

Определение экспериментальных доклинических токсико-фармакологических параметров препарата на основе флорфеникола

А.В. Хмыров¹, кандидат биологических наук, **Г.В. Сноз**², доктор ветеринарных наук, **Г.И. Горшков**¹, доктор биологических наук (info@bsaa.edu.ru)

¹ Белгородская государственная сельскохозяйственная академия им. В.Я. Горина» (Белгород).

² ФГБОУ ВПО МГАВМиБ (Москва).

Препарат на основе флорфеникола является малотоксичным. Дозы препарата 2,5...5 г/кг МТ, введенные per os однократно, а также 1/10 от исследованной максимальной, вводимой 28 дней подряд, не вызывали клинических признаков отравления. Препарат в испытанных дозах не оказывал местнораздражающего, алергизирующего, эмбриотоксического, кумулятивного и тератогенного действия.

Ключевые слова: белые крысы, кальций, кровь, трансминазы, морские свинки, мочевины, обций белок, сыворотка, токсичность, цыплята-бройлеры, фосфор, флорфеникол
Сокращения: АЛАТ — аланинаминотрансфераза, АсАТ — аспаратаминотрансфераза, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, МТ — масса тела, СОЭ — скорость оседания эритроцитов, ХТС — химиотерапевтические средства

Введение

Из огромного перечня фармакологических средств, имеющих ветеринарное значение, трудно выделить какую-либо группу препаратов, которая конкурировала бы по своей ценности, объемам производства и масштабам применения с антибиотиками и противомикробными веществами синтетического происхождения (сульфаниламидами, нитрофуранами, фторхинолонами и др.), составляющими основу фармакотерапии. Их число в клиническом и корригирующем рост и продуктивность животных «обороте» измеряется сотнями и даже тысячами препаратов и кормовых добавок. Однако из-за повсеместного увлечения ими, применения без этиологических обоснований, несоблюдения доз и интервалов введения в организм их эффективность из года в год снижается. Причем скорость снижения прямо пропорциональна врачебной популярности. А главная причина — адаптация к ним патогенной, условно-патогенной, сапрофитной или симбионтной микрофлоры, способной передавать вновь приобретенные свойства резистентности своему потомству или друг другу при обмене ДНК. Формируются расы (штаммы) микроорганизмов, устойчивые к применяемому средству. Эти расы заселяют организм животных, вытесняя из нормоценозов полезные виды, загрязняют окружающую среду (почву, атмосферу, водоемы), инфицируют дикую фауну, контаминируют помещения, в которых содержатся животные. Вызванные ими болезни не поддаются лечению теми средствами, к которым у возбудителей сформирована резистентность (прямая устойчивость) или имеющим химическое родство с уже адаптированными видами и сходный тип метаболизма (перекрестная устойчивость).

Резистентные штаммы появляются к любым ХТС, которые назначают животным с целью лечения или профилактики болезней. И чем дольше применяют ХТС, тем шире масштабы распространения этих штаммов. Их носителями могут быть как больные и переболевшие, так и совершенно здоровые животные и человек. Они передаются контактным путем и через контаминированные объекты внешней среды и предметы ухода за животными.

Стремительное распространение патогенных микроорганизмов, приобретших устойчивость к ХТС, увеличение случаев осложнений при лечении болезней некоторые исследователи расценивают как «апокалипсис в фармакотерапии» [4], крах радужных надежд, рожденных в «эру антибиотиков» середины XX столетия [5]. Появились высказывания об отказе от антибиотиков и замене их пробиотиками, иммуностимуляторами, адаптогенами, бионормализаторами и другими средствами. Однако какие бы ни были результаты альтернативного обоснования этих средств, они могут заменить лишь часть показаний к применению антибиотиков как стимуляторов роста и продуктивности животных и средств профилактики болезней [1]. Преодолевать или предупреждать снижение эффективности ХТС при лечении болезней животных в стратегическом плане можно созданием комбинаций ХТС между собою и с веществами, подавляющими адаптогенные процессы в микробной клетке, синтезом принципиально новых препаратов с использованием нанотехнологий; модификацией структуры известных средств без изменения в их молекуле функциональных групп, обеспечивающих противомикробные свойства, и другими путями.

В настоящем исследовании приведены результаты экспериментального определения токсико-фармакологических параметров нового ХТС (далее **Препарат**), относящегося к группе хинолонов.

