

УДК 619:615.9:616-008.9

## ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРЕПАРАТА «АЕСЕЛ»

Белявский В.Н., Ушаков С.С.

<sup>1</sup>УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

*Разработка новых препаратов селена в комплексе с витаминами с целью уменьшения токсичности микроэлемента и повышения его биодоступности является актуальной задачей ветеринарной медицины. Нами были проведены токсикометрические исследования нового антиоксидантного водорастворимого комплекса «Аесел», включающего селен, как продукт взаимодействия селенита натрия и метионина механоактивированный, витамины А и Е.*

*Были определены летальные дозы препарата для мышей и крыс при внутрижелудочном и подкожном введении. По результатам токсикометрической оценки действия препарата «Аесел» на крыс при внутрижелудочном введении, было установлено, что он относится к четвертому классу опасности, т.е. незначительно опасным веществам.*

*The development of new preparations of selenium in complex with vitamins for the purpose of decrease of toxicity of the trace element and increase of its bioavailability is the topical problem of veterinary science. We researched new antioxidant water-soluble complex "Aesel" which includes selenium as the activated product of interaction of methionine and selenite of sodium, vitamins A and E.*

*Lethal doses of the preparation for mice and rats were identified through intragastric and subcutaneous introduction. Due to the results of the research it was determined that "Aesel" is rated among the fourth class of danger, so it is dangerous to a very little degree.*

**Введение.** Территория Республики Беларусь относится к биогеохимическим провинциям с недостаточным содержанием селена. Недостаток селена в кормах приводит к развитию эндемического заболевания «Беломышечная болезнь». Она проявляется нарушениями минерального, белкового и углеводного обменов [1]. Нарушается биохимический и морфологический статус сердечной и скелетной мускулатуры [2]. Канюка отмечает, что при дефиците селена постепенно появляются и генерализуются некротические очаги в печени и дистрофические изменения в скелетной и сердечной мускулатуре, которые сопровождаются у самок после их оплодотворения рассасыванием эмбрионов в матке [3]. У поросят поражение печени, сопряженное с селенодефицитом, проявляется в виде токсической дистрофии, которая нередко заканчивается летальным исходом [2].

Столь нежелательные последствия гипоселенозов послужили причиной разработки и широкого применения различного рода кормовых добавок и препаратов, содержащих органические и неорганические формы селена, для профилактики селеновой недостаточности у животных. Изначально наибольшее распространение получили препараты селена неорганической формы – это селенит и селенат натрия, которые в некоторых хозяйствах до сих пор активно используются. Эти соединения отличаются весьма маленькой терапевтической широтой и, в связи с этим, даже при относительно небольшой передозировке способны вызывать серьезные патоморфологические нарушения и отравления, а поэтому требуют очень точного дозирования и приготовления растворов непосредственно перед применением [4,5,6]. Для крыс среднесмертельная доза селенита натрия составляет 3-4 мг/кг живой массы [2].

Альтернативой этим соединениям явились новые органические формы селена, полученные в результате природного или искусственного соединения микроэлемента с аминокислотами, чаще метионином либо цистеином. Эти соединения отличаются более высокой биодоступностью и биоусвояемостью.

Наибольшей профилактической и терапевтической активностью отличаются комплексные препараты селена, содержащие в своем составе дополнительно различные витамины, увеличивающие его биодоступность, снижающие токсические свойства микроэлемента и повышающие биологическую ценность препарата. Результатом наших исследований явилась разработка нового селенсодержащего препарата «Аесел».

Препарат «Аесел» является антиоксидантным комплексом. Входящий в его состав витамин Е представляет собой основной эндогенный антиоксидант неферментативного звена антиоксидантной защиты. Он предупреждает окисление селена, подавляет перекисное окисление липидов биологических мембран, угнетает образование липоперекисей, разрывает цепь свободнорадикального окисления, путем взаимодействия с активными радикалами и образования нейтральных молекул [6, 7].

Витамин А, участвуя в обмене сероорганических соединений, используется организмом для обезвреживания эндогенных метаболитов и ксенобиотиков, ингибируя превращение сульфидрильных групп в дисульфидные, проявляет тем самым антиоксидантные свойства [7].

Селен, включаясь в состав селензависимой глутатионпероксидазы участвует во многих окислительно-восстановительных процессах и предохраняет клетки от токсического воздействия гидроперекисей, является синергистом многих антиоксидантов, в том числе витаминов А и Е [8].

