

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ САНИТАРИИ, ГИГИЕНЫ И ЭКОЛОГИИ»
(ФГБНУ «ВНИИВСГЭ»)**

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ «ВНИИВСГЭ»

академик РАН

А.М. Смирнов
А.М. Смирнов

27 04 2015 г.



О Т Ч Е Т

о проведении научно-исследовательских работ

"Провести научно-исследовательскую работу по определению острой и субхронической токсичности, кожно-резорбтивного и аллергенного действия пробиотической кормовой добавки «Амилоцин»"

Договор № 1н/15 от 12.02.2015

Организация-производитель: ООО «Арлен»

Зам. директора по научной

работе, д.б.н., член-корр. РАН В.И. Дорожкин *В.И. Дорожкин*

Москва - 2015 г.



Список исполнителей

Зав. лабораторией,
д.б.н., профессор

В.И. Дорожкин
(общее руководство)

Вед. н.сотр., к.б.н.

Г.И.Павленко
(определение острой и субхронической токсичности, кожно-резорбтивного и аллергенного действия)

Уч. секретарь, к.б.н.

Н.К. Гуненко
(регистрация в ЦИТиС)

Ст. н. сотр, к.б.н.

Н.С. Крутько
(материальное обеспечение исследований)

Зав. виварием

В.А. Гущина
(уход за подопытными животными)



РЕФЕРАТ

Отчет на 25 стр., 17 табл.

Острая токсичность, субхроническая токсичность, кожно-резорбтивное действие, аллергенное действие, пробиотическая кормовая добавка «Амилоцин».

Объект исследования – пробиотическая кормовая добавка «Амилоцин», белые крысы, белые мыши.

Цель работы - определение острой и субхронической токсичности, кожно-резорбтивного и аллергенного действия пробиотической кормовой добавки «амилоцин».

Определена острая и субхроническая токсичность, кожно-резорбтивное и аллергенное действие действия пробиотической кормовой добавки «Амилоцин».

Кормовая добавка «Амилоцин» - практически не токсичное соединение при однократном введении в желудок и при выпаивание с водой. Не кумулирует в организме в условиях 2-х недельного введения. В 28 дневном эксперименте на уровне терапевтических доз и на порядок выше «Амилоцин» не способен вызывать каких-либо нарушений со стороны важных для организма систем. Не обладает кожно-резорбтивным действием. Препарат не обладает местным, раздражающим и аллергическим действием. Не способен вызывать раздражения слизистых оболочек глаз у кроликов.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. Материалы и методы исследований.....	6
2. Результаты исследований.....	9
2.1. Изучение острой токсичности препарата.....	9
2.2. Изучение кумулятивных свойств препарата.....	10
2.3. Изучение биологического действия препарата «Амилоцин» в повторном эксперименте.....	15
2.4. Изучение раздражающего и аллергенного действия «Амилоцина».....	20
2.4.1. Изучение раздражающего действия препарата на слизистые оболочки глаз кроликов.....	21
2.4.2. Кожно-резорбтивное действие препарата «Амилоцин».....	21
ВЫВОДЫ.....	23
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	24

Введение.

Для изучения биологического действия представлена кормовая добавка «Амилоцин», которая является эффективным препаратом против бактерий, вызывающих различного рода заболевания и расстройства у животных и птицы.

В состав средства входит смесь биомассы бактерий штаммов *Bacillus subtilis* OZ-2ВКПМ 11966 и *Bacillus amyloliquefaciens* OZ-3 ВКМП 11967 в равных соотношениях 1:1, в споровой форме при их суммарном количестве не менее 1×10^9 спор/г. В качестве протектора используют сахараиды (сахарозы, глюкозы, фруктозы, лактозы, мальтозы или их смеси).

Смесь биомассы бактерий штаммов *B.subtilis* и *B.amyloliquefaciens* обеспечивает нормализацию микробиоценоза, восстановление нормальной микрофлоры кишечника после применения антибиотиков, антигельминтиков, кокцидиостатиков, снижение отрицательного действия на организм микотоксинов. Это пробиотический препарат с максимальной выживаемостью спор бактерий и максимальной скоростью перехода спор бактерий в вегетативную форму.

Проросшие в кишечнике вегетативные клетки выделяют большое количество пищеварительных ферментов (протеазу, липазу, целлюлазу, гемицеллюлазу), чем способствуют более полному расщеплению и перевариванию корма. Продуцируются также витамины и аминокислоты.

Пробиотик активно конкурирует за питательные субстраты с возбудителями инфекций и продуцирует при этом полипептидные антибиотики (Субтилин, Микосубтилин, Бацилломицин, Бацилихин, Грамицидин С).

Кормовая добавка используется для замены антибиотиков в комбикормах и кормовых добавках, для повышения эффективности использования корма и продуктивности животных, для улучшения процессов пищеварения и ускорения адаптации животных к рационам, обладает ингибирующим, антогонистическим действием по отношению к патогенным микроорганизмам (*Escherihia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и др.), не подавляя при этом микрофлору кишечника, активизирующую работу кишечника.

Препарат предназначен для профилактики и лечения заболеваний, вызванных кишечной палочкой, шигеллами, клебсиеллами, сальмонеллами, для коррекции кишечного биоценоза, а также коррекции иммунной, гормональной и ферментной систем молодняка, для обеспечения сохранности

поголовья и снижения падежа, привеса, улучшение конверсии корма, повышение яйценоскости кур.

