

DOI 10.52368/2078-0109-2022-58-3-4-9

УДК 619:616.36:636.1

РАЗРАБОТКА И БИО-ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТНОГО ПРЕПАРАТА «СИЛИМАРИН nSePs»

**Авдеенко В.С. ORCID ID 0000-0001-6154-275X, Козлов С.В. ORCID ID 0000-0003-2164-8140,
Даниловская В.К. ORCID ID 0000-0002-5657-616X, Староверов С.А. ORCID ID 0000-0002-4752-9855,
Строгов В.В. ORCID ID 0000-0002-8504-3688**

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
г. Саратов, Российская Федерация

*Внутрижелудочное введение препарата мышам и крысам в максимально возможной дозе не приводит к нарушениям физиологических функций и гибели животных, а также не оказывает отрицательного влияния на гематологические показатели. Препарат по степени воздействия на организм согласно ГОСТ 12.1.007 относится к 4 классу опасности – веществам малоопасным. При исследовании влияния препарата на основные показатели метаболизма в хроническом эксперименте отличий между опытной и контрольной группами не выявлено. Показатели, характеризующие состояние центральной нервной системы и работоспособности животных опытной группы, достоверно не отличаются от показателей, выявленных у контрольной группы животных. **Ключевые слова:** мыши, крысы, хронический эксперимент, хроническая токсичность, состояние нервной системы.*

DEVELOPMENT AND BIO-PHARMACO-TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE ANTIOXIDANT PREPARATION "SILYMARIN nSePs"

Avdeenko V.S., Danilovskaya V.K., Kozlov S.V., Staroverov S.A., Strogov V.V.

Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov,
Saratov, Russian Federation

*Intragastric administration of the drug to mice and rats at the maximum possible dose does not lead to disturbances in physiological functions and death in animals, it does not adversely affect hematological parameters as well. By the exposure extent, according to the State standard 12.1.007, the drug belongs to the 4th hazard class – low-hazard substances. When studying the effect of the drug on the main metabolic indicators in a chronic experiment, no differences were found between the experimental and control groups. The indicators characterizing the state of the central nervous system and performance ability of the animals in the experimental group do not significantly differ from those found in the control group of animals. **Keywords:** mice, rats, chronic experiment, chronic toxicity, nervous system condition.*

Введение. В настоящее время исследовательскими группами уделяется большое внимание синтезу и изучению свойств различных наноматериалов, в частности – наночастиц [1]. Наиболее предпочтительными в качестве наноносителей, на наш взгляд, являются коллоидные частицы селена [5]. В отношении коллоидного раствора селена в современной литературе встречаются только единичные публикации, которые в основном рассматривают эту структуру как биоактивную добавку [3, 7]. Многочисленные эксперименты [2, 4] показали, что силимарин обладает свойством ускорения процесса пролиферации, биосинтеза белка и ДНК, повышения активности лактатдегидрогеназы. Интоксикация клеток почек *in vitro* парацетамолом, цисплатином, винкристином снималась введением силимарина [6]. Из выше сказанного следует, что разработка методов синтеза препаратов на основе коллоидных частиц селена, силимарина на мецеллярной матрице является весьма перспективным.

Цель: разработка новой лекарственной формы нетоксичного и эффективного средства внутриклеточной доставки гидрофобного лекарственного средства на основе наночастиц селена и изучение био-фармако-токсикологических свойств.

Материалы и методы исследований. Для конструирования стабильных образцов препаратов использовали коммерческий силимарин («TEVA Czech Industries s.r.o.», Чехия). Препарат «Силимарин nSePs» содержит в качестве активнoдействующих веществ силимарин (концентрация 5,76 мг/мл) и наночастицы селена (0,24 мг/мл) на мецеллярной площадке. Диаметр (d) синтезированных наночастиц измеряли с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) и методом динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе Zetasizer Nano-ZS («Malvern», Великобритания).