*Цель исследований.* Провести токсикометрическую оценку антиоксидантного комплекса «Аесел» методом индуцирования острой формы отравления лабораторных животных при внутрижелудочном и подкожном его введении.

*Материалы и методы исследований.* Препарат «Аесел» представляет собой стерильную, бесцветную жидкость, со специфическим запахом, легко растворимую в воде. В 1 миллилитре препарата содержится: витамин А – 50000 ИЕ, витамин Е – 50 мг и микроэлемент селен 1мг (продукт взаимодействия селенита натрия и метионина механоактивированный ТУ 600049853.024-2000).

Исследования по изучению острой токсичности проводились на кафедре «Фармакологии и физиологии» УО «ГТАУ», согласно существующим методическим указаниям [9,10,11].

Перед реализацией токсико-фармакологических исследований был проведен литературно-информационный поиск сведений, отражающих биологические свойства и токсикологическую характеристику компонентов изучаемого препарата. Исходя из полученных результатов, на десяти животных (белых мышах) была определена ориентировочная летальная доза LD<sub>50</sub>, которая составила 6 мг/кг массы тела.

Затем для постановки опытов на острую токсичность были сформированы группы животных, состоящие из половозрелых крыс и мышей со средней живой массой соответственно 160-180г и 20-25г, прошедших 14 дневный карантин в виварии Гродненского медицинского университета. Внутри группы колебания по массе не превышали 10%. Рацион животных был аналогичен рациону вивария, доступ к воде свободный.

Исследования острой токсичности проводились при парэнтеральном и энтеральном введении препарата на двух видах животных (мышах и крысах).

Для токсикометрической оценки препарата при парэнтеральном введении было сформировано из самцов и самок, содержавшихся отдельно, 8 групп крыс (по 10 животных в каждой) и 6 групп мышей (по 6 животных в каждой). Крысам с соблюдением правил асептики и антисептики были введены следующие дозы препарата «Аесел» из расчета миллиграмм чистого селена на килограмм живой массы, подкожно: первой группе – 1, второй – 2,5, третьей – 3, четвертой – 5, пятой – 6, шестой – 7,5, седьмой – 10, восьмая группа оставалась контрольной – этим животным вводился физраствор. Мышам препарат вводился из расчета по чистому селену мг/кг: первая группа – 5, второй – 6,5, третьей – 7,5, четвертой – 8,5, пятой – 10, шестая группа оставалась контрольной, ей также подкожно вводился физраствор.

Для исследования острой токсичности при энтеральном пути введения также было сформировано 7 групп крыс по 8 голов в каждой, которым при помощи зонда внутрижелудочно был введен препарат «Аесел» из расчета чистого селена на килограмм живой массы мг/кг: животным первой группы 14, второй – 28, третьей – 31, четвертой – 42, пятой – 49, шестой – 56, седьмая группа служила контролем - ей вводился физраствор.

Препарат вводили натощак, после суточной голодной диеты. После введения препарата корм животные получали спустя 3 часа.

За животными на протяжении 14 дней велось ежедневное клиническое наблюдение, причем в первые сутки наблюдение осуществлялось через каждые 10 минут первого часа, а затем каждые 2 часа. В качестве учитываемых показателей токсического действия препарата регистрировались: масса животных, общее состояние, особенности поведения, наличие и характер судорог, координация движения, тактильная, болевая, звуковая и световая чувствительность, состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста, консистенция каловых масс, потребность в корме и воде. Все павшие животные в процессе опыта были подвергнуты патологоанатомическому исследованию не позднее, чем через 2 часа после смерти. При вычислении летальных доз препарата использовались методы Кёрбера и Першина [6].

*Результаты исследований и обсуждение.* В процессе наблюдения за крысами в течение 14 дней после введения препарата была зафиксирована определенная стадийность в проявлении токсических эффектов. Вначале у животных наблюдалось общее угнетенное состояние с сохранением звуковой, световой и тактильной чувствительности. Затем проявлялись резкие движения конечностей с перемещением животного вперед, после чего наступала длительная неподвижная пауза. Затем появлялся зуд, дрожь и судороги. Отмечались нарушения со стороны центральной нервной системы. Терялась вначале звуковая, затем тактильная, а последней – болевая чувствительность. Дыхание изменялось от поверхностного до чередующегося глубокого прерывистого с поверхностным учащенным. Далее животное впадало в ступорное состояние и умирало, либо постепенно угнетенное состояние сменялось апатией и животное выживало. Время проявления стадийности зависело от дозы введенного препарата. Кроме того, у некоторых животных наблюдались аллопеции, в основном в области

глаз, что является явным признаком развития гипervитаминоза А.