Средство сохраняется в кишечнике на несколько недель, что сопоставимо со временем жизни в кишечнике такого «популярного» патогена как сальмонелла. При этом средство активно синтезирует ферменты, повышает перевариваемость протеина и аминокислот. Мясо птицы получается более полноценного аминокислотного состава, содержащее больше заменимых и незаменимых аминокислот, разница с контрольной группой без применения по сумме аминокислот до 3-5%, по содержанию незаменимых до 2,7% - говорит о большой интенсивности белкового обмена. Избыток пробиотика гидролизуется и выводится из организма животного без каких-либо последствий.

1. Материалы и методы исследования.

По внешнему виду препарат представляет собой мелкодисперсный порошок белого цвета. Экспериментальные исследования были проведены на белых беспородных крысах. Животных содержали в виварии, согласно санитарным правилам и на стандартном рационе в соответствии с Приказом МЗ СССР №1045-73 от 06.04.1973 г.(1); Правилами лабораторной практики (2) и Приказом МЗ СССР №1179 от 10.10.1983 г.(3)

Корм представлял собой сухие брикеты ПК-120 ГОСТ Р51849-2011 Р.5 (ООО «Лабораторкорм», г. Москва). Вода для питья - водопроводная, её животные получали из стандартных поилок.

Температура воздуха в виварии 20-22 градуса, относительная влажность - 60-70%.

Подготовку животных к опыту проводили методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Исходный вес белых крыс колебался в пределах 210-230 г. В опыт брали клинически здоровых животных, которые предварительно выдерживались на 15- дневном карантине. Для введения в желудок была приготовлена 70% суспензия.

При исследовании руководствовались утвержденными Методическими рекомендациями (4,5).

При изучении **кумулятивных свойств** препарата использовали метод, принятый для нетоксичных соединений (6), который предусматривает введение препарата в условиях повторного 2-х недельного эксперимента в дозе, составляющей 1/5 от максимально-переносимой дозы, т.е. от 10 г/кг массы тела. Таким образом, ежедневно животные получали дозу 2 г/кг. Для большей объективности эксперимент продолжили до 20 дней.

Учитывали как материальную (гибель животных), так и функциональную кумуляцию. При изучении функциональной кумуляции проводилась оценка ряда показателей: - регистрировалась масса тела, определялся суммационно-пороговый показатель (СПП), проводился анализ периферической крови (гемоглобин, лейкоциты, эритроциты), проводилась оценка функционального состояния печени и почек, регистрировались некоторые поведенческие реакции животных.

Функциональное состояние **центральной нервной системы** оценивали по величине суммационно - порогового показателя (Сперанский С.В., 1965) (7). Использовался прибор СПП-01-М. Нервно-мышечная возбудимость животных определялась с помощью электродов по сокращению межпальцевых мышц с увеличением подачи тока.

Состояние периферической крови оценивали на гематологическом анализаторе Cell-dyn. Определяли количество гемоглобина, лейкоцитов и эритроцитов. Кроме того, использовали различные расчетные величины, отражающие физико-химические свойства эритроцитов, позволяющие количественно характеризовать важные показатели состояния эритроцитов.

При изучении влияния препарата на **печень** использовались показатели, характеризующие обезвреживающую и белковообразовательную функции органа. О белковообразовательной функции печени животных судили по содержанию общего белка в сыворотке крови (на рефрактометре).

Обезвреживающая функция печени исследовалась по способности органа синтезировать гиппуровую кислоту (метод Квика-Пытеля в модификации Н.Г.Степановой, 1962) (9).

В конце эксперимента в сыворотке крови определяли количество SH-групп. Метод определения основан на эквивалентном взаимодействии молекулярного йода со свободными SH-группами белков и низкомолекулярных соединений (в присутствии 1 М КJ и фосфатного буфера (PH=7,6) при температуре среды 20°C). О количестве йода, прореагировавшего с SH-группами, судили по результатам сравнения опытной и контрольной проб на ФЭКе (Фоломеев, 1981) (10).

Изучение функционального состояния **почек** проводилось по комплексу методов - измерялся диурез, определялся удельный вес мочи, содержание в моче белка и хлоридов. Белок в моче (протеинурия) - один из наиболее диагностически важных лабораторных показателей патологии почек. Определение белка в моче основано на взаимодействии белка с сульфосалициловой кислотой, в результате которого степень помутнения анализируется с помощью фотоколориметрического анализа (11).

Из неорганических солей, выделяющихся из организма с мочой, заслуживают внимания, главным образом, хлориды, так как их содержание в моче характеризует не только состояние почек, но и состояние коры надпочечников. А, как известно, гормоны, вырабатываемые надпочечниками, оказывают влияние на все основные физиологические процессы организма, в том числе - на работу ЖКТ и сердечнососудистой системы, а также защитную активность противовоспалительных и антиоксидантных гормонов, выделяемых надпочечниками для минимизации негативных и аллергических реакций на токсины.

Принцип метода определения хлоридов в моче основан на разрушении белков мочи кипячением ее с 10 % уксусной кислотой и последующим добавлением азотной кислоты. Титрование производили раствором азотной кислоты (окисной) в присутствии индикатора - дифенилкарбазона (12).

Для регистрации *поведенческих реакций* использовались некоторые показатели динамической и статической работоспособности животных (13).

Динамическая двигательная активность определялась с помощью «вертикального» двигательного компонента, который основан на подсчете количества вставаний животных на задние лапы за 3 минуты. Имеются данные о высокой чувствительности данной реакции для крыс. Указанный метод может служить объективным показателем общего состояния животных.