Для анализа концентрации силимарина в полученном препарате был проведен хроматографический анализ полученных прототипов на жидкостном хроматографе «Стайер», с использованием

спектрофотометрического детектора А288, для разделения использовали колонку OnixMonolithic С 18. Были применены следующие условия: длина волны – 288 нм; скорость потока – 0,9 см/мин; объем пробы – 20 мкл; температура проведения анализа - 30°C - 35°C. В качестве элюента применяли ацетонитрил «Для жидкостной хроматографии» и (1% раствор уксусной кислоты в соотношении 7:3 по объему).

В эксперименты были включены: крысы беспородные. Пол: самцы и самки. Возраст: 2-3 месяца. Масса: 200-230 г. Мыши белые линии BALB/С. Линия: Balb/c. Пол: самцы. Возраст: 2-2,5 месяца. Масса: 18-20 г. Цыплята бройлеры РОСС 308 (n=36), возраст: 10 суток, масса – 110 – 140 г. Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Каждое животное имело отчетливо детектируемую метку. Перед опытом у животных отбирали корм и воду. Через два часа животных взвешивали и распределяли по группам. Гематологические исследования проводили на анализаторе MicroCC-20Vet, HTI(США). Биохимические исследования проводили на анализаторе «StatFax 3300», с помощью стандартных наборов реагентов ЗАО «Диакон ДС». Для проверки правильности и точности определения биохимических показателей в сыворотке крови животных использовали контрольную сыворотку для биохимических исследований по ТУ 9398-022-09807247-2009, ООО «HOSPITEX DIAGNOSTICS». Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартным процедурам, с помощью приложения Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp. USA) и пакета статистического анализа данных StatPlus 2009 professional 5.8.4 for Windows (StatSoft Inc., USA) с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Значения LD₅₀ и других параметров острого токсического действия определяли пробит-анализом (D.J. Finney, 1971); для статистического сравнения полученных значений LD₅₀ использовали тест линейности, тест параллелизма и тест равенства дисперсий (D.J. Finney, 1982)

Результаты исследований. Для анализа концентрации силимарина в полученных препаратах был проведен хроматографический анализ, данные рисунка 1, 2.

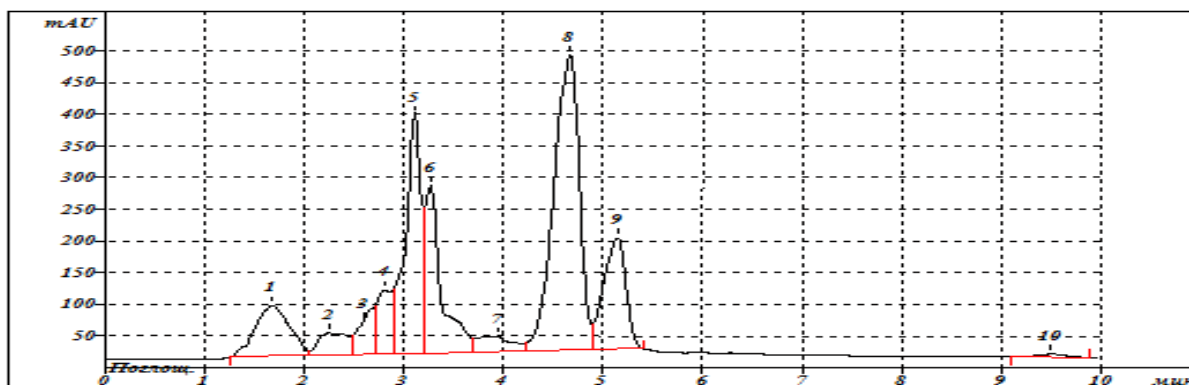


Рисунок 1 - Хроматограмма стандартного образца силимарина с концентрацией 1,5 мг/мл

