.), в 3-й опытной – 41,49 г (выше на 11,1 ($P < 0,0001$) и 106,5 % соотв.), в 4-й опытной – 42,56 г (выше на 14 ($P < 0,0001$) и на 109,9 % соотв.).

По истечении 6 мес. уровень статистической значимости различия между контрольной и опытными группами снизился, при этом возникнув также и во 2-й опытной группе. Таким образом, среднее значение массы тела в контроле теперь составляло 38,56 г (на 89,9 % выше относительно исходных данных), в 1-й опытной – 38,35 г (на 0,5 % ниже контроля и на 90,4 % выше относительно исходных данных), во 2-й опытной – 39,84 г (выше на 3,3 ($P < 0,01$) и 95,8 % соотв.), в 3-й опытной – 43,44 г (выше на 12,7 ($P < 0,01$) и на 116,2 % соотв.), в 4-й опытной – 44,32 г (выше на 14,9 ($P < 0,01$) и на 118,5 % соотв.).

Динамику увеличения абсолютной массы подопытных мышей можно наглядно рассмотреть на рисунке.



Абсолютная масса подопытных мышей за период исследования

Абсолютный среднесуточный прирост на 6 мес. исследования составил в контрольной и 1-й опытной группах 0,10 г; во 2-й – 0,11 г; в 3-й и 4-й – по 0,13 г. Относительный прирост по Броди составил в контрольной группе 15,5 %; в 1-й опытной – 15,6; во 2-й – 16,2; в 3-й – 18,4; в 4-й – 18,6 %.

С целью определения хронической токсичности были проведены гематологические исследования через 1,5; 3; 4 и 6 мес. Согласно результатам гематологического анализа, физиологические и биохимические показатели в опытных группах сохранялись в пределах физиологической нормы. В сыворотке крови мышей 4-й опытной группы содержание общего белка превышало аналогичный показатель в контрольной группе на 16,8 % ($P < 0,01$) через 1,5 мес. от начала опыта; на 13,3 % ($P < 0,05$) – через 3 мес.; на 8 % ($P < 0,05$) – через 4 мес. и на 3 % – через

6 мес. В группах с применением меньших дозировок данный гематологический показатель также превышал контрольное значение на протяжении всего эксперимента. Подобная прогрессия в пределах диапазона нормы (43–64 г/л) может указывать на анаболическую направленность белкового обмена в организме опытных животных.

В концентрации сывороточного креатинина, отражающей метаболизм мышечного белка, также отмечался планомерный рост относительно аналогов из контроля, без выхода за пределы референсных значений (0,4–0,7 мг/дл). Через 1,5 мес. различие составило в 4-й опытной группе 16,7 % ($P < 0,05$). Вместе с тем в содержании сывороточной мочевины статистически значимый ($P < 0,05$) прирост в сравнении с контролем произошел в 4-й опытной группе лишь по истечении 4 мес. эксперимента.

Влияние микробиологических препаратов на углеводный обмен грызунов до сих пор недостаточно исследовано. На протяжении настоящего исследования в отношении уровня глюкозы была отмечена относительно равномерная картина.

Число эритроцитов в крови мышей 1–4 опытных групп превышало контрольные значения соответственно на 2,3–9,3 % через 1,5 мес. с начала эксперимента; затем на 4,1–6,6 % – через 3 мес., за исключением 1-й опытной группы, где соответствующий показатель отставал от контроля на 1,6 %; спустя 4 мес. – на 0,6–6,3 %. Статистически значимые ($P < 0,05$) различия от контроля в указанные этапы исследования наблюдались лишь в 4-й опытной группе, как и в случае с показателем уровня гемоглобина, через 1,5 и 3 мес.

В целом, судя по полученной эритрограмме, можно предполагать, что под воздействием исследуемого препарата в крови животных происходила активация эритропоэза без видимых отклонений в системе красных кровяных телец. Наиболее выраженные изменения происходили при назначении препарата в суточной дозировке 300 мкл/кг живой массы.