Для оценки статической мышечной работоспособности применяли метод удерживания животных на горизонтальном стержне. Учитывалось длительность пребывания животного на стержне. Этот метод является наиболее простым и доступным для токсикологических исследований. Он не требует дорогостоящих приборов, и длительность его выполнения может быть учтена с достаточной точностью.

После окончания эксперимента, животных убивали и определяли *массовые коэффициенты внутренних органов*.

Статистическая обработка результатов проводилась по методу Стьюдента в модификации Типпета (14,15).

Кожно-резорбтивное действие препарата изучалось в повторном опыте на 20 белых мышах. Животных помещали в специальные домики, а их хвосты на 2/3 длины погружали в пробирки с суспензией препарата. Экспозиция - 2 часа на протяжении 14 дней. Контрольные животные находились в тех же условиях, а их хвосты погружались в воду. При оценке способности препарата проникать через кожу использовались те же показатели, что и в предыдущем опыте.

Раздражающее и аллергическое действие препарата изучалось на 5 кроликах породы «Шеншилла», согласно Методическим рекомендациям (16,17)

В первой серии опыта проведено тестирование препарата в разных концентрациях. Препарат наносился на выстриженные (3 x3) участки боковой поверхности кожи кроликов 5 раз в неделю на протяжении 2-х недель. Ежедневная экспозиция – 4 часа, после чего препарат смывали водой. Реакцию кожи оценивали по шкале Суворова (18).

Этот опыт позволяет выявить опасность развития неаллергического контактного дерматита и одновременно подобрать оптимальную концентрацию, не обладающую раздражающим действием (рабочую дозу).

Во 2-ой серии, препарат в «рабочей дозе» наносился на левый бок кролика, где выстригался участок кожи размером 4x4 см. Экспозиция 4 часа, 5 раз в неделю, на протяжении 20 дней.

Первое тестирование по шкале оценки кожных проб проводилось через 10 дней. При этом выстригали кожу на противоположном боку кролика и наносили препарат в той же дозе. Реакцию кожи анализировали через 24, 48 и 72 часа после смывания продукта.

При отрицательном результате опыт продолжили и довели число аппликаций до 20, после чего проводили повторное тестирование.

Исследование раздражающего действия препарата на *слизистые оболочки глаз кроликов*.

Препарат в чистом виде в количестве 50 мг вносился при лёгком оттягивании нижнего века в конъюнктивальный мешок правого глаза трём кроликам. После этого веки придерживали в закрытом состоянии в течение одной секунды для предотвращения вытекания препарата. Левые глаза кроликов служили контролем. Наблюдение за состоянием животных проводилось в течение 2-х недель. Оценку раздражающего действия проводили по рекомендациям А.Мaida и К.Chrusaielska (19), учитывая изменение кровенаполнения конъюнктивы, состояние роговицы и радужной оболочки, количество выделений из глаз.

2. Результаты исследований

2.1. Изучение острой токсичности препарата «Амилоцин».

Препарат в виде 70% водной суспензии насильно вводился в желудок с помощью металлического зонда. Было испытано 4 дозы: 4, 6, 8 и 10 г/кг массы тела. Каждая доза вводилась 6 животным. Контрольные животные получали воду в тех же объемах. За животными вели наблюдение в течение 2-х недель после введения, отмечая сроки гибели или выздоровления животных. Учитывали общее состояние животных, сохранение двигательных функций, аппетита,

состояние шерстного покрова, дыхания, реакцию на внешние раздражители. Результаты представлены на таблице № 1.

Таблица №1

Результаты острой токсичности препарата «Амилоцин» в опыте на крысах.

Эффект	Дозы в г/кг			
	4,0	6,0	8,0	10,0
Выжило	6	6	6	6
Погибло	0	0	0	0

Как следует из таблицы, в результате введения животным препарата в диапазоне доз 4-10 г/кг, гибели животных не выявлено, поэтому DL₅₀ определить не представляется возможным. Максимально-переносимой дозой препарата в однократном опыте следует считать дозу - 10 г/кг.

Клиническая картина интоксикации животных не выражена. Все опытные животные были активны, подвижны, хорошо принимали корм и практически не отличались от контрольных животных. При проведении патологоанатомического вскрытия животных изменений печени, почек, сердца и селезёнки выявлено не было.

Таким образом, препарат «Амилоцин», согласно классификации (ГОСТ 12.1.007-76) (20), относится к **4-му классу токсичности (малотоксичное соединение)**.

2.2. Изучение кумулятивных свойств препарата в подостром эксперименте. Использовался метод, рекомендованный для нетоксичных соединений (6). Препарат вводился в желудок белых крыс в постоянной дозе, составляющей 1/5 от максимально-введённой дозы (10 г/кг). Ежедневно вводимая доза составляла 2,0 г/кг с постоянной корректировкой дозы в зависимости от массы тела животных. Длительность эксперимента 14 дней.

В результате гибель животных на протяжении всего опыта отсутствует. Клиническая картина интоксикации не выражена. Лишь в конце эксперимента (на 15 день) была отмечена некоторая заторможенность животных, которая исчезала через 2-е суток после окончания опыта.

Таким образом, препарат «Амилоцин» не способен накапливаться в организме в количестве, способном вызывать отравление и смерть животных.

Для выявления функциональной кумуляции животные обследовались на 5, 10 и 15 дни опыта (при этом животные получили суммарные дозы -10, 20 и 30 г/кг, соответственно). Следует сказать, что эти дозы в несколько раз

больше доз, рекомендуемых производителем в Инструкции по применению. Результаты представлены в таблицах № 2 - 5. На таблице №1 представлены результаты определения массы тела и СПП.