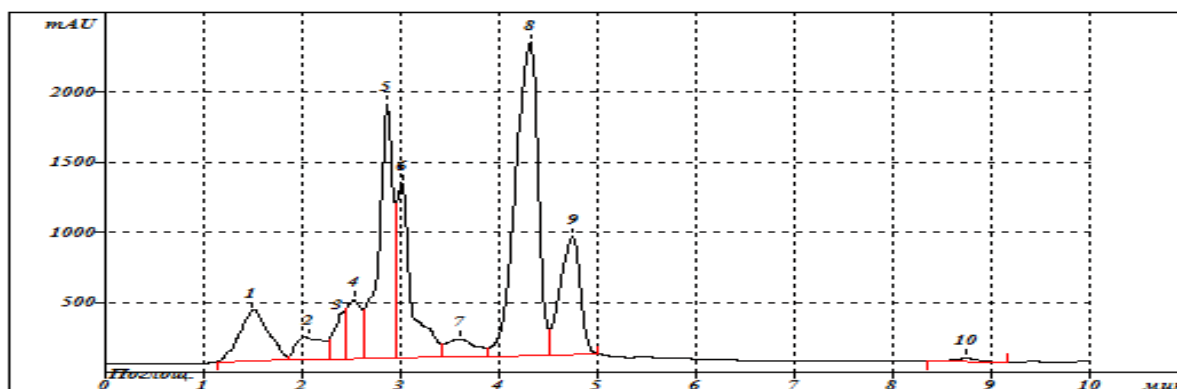


Рисунок 2 - Хроматограмма стандартного образца силимарина с концентрацией 6 мг/мл

Таким образом, в результате проведенного анализа установлено, что в препарате «Силимарин nSePs» (Силимарин КС) - 5,76 мг/мл, что соответствует количеству вносимой в препарат субстанции. Согласно данным, полученным методом ДРС, размер частиц в препарате силимарина, конъюгированного с наночастицами селена, составил 43 -110 нм (рисунок 3) .

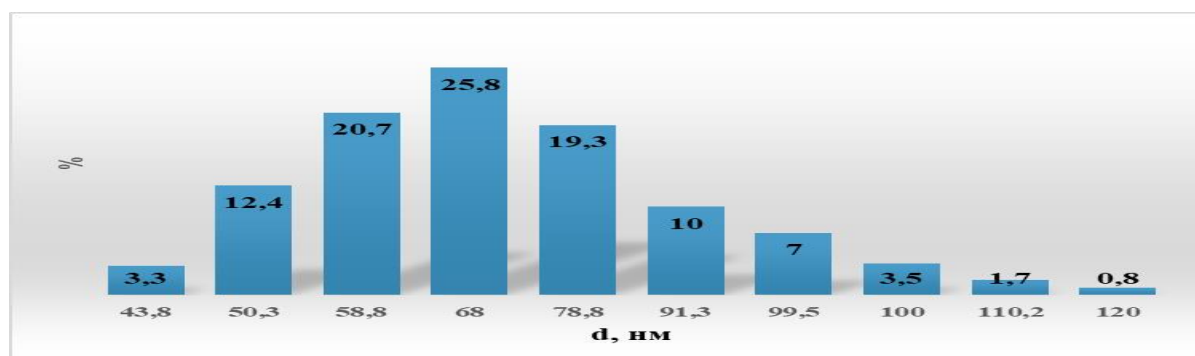


Рисунок 3 - Распределение наночастиц по размерам в препарате «Силимарин nSePs»

Таким образом, достигнутая стабилизация коллоидных систем селена с силимарином сопровождается высокой дисперсностью (уменьшением значений d), характерным для коллоидных систем подобного типа. Наряду с этим, анализ преципитата на ZetasizerNanoZS показал, что дзета-потенциал системы силимарина с селеном составил 31,4 мВ, что свидетельствует о достаточно высокой стабильности образца.