В ходе опыта по истечении 1,5; 3; 4; 6 мес. лабораторные мыши всех групп в количестве по 5 голов с каждой группы были подвергнуты эвтаназии путем декапитации и вскрытию. При патолого-анатомическом исследовании внутренних органов животных изменений в их структуре не выявлено. Внутренние органы располагались анатомически правильно, жидкость в плевральной и брюшной полостях отсутствовала. Просвет трахеи и бронхов свободен, ткань легких имела розовый цвет. Слизистая оболочка, выстилающая желудок и кишечник, имела естественную серовато-розовую окраску, без видимых изъязвлений и геморагий. Капсула почки легко снималась, мозговое и корковое вещество органа у мышей были хорошо различимы на разрезе.

Таким образом, при патолого-анатомическом исследовании выяснено, что использование препарата «Ветом 21.77» не вызвало каких-либо дегенеративных, некротических и других патологических изменений в изучаемых образцах контрольной и опытной групп. Массовые коэффициенты органов находились в пределах допустимых значений норм.

Выводы

1. По данным проведенных исследований выяснено, что применение препарата «Ветом 21.77» в дозах 2; 5; 50 и 300 мкл/кг увеличивает прирост массы и обеспечивает 100 %-ю сохранность лабораторных животных.

2. Морфологические и биохимические показатели крови опытных мышей оставались в пределах физиологической нормы на протяжении всего исследования, что говорит об отсутствии негативного действия препарата на организм животных.

3. Исходя из полученных результатов, подтверждено, что препарат группы «Ветом 21.77» относится к IV классу токсичности – «вещества малоопасные».

Литература

1. Isolation and Characterization of China Isolates of *Duddingtonia flagrans*, a Candidate of the Nematophagous Fungi for Biocontrol of Animal Parasitic Nematodes / B. Wang, W. Liu, M. Chen M. [et al.] // J. Parasitol. – 2015. – Vol. 101, № 4. – P. 476–484.
2. Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces / A. Campos, J. Araújo, M. Guimarães [et al.] // Parasitol. Res. – 2009. – Vol. 105, № 4. – P. 913–919.
3. Ефремова Е.А., Теплякова Т.В. Влияние глубинной культуры хищного гриба *Duddingtonia flagrans* на численность личинок стронгилят пищеварительного тракта овец // Российский паразитологический журнал. – 2010. – № 3. – С. 33–38.
4. Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control / J. Hernández, F. Arroyo, J. Suárez [et al.] // Vet. parasitol. – 2016. – Vol. 229. – P. 37–44.
5. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials / C. Paraud, H. Hoste, Y. Lefrileux [et al.] // Vet. Res. – 2005. – Vol. 36, № 2. – P. 157–166.
6. ГОСТ 32519-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при внутрижелудочном поступлении. – М., 2014. – 16 с.

Literatura

1. Isolation and Characterization of China Isolates of *Duddingtonia flagrans*, a Candidate of the Nematophagous Fungi for Biocontrol of Animal Parasitic Nematodes / B. Wang, W. Liu, M. Chen M. [et al.] // J. Parasitol. – 2015. – Vol. 101, № 4. – P. 476–484.
2. Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces / A. Campos, J. Araújo, M. Guimarães [et al.] // Parasitol. Res. – 2009. – Vol. 105, № 4. – P. 913–919.
3. Ефремова Е.А., Теплякова Т.В. Влияние глубинной культуры хищного гриба *Duddingtonia flagrans* на численность личинок стронгилят пищеварительного тракта овец // Российский паразитологический журнал. – 2010. – № 3. – С. 33–38.
4. Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control / J. Hernández, F. Arroyo, J. Suárez [et al.] // Vet. parasitol. – 2016. – Vol. 229. – P. 37–44.
5. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials / C. Paraud, H. Hoste, Y. Lefrileux [et al.] // Vet. Res. – 2005. – Vol. 36, № 2. – P. 157–166.
6. ГОСТ 32519-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при внутрижелудочном поступлении. – М., 2014. – 16 с.