Для выявления функциональной кумуляции животные обследовались на 5, 10 и 15 дни опыта (при этом животные получили суммарные дозы -10, 20 и 30 г/кг, соответственно). Определялась масса животных, регистрировался суммационно-пороговый показатель (СПП), анализировалась кровь (лейкоциты, эритроциты и гемоглобин), измерялись ректальная температура и статическая и динамическая работа.

Результаты представлены в таблицах № 2 и 3. На таблице №2 представлены результаты определения массы тела и СПП.

Таблица № 2.

Масса тела и суммационно-пороговый показатель (СПП) у крыс в условиях подострого эксперимента.

Показатели	Группы	До воздействия	5 день (n=10)	10 день (n=10)	15 день (n=10)
Масса тела (в г)	Контроль Опыт	205,5±2,5 200,8±2,8	215,5±2,5 220,8±2,8	221,8±2,1 225,5±2,0	231,4±2,5 233,9±2,0
СПП, (усл.ед.)	Контроль Опыт	- -	3,5±0,8 3,3±0,5	3,4±0,5 3,6±0,6	3,8±0,4 4,1±0,5

Как следует из таблицы, масса тела и суммационно-пороговый показатель у опытных животных на протяжении всего опыта достоверно не отличался от контрольных величин.

Результаты измерения ректальной температуры, анализа гематологических показателей и некоторых поведенческих реакций животных представлены на таблице №3.

Таблица №3.

Состояние некоторые функциональных показателей крыс в подостром эксперименте.

Показатели	Группы	5 день (n=10)	10 день (n=10)	15 день (n=10)
Гемоглобин, г/л	Контроль	109,2±2,1	112,5±2,0	110,3±3,0
	Опыт	111,9±3,1	110,8±2,5	109,7±2,3
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	Контроль	11,6±2,1	9,9±2,5	11,7±2,1
	Опыт	10,9±2,4	10,9±2,5	12,4±2,4
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	Контроль	4,8±0,35	5,9±0,25	4,9±0,21
	Опыт	5,1±0,41	5,6±0,20	5,9±0,30
Ректальная температура, °С	Контроль	37,1±0,25	36,6±0,20	37,2±0,3
	Опыт	36,9±0,3	36,1±0,21	36,8±0,3
«Тест вставания», (за 3 мин)	Контроль	6,1±1,45	5,5±1,15	5,1±0,95
	Опыт	5,9±1,35	6,3±1,25	4,9±1,00
«Горизонтальный стержень» (сек.)	Контроль	31,3±2,5	33,8±2,0	29,3±1,9
	Опыт	32,4±2,1	34,4±2,0	30,4±2,1

Как следует из представленных данных, все показатели, характеризующие функциональное состояние периферической крови, а также ректальная температура и поведенческие показатели у опытных животных достоверно не отличались от контроля на всём протяжении опыта.

Таким образом, Амилоцин практически не обладает как материальной, так и функциональной кумуляцией даже на уровне доз, в несколько раз превышающих рекомендуемую для практического применения.

При изучении функционального состояния почек определяли диурез, удельный вес мочи, общий белок в моче и хлориды. Результаты представлены в таблице №4.

Таблица №4

Функциональное состояние почек белых крыс
в субхроническом эксперименте.

Показатели	Группы	5 день (n=10)	10 день (n=10)	15 день (n=7)
Диурез (в мл)	Контроль	3,3±1,5	4,8±1,9	4,3±1,5
	Опыт	4,1±1,1	5,2±1,1	4,5±1,5
Уд. вес (в г)	Контроль	1,01±0,01	1,01±0,01	1,01±0,01
	Опыт	1,00±0,02	1,00±0,02	1,00±0,02
Белок в моче (в мг/%)	Контроль	29,2±8,2	30,8±5,0	29,9±3,1
	Опыт	30,6±3,5	31,3±4,1	31,3±3,5
Хлориды (в мг/мл)	Контроль	2,53±0,50	2,35±0,41	2,38±0,25
	Опыт	2,49±0,53	2,50±0,45	2,45±0,20

Как следует из представленной таблицы, у опытных животных все показатели, характеризующие функциональное состояние почек, достоверно не отличаются от тех же показателей контрольных животных на всём протяжении опыта.

Функциональное состояние печени оценивалось по способности органа синтезировать гиппуровую кислоту (обезвреживающая функция) и по содержанию в сыворотке крови общего белка (белковообразовательная функция).

Не менее важными для жизнедеятельности организма животных в целом, а также для оценки печени, является определение в сыворотке крови общих SH-групп. Сульфгидрильные группы (SH-группы) - это функциональные группы в молекулах органических соединений, в т.ч. белков, определяющих их функциональные специфические свойства. SH-группы играют важную роль в образовании внутримолекулярных связей, в том числе -S-S-связи, которая в свою очередь обеспечивает жесткое скрепление отдельных полипептидных цепей, например, в иммуноглобулинах. Результаты определения названных показателей представлены на таблице №5.

Таблица №5.

Некоторые показатели функционального состояния печени животных в конце эксперимента (на 15 день).

Показатели	Гиппуровая кислота в моче (мг/сутки)	Общий белок в сыворотке крови (г/л)	Общие SH-группы в сыворотке крови (мкмоль/100 мл)
Контроль	103,5±2,5	7,2±0,9	24,3±2,4
Опыт	99,8±3,1	6,9±0,8	23,9±3,1

Как следует из таблицы, у опытных животных на данном сроке, в данных условиях все показатели, характеризующие функцию печени, не отличались от контрольных величин.