Препарат «Силимарин nSePs» вводили дробно с интервалом 4 часа внутривентриально мышам в дозах 10000, 20000, 30000 и 40000 мг/кг по лекарственной форме. Контрольным мышам вводили однократно внутривентриально воду для инъекций в максимально допустимом объеме 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней, в течение первых суток животные находились под непрерывным наблюдением. В результате введения испытуемого препарата «Силимарин nSePs» мышам, как самцам, так и самкам в дозах 10000, 20000, 30000 и 40000 мг/кг по лекарственной форме не привело к гибели животных и симптомов интоксикации не наблюдалось.

Для препарата «Силимарин nSePs» среднюю смертельную дозу установить не удалось, так как максимально возможные дозы для внутривентриального введения не привели к гибели ни одного животного. Согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, препарат «Силимарин», конъюгированный с наночастицами селена, относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные). При оценке острой токсичности препарата «Силимарин nSePs» на цыплятах бройлерах РОСС 308 установлено, что после введения препарата у цыплят отмечалось угнетенное состояние, отказ от корма и питья. В течение 1 часа состояние стабилизировалось. Во всех группах координация движений цыплят не изменялась, при этом ответные реакции на раздражители сохранялись. В течение всего периода наблюдения (14 суток) кожные покровы цыплят были в норме, слизистые не изменили свою окраску. Гибель цыплят, как в опытных, так и в контрольной группах отсутствовала.

Оценку субхронической токсичности препарата «Силимарин nSePs» при их внутривентриальном введении провели на самцах крыс в течение 14 дней при последующей 30-дневной отмене введения. На протяжении всего эксперимента животные всех групп были активны, хорошо принимали корм, равномерно увеличивали массу тела. Клинический анализ крови показал, что введение препарата «Силимарин nSePs» в 5-кратных терапевтических дозах, не приводит к достоверному изменению гематологических показателей (таблица 1).

Таблица 1 - Биохимические показатели крови крыс после применения препарата в субхроническом эксперименте

Показатели	1-я группа	2-я группа	Контрольная
Через 14 суток после начала эксперимента			
АЛ, Е/л	70,93±8,86	59,39±1,84	58,01±2,92
АСТ, Е/л	53,34±4,92	41,97±1,94	50,65±2,57
Щелочная фосфатаза, Е/л	259,45±17,31	297,96±14,83	262,98±19,16
Мочевина, ммоль/л	6,91±0,48	8,23±0,62	6,48±0,38
Креатинин, ммоль/л	42,09±4,1	41,53±2,42	40,85±2,99
Билирубин, мкмоль/л	0,23±0,02	0,31±0,02	0,2±0,02
Белок общий, г/л	61,21±3,86	73,51±7,61	58,51±3,03
Альбумин, г/л	28,05±1,13	34,62±2,03	26,84±2,09
Глобулин, г/л	33,16±3,36	38,89±4,96	31,68±4,01
Глюкоза, ммоль/л	4,39±0,16	5,06±0,14	4,37±0,42

Продолжение таблицы 1

Показатели	1-я группа	2-я группа	Контрольная
Через 44 дня после начала эксперимента			
АЛТ, Е/л	67,04 ± 2,81	67,08 ± 2,99	67,36 ± 2,99
АСТ, Е/л	57,88 ± 1,71	56,16 ± 2,66	55,78 ± 1,77
Щелочная фосфатаза, Е/л	276,45 ± 2,59	286,63 ± 5,45	284,17 ± 9,19
Мочевина, ммоль/л	7,03 ± 0,55	7,09 ± 1,00	6,99 ± 0,67
Креатинин, ммоль/л	47,43 ± 6,98	48,88 ± 2,91	47,89 ± 4,36
Билирубин, мкмоль/л	0,21±0,02	0,24±0,03	0,21±0,02
Белок общий, г/л	67,88±5,75	64,55±6,2	65,23±4,09
Альбумин, г/л	29,69±2,65	25,08±1,62	27,77±0,85
Глобулин, г/л	38,19±3,26	39,47±3,28	37,29±3,18
Глюкоза, ммоль/л	4,61±0,17	4,16±0,37	4,49±0,22

Примечание. * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10).