После введения препарата крысы отличались угнетенным состоянием, анорексией, наличием в последующем выраженной жажды (количество потребляемой воды увеличивалось в группах, получавших препарат в более высоких дозах).

В результате подсчетов по методу Першина было установлено, что LD<sub>50</sub> для крыс при подкожном введении составила 5,48 мг чистого селена на килограмм массы тела.

При подсчете LD<sub>50</sub>, LD<sub>16</sub> и LD<sub>84</sub> методом наименьших квадратов с использованием пробит-анализа при подкожном введении были получены следующие результаты по чистому селену мг/кг:

- LD<sub>16</sub> = 3.39
- LD<sub>50</sub> = 5.33
- LD<sub>84</sub> = 7.27
- LD<sub>100</sub> = 8.24

График летальности при подкожном введении

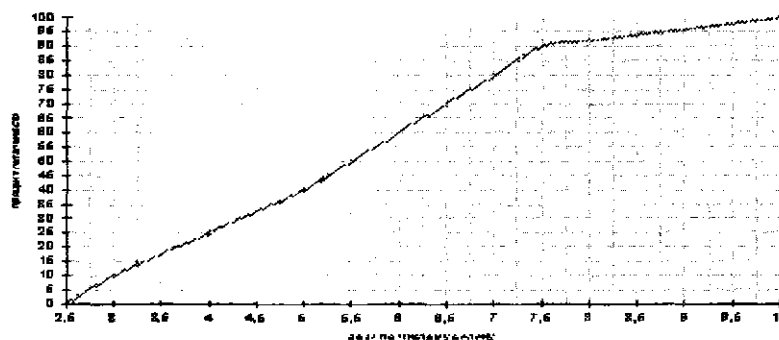


Рис 1.

В результате выведения зависимостей между дозой и коэффициентом летальности были получены данные, которые представлены на рисунке 1.

Расчеты по методу Кербера показали, что LD<sub>50</sub> препарата «Аесел» для крыс при подкожном его введении составила 5,42 мг/кг массы тела.

Введение препарата «Аесел» привело к изменению приростов живой массы (табл. 1). Эти изменения отражают степень выраженности токсической реакции. Существенное снижение живой массы обусловлено длительными периодами анорексии. Однако данные результаты являются ориентировочными, поскольку учитывалась масса тела только выживших животных. Большинство животных погибли в первые 3 дня эксперимента, а поэтому их масса тела существенно не отличалась от первоначальной.

Таблица 1. Динамика массы крыс при парэнтеральном введении препарата «Аесел»

Масса тела, г	Доза препарата по чистому селену мг/кг							
	1	2,5	3	5	6	7,5	10	конт
До введения препарата	165,0 ±1,4	166,8 ±2,6	166,4 ±1,2	168,8 ±1,5	166,7 ±1,2	165,2 ±1,3	171,4 ±1,4	173,7 ±1,26
На 14 день эксперимента	179,0 ±2,9	169,8 ±2,4	160,0 ±1,1	138,4 ±1,0	127,3 ±1,4	121,0	0	195,4 ±1,24
Прирост за 14 дней опыта, г	+14	+3	-6,4	-30,4	-39,4	-44,2	-	+21,7

Патологоанатомическое исследование павших крыс, проводимое сразу или в течение 2 часов после падежа, позволило выявить изменения, степень и тяжесть которых находилась в прямой зависимости от вводимой дозы препарата. При внешнем осмотре трупов у большинства животных ротовое отверстие было закрыто, слизистые оболочки анемичны, без кровоизлияний, анус закрыт, шерстный покров чистый и плотно прилегающий к телу, место инъекции без видимых изменений. Однако у некоторых животных, получавших препарат «Аесел» в дозе 7,5 и 10 мг/кг подкожная клетчатка имела слабо выраженную иктеричность, а у части павших животных отмечались кровотечения из ротовой полости.