Препарат является одной из лекарственных форм флорфеникола, который по своей структуре сходен с хлорамфениколом, издавна применяющимся в ветеринарной медицине, но уже теряющим свои химиотерапевтические свойства. Ценность флорфеникола состоит в том, что в его молекуле вместо гидроксила, как у хлорамфеникола, содержится атом фтора, а вместо нитрогруппы —

сульфонильный радикал. Он подавляет возбудителей болезни, устойчивых к хлорамфениколу, менее токсичен в отношении органов кроветворения, не вызывает апластическую анемию. Блокирует пептидилтрансферазу бактерий, что влечет за собой остановку синтеза белка на рибосомах и гибель микробной клетки [2, 7]. Губителен для пастерелл, актинобацилл, бордетелл, сальмонелл, эшерихий, протей, стафило- и стрептококков, клебсиелл, фузобактерий, шигелл, гемофильных палочек, энтеробактерий, возбудителя орнитоза, псевдотуберкулеза, некоторых микоплазм. При пероральном применении быстро всасывается в кровь и через 1 ч достигает максимальной концентрации. Имеет высокую биодоступность: у свиней — 88 %, у птиц — 55 %.

Поскольку флорфеникол еще не получил широкого распространения в фармакотерапии и профилактике болезней птиц и имеет структурные отличия от известного хлорамфеникола, можно предполагать, что к нему еще не выработались резистентные штаммы возбудителей инфекционных заболеваний, и его можно использовать для защиты цыплят в первые сутки выращивания.

Цель исследования

Изучить токсичность **Препарата** и определить возможность его использования как фармакотерапевтического и профилактического средства в ранний период выращивания цыплят-бройлеров.

Материалы и методы

Препарат представляет собой 2%-й бесцветный, прозрачный раствор флорфеникола для перорального применения, расфасованный в полимерные флаконы по 1 л со сроком годности 2 года.

Опыты проведены на цыплятах, морских свинках и белых крысах в условиях физиологического комплекса ФГБОУ ВПО «Белгородская государственная сельскохозяйственная академия им. В.Я. Горина». Были использованы общепринятые методы исследования согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [8], а также описанию В.В. Меньшикова с соавт. [7], И.П. Кондрахина с соавт. [3] и других авторов (изучены острая и субхроническая токсичность, кумулятивные свойства, местно-раздражающие, алергизирующие, эмбриотоксические, тератогенные и мутагенные свойства препарата).

Всех животных опытных и контрольных групп содержали в клетках в одном и том же помещении, при одинаковых условиях кормления, микроклимата и ухода. Препарат вводили с помощью зонда в зоб (птице), через иглу шприца с оливкой на конце — в желудок (крысы) или наносили на кожу (морские свинки).

Результаты и обсуждение

Острая токсичность. В эксперимент включили 60 белых крыс со средней МТ 250...260 г и 40 цыплят бройлеров с МТ 390...395 г. До введения препарата животных выдерживали на голодной диете при свободном доступе к поилкам.

После однократного введения **Препарата** внутрижелудочно в дозах 1000; 10000; 15000; 20000 и 25000 мг/кг МТ и последующем наблюдении за крысами в течение 14 сут каких-либо внешне выраженных изменений не отмечали. МТ к концу наблюдения не только не снижалась,

но была несколько выше в опытных группах — на 2; 4; 4,3 и 6 г, соответственно. У крыс, которым вводили **Препарат** в зоб в дозе 25000 мг/кг МТ, первые 3 ч наблюдали угнетение условных рефлексов и двигательной активности, разжижение фекалий.

В опытах на цыплятах-бройлерах испытанные три дозы **Препарата** (1000; 10000 и 50000 мг/кг МТ), вводимые в зоб, также не вызвали каких-либо клинических изменений. Коэффициенты массы внутренних органов цыплят опытных групп и гистоструктура их тканей не имели различий с аналогичными показателями группы контроля.

Субхроническая токсичность. Ее определяли на белых крысах (n=30), которым вводили ежедневно перорально в течение 28 сут **Препарат** в дозах 2500 и 1250 мг/кг МТ. Каких-либо различий в физиологическом состоянии крыс опытных и контрольной групп не было выявлено. За время опыта отмечено увеличение средней МТ: опытных крыс от доз 2500 мг/кг МТ — на 35,6 г; от 1250 мг/кг МТ — на 47,5; в контроле — на 43,3 г (p>0,05).