Таблица 2 - Показатели функционального состояния почек у кроликов под действием препарата «Силимарин nSePs»

Показатели	1-я группа	2-я группа	3-я группа (контрольная)
Через 14 суток после начала эксперимента			
Белок, г/л	0,47±0,12	0,49±0,09	0,44±0,10
Мочевина, ммоль/л	393±20	397±30	397±21
Глюкоза, ммоль/л	5,37±0,23	5,37±0,25	5,31±0,28
Калий, ммоль/л	1,75±0,13	1,70±0,12	1,74±0,08
Натрий, ммоль/л	0,69±0,06	0,65±0,05	0,65±0,05
Уробилиноген, мкмоль/л	12,64±0,81	12,10±1,30	13,04±1,04
Билирубин, мкмоль/л	3,59±0,27	3,80±0,23	3,64±0,17
Кетоновые тела, ммоль/л	0,67±0,30	0,77±0,11	0,88±0,25
Через 44 дня после начала эксперимента			
Белок, г/л	0,6±0,04	0,54±0,04	0,55±0,03
Мочевина, ммоль/л	435,7±18,2	469,53±61,61	431,94±54,53
Глюкоза, ммоль/л	5,3±0,38	5,01±0,36	5,47±0,24
Калий, ммоль/л	2,2±0,1	2,27±0,15	2,07±0,18
Натрий, ммоль/л	2,4±0,11	2,88±0,15	2,76±0,22
Уробилиноген, мкмоль/л	12,1±0,46	10,06±0,53	10,18±0,85
Билирубин, мкмоль/л	3,4±0,16	3,51±0,33	2,17±0,11
Кетоновые тела, ммоль/л	0,7±0,09	0,64±0,06	0,65±0,05

Примечание. * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10).

При исследовании функциональной активности центральной нервной системы проводили оценку работоспособности животных с помощью метода двигательной активности. Данные представлены в данных таблицы 3.

Таблица 3 - Некоторые показатели состояния центральной нервной системы животных, в субхроническом эксперименте

День (от начала эксперимента)	Группа	ВДА (число вертикальных стоек в 3 мин)	ГДА, с.	Время удержания на стержне, с
14	1	6,7±0,45	39±1,2	73±1,7
	2	6,8±0,42	42±1	67±1,8
	3 (Контроль)	5,9±0,15	38,5±1,36	69,2±2,1
35	1	6,7±1,11	44±3,67	77±1,76
	2	6,7±1,62	43±3,05	76±8,09
	3 (Контроль)	6,3±0,24	44,3±1,74	76,5±3,31
44	1	6,3±0,3	44,2±1,5	80,2±3,45
	2	6±0,23	39,9±1,51	71,9±2,65
	3 (Контроль)	6,1±0,26	38,5±2,1	67,4±3,1

Примечание. * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10).

Как следует из таблицы, показатели, характеризующие состояние ЦНС и работоспособности животных опытных групп, достоверно не отличаются от контрольных животных. По результатам исследования на мышах, крысах и цыплятах-бройлерах можно заключить, что согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, препарат «Силимарин nSePs» относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

Заключение. Сконструированный препарат «Силимарин nSePs» имеет наночастицы селена размером 60-100 нм. Концентрация действующих веществ в препарате «Силимарин nSePs» составляет: коллоидный селен – 0,24 мг/мл, силимарин – 5,76 мг/мл. В результате проведенных исследований было установлено, что внутрижелудочное введение препарата «Силимарин nSePs» мышам и крысам в максимально возможной дозе не приводит к нарушениям физиологических функций и гибели животных, а также не оказывает отрицательного влияния на гематологические показатели крови. Препарат «Силимарин nSePs» по степени воздействия на организм согласно ГОСТ 12.1.007 относится к 4 классу опасности – веществам малоопасным. При исследовании влияния препарата «Силимарин nSePs» на основные показатели метаболизма в хроническом эксперименте отличий между опытной и контрольной группами не выявлено. Показатели, характеризующие состояние центральной нервной системы и работоспособности животных опытной группы, достоверно не отличаются от показателей, выявленных у контрольной группы животных.