После окончания опыта, животных убивали и определяли массовые коэффициенты внутренних органов. Результаты представлены в таблице №6.

Таблица № 6.

Массовые коэффициенты внутренних органов животных, подвергавшихся воздействию «Амилоцина».

Показатели	Печень	Почки	Сердце	Селезёнка
Контроль	4,43±0,5	0,83±0,10	0,41±0,05	0,30±0,08
Опыт	4,58±0,8	0,79±0,15	0,43±0,04	0,28±0,09

Как следует из таблицы, массовые коэффициенты органов у животных опытной группы находились на одном уровне с контролем и достоверно от него не отличались, что свидетельствует о том, что этот показатель не является определяющим при воздействии данного препарата.

Таким образом, в условиях субхронического эксперимента «Амилоцин» не вызывал достоверных изменений функциональных показателей на всём протяжении опыта. Это свидетельствует о том, что препарат не обладает как материальной, так и функциональной кумуляцией.

2.3. Изучение биологического действия препарата «Амилоцин» в повторном эксперименте.

Учитывая условия применения данного средства, проведён повторный эксперимент. Выбор доз определялся условиями практического применения. Согласно Инструкции, добавка Амилоцин для лечения домашней птицы при токсикоинфекциях и микотоксикозах применяется с водой, из расчета 0,3 г на голову, 2 раза в день, 5 дней подряд. Молодняку КРС препарат задаётся из расчета 15 г на голову, 10 дней. Поросятам-сосунам средство даётся с молоком в дозе 1 г\гол 10 дней подряд, поросётам-отъёмышам - в дозе 3 г\гол 10 дней. С терапевтической целью: - поросётам-сосунам и поросётам-отъёмышам препарат задаётся в дозе 10 г\гол 5-10 дней подряд. При расчёте доз для эксперимента гарантировать высокой точности было сложно ввиду того, что вес для каждого вида птицы и для каждой породы КРС сильно отличается. Поэтому выбор доз определялся по средней максимальной для всех рекомендованных животных. Таким образом, в эксперимент в качестве терапевтической была испытана доза- 0,4 г/кг (1 группа), вторая группа животных получала дозу на порядок больше - 4,0 г/кг. Животные получали средство с питьевой водой-соответственно:- 4,0 г и 40,0 г на литр воды.

Согласно Правилам проведения эксперимента (4), при 10 дневном применении препарата в практике, длительность эксперимента должна составлять 28 дней. На протяжении опыта животных обследовали, используя интегральные и специфические показатели. Результаты оценки биологического действия препарата представлены в таблицах № 7-15. На таблице № 7 представлены данные определения массы тела животных.

Таблица №7

Масса крыс (г) при воздействии средства на протяжении 28 дней.

Сроки	Кол-во животных	Контроль	0,4 г/кг	4,0 г/кг
Фоновые данные	8	206,9±3,6	203,0±3,4	208,8±3,6
Через 10 дней	8	225,2±3,2	230,9±3,5	231,3±2,9
Через 28 дней	8	246,3±2,5	250,3±3,1	251,2±3,0

Как следует из таблицы, у опытных животных 1-ой и 2-ой групп масса тела и через 10, и через 28 дней была несколько выше, чем в контрольной группе, однако это повышение было не достоверно по сравнению с контрольными величинами.

На таблице №8 представлены результаты оценки суммационно-порогового показателя (СПП), мышечной силы животных и ректальной температуры.

Таблица № 8.

Некоторые функциональные показатели крыс
в 2-х недельном эксперименте

Показатели	Сроки воздействия	Контроль	0,4 г/кг	4,0 г/кг
СПП	10 дней	$3,3 \pm 0,25$	$3,9 \pm 0,21$	$3,1 \pm 0,21$
	28 дней	$3,9 \pm 0,23$	$3,9 \pm 0,21$	$5,9 \pm 0,21$ $P < 0,05$
Ректальная температура, °С	10 дней	$37,1 \pm 0,3$	$37,9 \pm 0,5$	$38,1 \pm 0,7$
	28 дней	$36,9 \pm 0,5$	$37,5 \pm 1,0$	$37,9 \pm 0,5$
«Тест вставания», (за 3 мин)	10 дней	$11,5 \pm 1,3$	$12,5 \pm 1,3$	$10,8 \pm 1,5$
	28 дней	$12,1 \pm 1,5$	$13,9 \pm 1,5$	$9,1 \pm 1,6$
«Горизонтальный стержень» (сек.)	10 дней	$30,5 \pm 1,9$	$27,8 \pm 2,1$	$28,9 \pm 1,5$
	28 дней	$29,5 \pm 1,5$	$25,3 \pm 2,0$	$26,5 \pm 2,0$

Как следует из таблицы, у животных, подвергавшихся воздействию препарата в дозе 0,4 г/кг, все показатели достоверно не отличались от контроля.

В группе, получавших препарат 4,0 г/кг достоверно повысился СПП, что проявлялось в некоторой заторможенности животных. Поведенческие показатели также несколько были снижены, однако это снижение было недостоверно по сравнению с контролем.

Анализ периферической крови проводился с помощью определения гемоглобина и подсчета лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. Кроме того, определялись расчетные величины, характеризующие состояния эритроцитов. Результаты представлены в таблице № 9.

Таблица №9
Функциональное состояние периферической крови
белых крыс повторном эксперименте.