Посистемное обследование трупа не выявило нарушений со стороны желудочно-кишечного тракта, он был наполнен кормом, слизистая светло-серого цвета без эрозий и язв. Однако были зафиксированы макроскопические нарушения морфологии печени. У крыс, получивших препарат в дозе 5,0, 6,0 и 7,5 мг/кг, печень была увеличена в объеме, темно-красного цвета, упругой консистенции, на поверхности органа наблюдалась ярко выраженная зернистость. У животных, получивших препарат в дозе 10,0 мг/кг, печень была увеличена в объеме, имела окраску бордового или песочного цвета. При этом орган отличался дряблой консистенцией. У крыс, получивших меньшие дозы препарата, увеличения органа не отмечалось, однако наблюдалась слабо выражен-

ная зернистость

Нарушений со стороны дыхательной системы у большинства животных всех групп выявлено не было, но были зафиксированы отдельные случаи отека легких, характеризующиеся наличием участков гиперемии, легкие таких животных, находясь в воде, тяжело плавали. Причиной отека легких является выход селенистого газа, который образуется в организме животных при взаимодействии селена с металлами.

Характерные изменения были выявлены в почках павших животных. Они были увеличены в объеме, граница между корковым и мозговым веществом была стерта, но различима у крыс, получивших препарат в дозе 5,0 и 6,0 мг/кг. У животных получивших 7,5 и 10 мг/кг препарата по чистому селену, граница между корковым и мозговым веществом была неразличимой. Селезенка у всех животных кровенаполнена, слегка увеличена в объеме. Со стороны остальных органов и систем нарушений обнаружено не было.

Патоморфологические изменения печени, почек и легких связаны с фармакокинетическими особенностями селена и витаминов А и Е. Известно, что наибольшее количество селена в организме животных находится именно в почках и печени, кроме того печень является депо витаминов А и Е и соответственно участвует в их обмене. Введение токсических доз препарата «Аесел» приводит к увеличению нагрузки на печень и почки, связанную с биотрансформацией и элиминацией компонентов препарата, а затем к развитию различных патологических процессов в данных органах. Кроме того, доказано, что антиоксиданты при превышении терапевтических доз проявляют прооксидантный эффект, связанный с активизацией процессов перекисного окисления липидов и соответственно повреждением биологических мембран клеток, с последующим их разрушением.

Клинические наблюдения за крысами, которым вводили препарат «Аесел» внутрижелудочно, показали, что общее состояние животных изменялось с такой же стадийностью, как и при парентеральном введении, однако проявление токсических эффектов наблюдалось при более высоких дозах препарата.

В результате подсчетов по методу Першина было установлено, что LD<sub>50</sub> для крыс при внутрижелудочном введении составила 39 мг чистого селена на килограмм массы тела.

При подсчете LD<sub>50</sub>, LD<sub>16</sub> и LD<sub>84</sub> методом наименьших квадратов с использованием пробит-анализа при внутрижелудочном введении препарата были получены следующие результаты по чистому селену мг/кг:

LD<sub>16</sub> = 25,6  
LD<sub>50</sub> = 39,1  
LD<sub>84</sub> = 54,6  
LD<sub>100</sub> = 61,9

При патологоанатомическом вскрытии павших животных были выявлены изменения в печени, почках и селезенке. Органы были увеличены в объеме, в некоторых случаях дряблой консистенции, морфологические границы стертые. Печень у одних животных темно-красного, у других - песочного цвета. Такие изменения характеризуют выраженную интоксикацию организма.

Динамика массы крыс за 14 дней была отрицательной, что свидетельствует о развитии токсикоза, тяжесть которого напрямую коррелирует с темпами рота животных (табл. 2).

Таблица 2. Динамика массы крыс при энтеральном введении испытуемого препарата.

Масса животных, г	Доза препарата по чистому селену, мг/кг						
	14	28	31	42	49	56	конт
До введения препарата	162,1 ±1,2	163,0 ±1,1	166,1 ±1,2	162,8 ±1,0	164,4 ±1,0	162,6 ±0,9	170,25 ±1,49
На 14 день эксперимента	154,6 ±0,7	143,1 ±2,0	142,6 ±1,2	120,3 ±1,3	116,5 ±1,5	0	192,4 ±1,44
Прирост массы за 14 дней опыта, г	-7,5	-19,9	-23,5	-42,5	-47,9	-	+22,15

Таким образом, исследования острой токсичности препарата «Аесел» при энтеральном введении белым крысам показали, что он относится к веществам четвертого класса опасности (ГОСТ 12.1.007-76).