Conclusion. The constructed veterinary drug "Silymarin nSEPs" contains selenium nanoparticles sized 60-100 nm. The concentration of active substances in the preparation "Silymarin nSEPs" is: colloidal selenium – 0.24 mg / ml, silymarin – 5.76 mg / ml. As a result of the conducted studies, it was found that intragastric administration of the drug "Silymarin nSEPs" to mice and rats in the maximum possible dose does not lead to disturbances of physiological functions and death in animals, and it does not possess a negative effect on hematological blood parameters as well. The drug "Silymarin nSEPs" by its exposure extent, according to the State standard 12.1.007, belongs to the 4th hazard class – low-risk substances. When studying the effect of the drug "Silymarin nSEPs" on the main metabolic parameters in a chronic experiment, there were no differences found between the experimental and control groups. The indicators characterizing the state of the central nervous system and the performance of the animals in the experimental group do not significantly differ from the indicators identified in the control group of animals.

Список литературы. 1. Изучение биологических свойств наноразмерной структуры на основе коллоидного селена *in vitro* / А. Ю Исаева [и др.] // *Ветеринарная патология*. – 2012. – Вып.3. – С.111 – 114. 2. Конструирование коллоидного комплекса селена с лактоферрином и изучение его биодинамических свойств / С. В Козлов [и др.] // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. – 2012. – Вып.1. – С. 27-32. 3. *Stimulatory effects of silibinin and silichristin from the milk thistle Silybum marianum on kidney cells* / J. Sonnenbichler [et al.] // *J. Pharm. Exp. Ther.* – 1999. – Vol. 290. – P. 1375-1383. 4. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А. Н Миронова*. - М.: ГрифиК, 2012. – 944 с. 5. *The role of plasma membrane in bio-reduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas [et al.]* // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2000. - V. 380. 6. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриев* – Изд. 2 –е, доп. - М.: Медицина, 2005. - 832 с. 7. *Advanced techniques in biological electron microscopy III / ed. By J.K Koehler[et.al.]*. – Berlin, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1973. – 305 p.

References. 1. *Izuchenie biologicheskikh svoystv nanorazmernoj struktury na osnove kolloidnogo selena in vitro / A. Ju Isaeva [i dr.]* // *Veterinarnaja patologija*. – 2012. – Vyp.3. – S.111 – 114. 2. *Konstruirovaniye kolloidnogo kompleksa selena s laktoferrinom i izuchenie ego biodinamicheskikh svoystv / S. V Kozlov [i dr.]* // *Aktual'nye voprosy veterinarnoj biologii*. – 2012 – Vyp.1. – S.27-32. 3. *Stimulatory effects of silibinin and silichristin from the milk thistle Silybum marianum on kidney cells / J. Sonnenbichler [et al.]* // *J. Pharm. Exp. Ther.* – 1999. – Vol. 290. – P. 1375-1383. 4. *Rukovod-*

stvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaja./ pod red. A. N Mironova. - M.: Grif-iK, 2012. – 944 с. 5. The role of plasma membrane in bio-reduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. - 2000. - V. 380. 6. Rukovodstvo po `eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novykh farmakologicheskikh veschestv/ pod red. R. U. Habriev - Izd. 2 –e, dop. - M.: Meditsina, 2005. - 832 s. 7. Advanced techniques in biological electron microscopy III / ed. By J.K Koehler[et.al.]. – Berlin, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1973. – 305 p.

Поступила в редакцию 27.04.2022.