Сроки	Группы	Лейкоциты	Гемоглобин	Эритроциты	Тромбоциты
Через 10 дней	Контроль	15,1±0,75	137,2±3,45	6,75±0,34	626,5±16,7
	0,4 г/кг	16,5±1,1	132,1±3,55	5,9±0,28	623,8±17,8
	4,0 г/кг	15,8±1,5	139,6±4,08	6,40±0,57	619,7±15,2
Через 28 дней	Контроль	16,8±0,88	142,2±3,3	4,9±0,23	628,5 ±14,3
	0,4 г/кг	17,5±1,08	139,5±2,2	5,4±0,19	619,6±20,8
	4,0 г/кг	15,9±1,5	138,4±3,5	5,1±0,20	622,7±15,2

Как следует из таблицы, у опытных животных все показатели крови были статистически не достоверными по сравнению с контролем и через 10, и через 28 дней.

Для оценки функционального состояния периферической крови использовали также расчетные величины, позволяющие количественно оценить некоторые показатели состояния эритроцитов. Результаты представлены на таблице № 10.

Таблица №10

Индексы эритроцитов крови белых крыс в 2,0-х недельном эксперименте.

Сроки	Группы	Ht	MCV	MCH	MCHC	RDW
Через 10 дней	Контроль	30,7±1,8	49,3±0,8	25,3±0,5	466,6±2,5	14,8±0,4
	0,4 г/кг	31,5±1,5	50,1±1,5	24,6±0,5	479,0±2,9	14,1±0,5
	4,0 г/кг	30,6±2,1	48,8±0,4	25,9±0,8	467,8±2,5	15,0±0,8
Через 28 дней	Контроль	29,4±1,6	41,0±1,3	24,7±0,6	476,0±3,3	15,1±0,5
	0,4 г/кг	31,3±1,5	43,8±1,5	25,1±0,5	473,6±6,1	14,9±0,7
	4,0 г/кг	30,3±1,5	42,4±1,9	25,5±0,3	474,8±4,3	14,9±0,8

Обозначения: Ht- Гематокрит; MCV- средняя величина объема эритроцитов, измеряемая в фемтолитрах или мкм³ (fl); MCH- среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC- средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDW- ширина распределения эритроцитов по размеру.

Как следует из таблицы, индексы эритроцитов крови белых крыс опытных животных достоверно не отличаются от таковых контрольных животных, а значит, не являются ведущими при действии на животных препарата «Амилоцин» в реальных условиях.

При **изучении функционального состояния почек** определяли диурез, удельный вес мочи, общий белок в моче и хлориды. Результаты представлены в таблице №11.

Таблица №11.

Функциональное состояние почек после воздействия «Амилоцина» на белых крыс в повторном эксперименте

Показатели	Сроки	Контроль	0,4 г/кг	4,0 г/кг
Диурез (в мл)	10 дней	4,3±1,8	5,0±1,5	4,8±1,3
	28 дней	4,5±1,5	4,9±1,1	4,1±1,5
Уд. вес (в г)	10 дней	1,00±0,01	1,01±0,01	1,01±0,01
	28 дней	1,00±0,01	1,00±0,02	1,00±0,02
Белок в моче (в мг/%)	10 дней	26,8±4,1	27,2±8,5	31,3±4,0
	28 дней	27,9± 3,5	29,8±4,5	30,6±3,3
Хлориды (в мг/мл)	10 дней	2,30±0,19	2,43±0,50	2,61±0,23
	28 дней	2,40±0,20	2,41±0,30	2,58±0,25

Как следует из представленной таблицы, у животных опытных групп все показатели, характеризующие функциональное состояние почек, достоверно не отличаются от тех же показателей контрольных животных, как через 10 дней, так и через 28 дней воздействия препарата.

Функциональное состояние печени оценивалось по способности органа синтезировать гиппуровую кислоту (обезвреживающая функция) и по содержанию в сыворотке крови общего белка (белковообразовательная функция). Результаты представлены в таблице № 12.

Таблица №12

Некоторые показатели функционального состояния печени животных в повторном эксперименте.

Показатели	Сроки	Контроль	0,4 г/кг	4,0 г/кг
Гиппуровая кислота (мл)	10 дней	112,2±7,4	114,5±7,5	119,5±5,9
	28 дней	110,1±7,0	112,5± 6,8	109,6±5,1
Общий белок в сыворотке крови (г/%)	28 дней	5,96±1,5	6,08±1,8	6,15±2,1

Как следует из таблицы, все выбранные показатели, характеризующие функцию печени опытных животных, достоверно не отличаются от тех же показателей контрольных животных.

Результаты определения общих SH-групп в сыворотке крови белых крыс, подвергавшихся воздействию данного средства, представлены в таблице №13. Как следует из таблицы, на всём протяжении эксперимента у опытных белых крыс величины SH-групп колебались в пределах контрольных значений и достоверно от них не отличались.

Роль **иммуноглобулинов** в организме заключается в их участии в процессах иммунитета. Защитная функция иммуноглобулинов обусловлена содержащимися в этой фракции разнообразными антигенами, способными специфически связывать чужеродные антигена. Патологические количественные и функциональные изменения иммуноглобулинов могут быть обусловлены нарушением их синтеза в результате химической интоксикации, вызывающей снижение их содержания в сыворотке крови. Изучение иммунного статуса организма белых крыс, подвергавшихся воздействию средства, представлены в той же таблице.

Таблица №13.

Содержание SH-групп в сыворотке крови и состояние иммунной системы белых крыс через 28 дней .