При проведении опыта по определению летальных доз для мышей были зафиксированы изменения со стороны центральной нервной системы, которые проявлялись нарушениями координации движения животных, шаткой походкой и падениями. При таких симптомах животные умирали. Состояние кожного и шерстного покрова у большинства животных были без изменений, однако встречались особи с участками аллопедий в основном в области глаз и в месте инъекции. Падеж животных регистрировался, как правило, в первые три дня.

LD<sub>50</sub> для мышей, рассчитанная по методу Першина, при подкожном введении составила по чистому селену 7,72 мг/г.

При подсчете LD<sub>50</sub>, LD<sub>16</sub> и LD<sub>84</sub> методом наименьших квадратов с использованием пробит-анализа были получены результаты по чистому селену мг/кг:

LD<sub>16</sub> = 5,8  
LD<sub>50</sub> = 7,7  
LD<sub>84</sub> = 8,7  
LD<sub>100</sub> = 9,4

Мыши отличались от крыс меньшей восприимчивостью к действию препарата, но клиническое проявление, патологоанатомические изменения были примерно такими же, как и у крыс.

## Ученые записки УО ВГАВМ. том 44, выпуск 2

**Заключение.** При проведении токсикометрических исследований препарата «Аесел» на белых крысах и мышях было установлено, что  $LD_{50}$  препарата по чистому селену, рассчитанная по методу Першина, для крыс при парентеральном введении равна 5,48, при энтеральном введении – 39, для мышей при парентеральном введении – 7,72 мг/кг.  $LD_{50}$  препарата, рассчитанная по всем составляющим компонентам, оказалась равной 39000 мг/кг. Следовательно, по ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к незначительно опасным веществам.

**Литература.** 1. Кучинский, М.П. Биоэлементы – фактор здоровья и продуктивности животных: монография/ М.П. Кучинский. – Минск: Бизнесофсет, 2007. – 372с. 2. Ветеринарная токсикология: Учебное пособие/О.А. Малинин [и др.]/ Корсунь-Шевченко-Ковский: ЧП Майдаченко, 2002. – 464с. 3. Клінічна ветеринарна фармакологія/О.І. Канюка, В.Р. Файтельберг-Бланк, Ю.П. Лизогуб [и др.]/Навчальний посібник за редакцією О.І. Канюки. – Одесса: «Астропринт», 2006. – 296с. С.109 4. Виноградов, В.Н. Обмен веществ и продуктивность коров при скормливании концентратов с органической формой селена/ В.Н. Виноградов, Ю.А. Кузнецов, Я.М. Бадалов\ \ Доклады Российской Академии сельскохозяйственных наук 2003. - 6:29-31. 5. Cummins LM, Kimura ET. Safety evaluation of selenium sulfide antidandruff shampoos/ Toxicol Appl Pharmacol. - 1971. - 20:89-96. 6. Olson OE. Selenium toxicity in animals with emphasis on man/ J Am Coll Toxicol. - 1986. - 5:45-70. Halliwell B Gutteridge J.M.C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy // Lancet. — 1984. — P.1396-98. 7. Кузьмич Р.Г., Бобрик Д.И., Саватеев А.В. Перекисное окисление липидов и система антиоксидантной защиты организмов животных//Мн., 2004. –75с. 8. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. – Справочник / И.П. Кондрахин [и др.]: под ред. И.П. Кондрахина. – М.: Колос, 2004. – 520с. 9. Методы первичной токсикологической оценки химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии/А.Э. Высоцкий, Д.А. Гирис, М.П. Кучинский, А.А. Богуш, А.Ю. Феногенов// Экология и мир животных: международный научно-практический журнал. – Минск, 2007. – №2 – С.19-27 10. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии/А.Э. Высоцкий, М.П. Кучинский, Б.Я. Бирман [и др.]/ Утверждены начальником главного управления ветеринарии с Государственной ветеринарной и Государственной продовольственной инспекциями Минсельхозпрода Республики Беларусь А.И. Конон. – Минск, 2007. – 156с. 11. Хабриева, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриевой.-изд. 2-е доп. и перераб.- М.: «Медицина», 2005.- 832с.