DOI 10.52368/2078-0109-2022-58-3-9-13

УДК 619:618.14-002:636.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПРЕПАРАТА АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА У КОРОВ

Болотова В.С. ORCID ID 0000-0002-6967-7162, Михалёв В.И. ORCID ID 0000-0001-9684-4045

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

*В статье представлены материалы изучения эффективности применения нового комплексного антимикробного препарата для лечения коров с хроническим эндометритом, содержащего в своем составе антибиотики из группы пенициллинов и аминогликозидов. Клинические исследования проведены по определению оптимальной дозы, интервала введения антимикробного препарата в составе комплексного лечения хронического эндометрита. Лечение коров, больных хроническим эндометритом, было комплексным, предусматривающим применение общестимулирующих (плацента денатурированная эмульгированная подкожно в 1, 5 и 9 дни лечения в дозе 25,0 мл/животное) и симптоматических средств (магэстрофан – в первый день лечения внутримышечно в дозе 2 мл/животное и утеротон – четырехкратно в дозе 10,0 мл/животное, начиная со второго дня терапии). Установлено, что оптимальной схемой применения антимикробного препарата при лечении хронического эндометрита является внутриматочное введение в дозе 20,0 мл/корову с 24-часовым интервалом, что способствует сокращению числа внутриматочных введений. При таком режиме использования антимикробного препарата в сочетании с общестимулирующими и симптоматическими средствами клиническое выздоровление 82,3%, что на 9,0% выше в сравнении с метрикуром. После клинического выздоровления животных, которым внутриматочно вводили новый антимикробный препарат, оплодотворилось 85,7%, период от начала лечения до оплодотворения составил 50,6±3,4 дней, а коэффициент оплодотворения – 2,12. **Ключевые слова:** коровы, хронический эндометрит, антимикробный препарат, терапия.*

EFFICACY OF A NEW ANTIMICROBIAL DRUG IN THE THERAPY OF CHRONIC ENDOMETRITIS IN COWS

Bolotova V.S., Mikhalev V.I.

FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy",
Voronezh, Russian Federation

*The article presents the material on studying the efficacy of the use of a new complex antimicrobial drug for the treatment of cows with chronic endometritis, which contains antibiotics from the group of penicillins and aminoglycosides. Clinical studies were conducted to determine the optimal dose, interval of administration of an antimicrobial drug as part of the complex treatment of chronic endometritis. Treatment of cows with chronic endometritis was complex, involving the use of general stimulants (placenta denatured emulsified subcutaneously at a dose of 25.0 ml/animal on days 1, 5 and 9 of treatment) and symptomatic agents (magestrofan intramuscularly at a dose of 2 ml/animal on the first day of treatment and uteroton four times at a dose of 10.0 ml/animal, starting from the second day of therapy). It has been established that the optimal scheme for the use of an antimicrobial drug in the treatment of chronic endometritis is intrauterine administration at a dose of 20.0 ml/cow with a 24-hour interval that helps to reduce the number of intrauterine injections. This dose schedule for an antimicrobial drug in combination with general stimulants and symptomatic agents promotes the clinical recovery of 82.3%, which is by 9.0% higher, compared to metricure. After a clinical recovery of the animals that were intrauterinely injected with a new antimicrobial drug, 85.7% were fertilized, the period from the treatment onset to fertilization was 50.6±3.4 days, and the fertilization rate was 2.12. **Keywords:** cows, chronic endometritis, antimicrobial agent, therapy.*

Введение. В настоящее время темпы роста молочного животноводства определяются уровнем его рентабельности, в большинстве случаев зависящей от молочной продуктивности животных, определяемой генетическим потенциалом, уровнем кормления, состоянием продуктивного и репродуктивного здоровья. На состояние репродуктивного здоровья оказывают влияние многочисленные факторы, в том числе гинекологические заболевания, такие как хронический эндометрит, степень распространения которого может достигать 45,1-50,9% [1, 2, 3]. С повышением молочной продуктивности, являющейся неотъемлемой частью рентабельного ведения животноводства, констатируется рост заболеваемости коров хроническим эндометритом [4, 5].