SH-группы (мкмоль/л)	Контроль	0,4 г/кг	4,0 г/кг
Общие	16,1±0,75	17,5± 0,48	16,7 ± 2,3
Небелковые	12,3±0,8	10,7±0,30	11,4±1,4
Белковые	4,1±0,6	6,9±0,50	5,1±1,3
Иммуно- глобулины__ (мг/кг)__	22,5±1,8	23,9±1,5	24,9±1,1

Как следует из таблицы, результаты изучения иммунного статуса организма белых крыс, подвергавшихся воздействию препарата, также указывают на отсутствие вредного влияния «Амилоцина» на данный показатель. Имеется даже некоторая стимуляция иммунной системы у животных обеих опытных групп.

После окончания опыта, животных убивали и определяли **массовые коэффициенты внутренних органов**. Результаты представлены в таблице №14.

Таблица №14.

Массовые коэффициенты внутренних органов животных, подвергавшихся воздействию препарата.

Группа	Печень	Почки	Сердце	Селезенка
Контроль	2,9±1,9	0,854±0,18	0,39±0,05	0,29±0,07
0,4 г/кг	3,1±1,3	0,849±0,15	0,41±0,09	0,28±0,09
4,0 г/кг	3,0±1,5	0,850±0,20	0,37±0,09	0,31±0,07

Как следует из таблицы, массовые коэффициенты почек, сердца и селезенки животных всех опытных групп находились на одном уровне с контролем и достоверно от него не отличались.

2.4. Раздражающее и аллергическое действие препарата «Амилоцин».

Первоначально (1 серия опыта), для выявления контактного дерматита, а также с целью получения оптимально недействующей дозы, (т.е. "рабочей дозы"), была испытана суспензия препарата в разных соотношениях с 2% крахмалом. Были испытаны концентрации - 80,50 и 30%. Крахмал был выбран для получения консистенции, удобной для аппликации на кожу. Препарат наносился на выстриженные участки кожи кроликов, размером 3x3 и фиксировался пластырем «Оптипласт». Экспозиция 4 часа, на протяжении 2-х недель.

В результате, ни одна из концентраций не вызвала раздражения кожи, поэтому для сенсibilизации была выбрана максимальная концентрация - 80% (рабочая доза)

Исследование **аллергического действия** «Амилоцина» проводили путем 20-ти повторных накожных аппликаций на участок боковой поверхности туловища, размером 4x4 см, по 5 раз в неделю. «Рабочая доза» кормовой добавки наносилась в виде суспензии равномерным слоем и фиксировалась пластырем. Первое тестирование проводили через 10 аппликаций. При этом выстригали участок кожи на противоположном боку кролика и наносили продукт. Реакцию кожи анализировали через 24, 48 и 72 часа.

Результаты показали отсутствие каких-либо признаков сенсibilизации кроликов к препарату. У животных не отмечено покраснения кожи, расчесов,

отёка, утолщения кожной складки, изменений цвета кожи. Не наблюдалось также каких-либо проявлений беспокойства в поведении опытных животных в сравнении с контролем. Опыт продолжили и довели число аппликаций до 20, после чего проводили повторное тестирование, которое дало аналогичные результаты.

Таким образом, был сделан окончательный вывод о том, что кормовая добавка «Амилоцин» в данных условиях и на данном виде животных не обладает как раздражающим, так и аллергическим действием на кожу.

Для количественной оценки сенсибилизации использовался тест для выявления реакции клеток крови опытных и контрольных животных на аллерген *in vitro* – реакция специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ), а также подсчет количества эозинофилов и базофилов. Результаты представлены на таблице №15.

Таблица №15.

Результаты оценки сенсибилизирующего действия «Амилоцина».

Группы	РСЛЛ (в %)	Количество эозинофило в (%)	Количество базофилов (%)
Контроль	8,0±0,5	3,1±0,32	0,06±0,001
Опыт	7,9±0,7	3,5±0,28	0,05±0,001

Как следует из данной таблицы, количественная оценка сенсибилизации подтвердила отсутствие аллергических свойств у «Амилоцина».

2.4.1. Для изучения влияния «Амилоцина» на слизистые оболочки глаз кроликов, препарат в чистом виде вводили в конъюнктивальный мешок правого глаза в количестве 50 мг. Левый глаз служил контролем.

После введения препарата в конъюнктивальный мешок кролики почти сразу открыли глаза и не проявляли особого беспокойства. Дальнейшие наблюдения за животными также не выявили у опытных кроликов каких либо изменений со стороны слизистой глаз.

2.4.2. *Кожно-резорбтивное действие препарата «Амилоцин»* изучалось на 20 белых мышях (10 в контроле, 10 в опыте). Хвосты опытных мышей погружали в густую суспензию препарата с крахмалом. Время экспозиции - 2 часа, ежедневно, на протяжении 5-ти дней.

Как показали исследования, опытные мыши на протяжении всего эксперимента практически не отличались от контрольных. Клиническая

картина интоксикации животных отсутствует, внешний вид мышей, как опытных, так и контрольных, после окончания эксперимента был несколько взъерошенным, что объяснялось некомфортными условиями опыта. Через 1 час они приходили в норму. При осмотре хвостов каких-либо признаков раздражения не выявлено.

Для объективной оценки кожно-резорбтивного действия препарата, было проведено обследование мышей по некоторым показателям. После взвешивания, у животных был определен суммационно-пороговый показатель и взята кровь для определения гемоглобина, лейкоцитов и эритроцитов. Результаты представлены в таблице №16.

Таблица № 16.

Состояние некоторых показателей мышей после аппликации «Амилоцина» на кожу хвостов в течение 5 дней.

Группы	Масса (г)		СПП (усл. ед.)	гемоглобин. г/л	лейкоциты $10^9/л$	эритроциты $10^{12}/л$
	до возд.	после возд.				
Опыт	21,7±0,46	22,5±0,39	3,5±0,13	101,6±2,13	6,735 ±0,5	4,781 ±0,5
Контр.	22,1±0,40	23,1±0,38	3,7±0,15	99,9±2,18	7,102 ±0,5	5,161 ±0,8

Как следует из таблицы, масса тела и показатели, характеризующие функциональное состояние периферической крови у животных опытной группы достоверно не отличались от тех же показателей в контроле.

Кроме того, у этих животных проведена регистрация показателей, характеризующих двигательную активность. Использованы: - метод «плавания», вертикальный компонент и способность мышей удерживаться на горизонтальном стержне. Результаты представлены в таблице № 17. Как следует из представленных результатов, показатели, характеризующие работоспособность животных и в какой-то мере состояние центральной нервной системы, как у контрольных, так и у опытных мышей находятся на одном уровне и достоверно не отличаются друг от друга.

Таблица №17.

Статическая и динамическая работа мышей после воздействия «Амилоцин» на кожу хвостов.

Группы	Плавание(мин)	«Тест вставания»	Удерживание на стержне (сек)
Контроль	10,5 ± 1,8	6,6 ± 1,5	21,5 ± 3,5
Опыт	19,8 ± 1,6	5,9 ± 1,9	22,6 ± 3,8

Таким образом, данные, полученные в настоящем опыте, показывают, что «Амилоцин» не способен проникать через кожу в количестве, вызывающем отравление, т.е. не обладает кожно-резорбтивным действием.

ВЫВОДЫ

1. DL₅₀ препарата «Амилоцин» определить не удалось. Максимально введенная доза - 10 г/кг не вызвала гибели животных и симптомов отравления, что свидетельствует о том, что препарат при однократном введении в желудок малотоксичное соединение (IV класс опасности, ГОСТ 12.1007-76) (2).
2. Препарат Амилоцин не обладает материальной и функциональной кумуляцией в подостром эксперименте.
3. В повторном (28 дневном) эксперименте, который предусматривал оценку токсичности препарата при действии дозы терапевтической и на порядок больше, не было выявлено каких либо патологий со стороны печени, почек и крови. Достоверное повышение СПП имело место только после многократного введения препарата на уровне доз, в 10 раз превышающих реальные.
4. При контакте с кожей мышей, препарат не обладает местным и кожно-резорбтивным действием.
5. «Амилоцин» не обладает аллергическим действием при многократном (20 аппликаций) контакте с кожей кроликов.
6. При однократном введении в конъюнктивальный мешок глаза кроликов препарат не вызывает раздражения - состояние слизистой оболочки глаза, век и роговицы в день контакта и в последующие дни не отличалось от контрольных животных.

Таким образом, кормовая добавка «Амилоцин» - практически не токсичное соединение при однократном введении в желудок и при выпаивании с водой. Не кумулирует в организме в условиях 2-х недельного введения. В 28 дневном эксперименте на уровне терапевтических доз и на порядок выше «Амилоцин» не способен вызывать каких-либо нарушений со стороны важных для организма систем. Не обладает кожно-резорбтивным действием. Препарат не обладает местным, раздражающим и аллергическим действием. Не способен вызывать раздражения слизистых оболочек глаз у кроликов.

Список использованной литературы

1. Приказ МЗ СССР №1045-73 от 6.04.73 г. «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально биологических клиник (вивариев)».
2. Правила лабораторной практики// Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №708н от 23.08.10.
3. Приказ МЗ СССР №1179 от 10.10.83 г «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».
4. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (Токсикометрия). Под ред. проф. И.В. Саноцкого, М., Медицина, 1970.
5. Методы испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности. М., 1998, ч.1, 3.
6. Каган Ю.С. Профилактическая токсикология. Т.2, часть 1, М., 1984, стр 219.
7. Сперанский С.В. О преимуществах использования нарастающего тока при изучении способности белых мышей к суммации подпороговых импульсов. Фарм. и токс., 1965, 1, 123-124.
8. Предтеченский В.Е. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям. М., 1960, с.315.
9. Степанова Н.Г. Модифицированный метод исследования функции печени у мелких лабораторных животных. Лаб. дело, 1962, 5, 49-52.
10. Фоломеев Ф.И. Фотоколориметрический микрометод определения SH- групп белка и небелковых соединений крови. Лабораторное дело, 1981, 1, 33-35.

11. Травина О.В. Руководство по биохимическим исследованиям. 1955, 178.
12. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования., М., Медиздание, 1973.
13. Методические рекомендации по исследованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования. М., 1987.
14. Прозоровский В.Б. Рекомендации по статистической обработке результатов токсикологических исследований. – М, 1965, 36с.
15. Беленький М.А. Эксперименты количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1983, 71 стр.
16. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих
17. раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны. М., 1980.
18. Постановка исследований по гигиеническому нормированию пром. аллергенов в воздухе рабочей зоны. Методические указания, Рига, 1980.
19. Суворов С.В., Чернышова В.И. К вопросу о количественной оценке гиперемии, как показателя интенсивности и воспаления. – Вестник дерматологии и венерологии, 1974, № 6, с.22-24.
20. Maida A., Chrusielska K. Medizina Pracy, XX1Y, 1973, 3.
21. ГОСТ 12.1.007-76. «ССБТ Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». Гос. стандарт., М., 1976.