Абсолютный и относительный приросты массы сердца, печени, селезенки, почек также не имели различий по группам. То же относится и к поведению крыс в «открытом поле», числу форменных элементов крови, лейкограмме, СОЭ, показателю гематокрита. Тогда как средняя концентрация гемоглобина в эритроците была выше, чем в контроле: у крыс, получавших меньшую (1250 мг/кг) дозу **Препарата**, на 3,22 % (p<0,01), большую — на 5,5 % (p<0,001).

Субхроническую токсичность изучали также на 13-суточных цыплятах (n=10 гол в группе), получавших **Препарат** ежедневно в течение 28 сут в дозах 2500, 5000 и 10000 мг/кг МТ. В процессе наблюдения не отмечены изменения в поведении и сохранности цыплят, потреблении ими корма и воды, приросте МТ, топографии и макроструктуре внутренних органов. Результаты гематологических исследований приведены в табл. 1.

1. Биохимические показатели крови цыплят, получавших Препарат в различных дозах							
Группы	Общий белок, г/л	Мочевина, моль/л	Креатинин, мкмоль/л	АсАТ, мкмоль/л	АлАТ, мкмоль/л	Фосфор, моль/л	Кальций, моль/л
До применения Препарата							
Контрольная	34,4±1,20	1,23±0,15	35,2±1,60	151,42±1,1	28,73±1,21	2,44±0,31	5,57±0,22
Опытные (доза мг/кг МТ):							
1-я (2500)	34,7±1,42	1,22±0,11	33,50±1,55	150,25±1,07	29,36±1,15	2,42±0,33	5,58±0,19
2-я (5000)	34,5±1,57	1,25±0,15	36,4±1,25	152,44±1,17	30,55±1,18	2,43±0,32	5,53±0,20
3-я (10000)	34,2±1,63	1,22±0,11	34,55±1,28	150,88±1,22	29,0±1,12	2,41±0,30	5,59±0,21
После применения Препарата							
Контрольная	36,5±0,74	1,23±0,15	35,2±1,60	151,42±1,1	28,73±1,21	2,50±0,38	4,20±0,41*
Опытные (доза мг/кг МТ):							
1-я (2500)	37,4±0,90	1,22±0,11	33,50±1,55	150,25±1,07	30,63±1,15	2,49±0,23	4,15±0,45*
2-я (5000)	36,8±0,56	1,28±0,15	37,4±1,25	152,44±1,17	31,36±1,18	2,48±0,21	4,32±0,39*
3-я (10000)	36,6±0,60	1,48±0,11	40,55±1,28*	165,88±1,22*	34,0±1,12*	2,49±0,54	4,22±0,36*

Примечание. * p<0,05

Из данных таблицы видно, что в сыворотке крови всех подопытных цыплят к концу эксперимента наблюдали стабильное, статистически подтвержденное уменьшение содержания кальция. При дозе 2500 мг/кг МТ снижение составило 25,6 %, при 5000 мг/кг МТ — 21,9 %, при 10000 мг/кг МТ — 24,5 %. Во всех случаях p<0,05. Это снижение объяснимо возрастной динамикой и, возможно, алиментарной недостаточностью кальция, поскольку оно было практически одинаковым в трех опытных группах и в контроле (24,6 % при p<0,05).

Обращает также на себя внимание повышение активности ферментов переаминирования, статистически значимое только в 3-й опытной группе, цыплята которой получали повышенную дозу **Препарата**. Активность АсАТ по отношению к исходному состоянию повышалась на 9,9 % (p<0,01), АлАТ — на 17,2 % (p<0,05). Коэффици-

циент де Ритгиса до применения **Препарата** составил 5,20; после применения — 4,88. Можно полагать, что снижение коэффициента де Ритгиса произошло за счет преимущественно большей внеклеточной утечки АлАТ по сравнению с АсАТ и связано с нарушением целостности мембран гепатоцитов. Подтверждением этого служит также повышение содержания креатинина в сыворотке крови.

Что касается других исследованных показателей (общего белка, мочевины и фосфора), то их изменения были незначительными и указывали на неглубокую обратимую гепатопатию. При повторном исследовании через 14 сут после окончания опыта трансаминазная активность сыворотки крови снизилась и находилась в пределах физиологической нормы.

Аллергизирующие свойства. Эти свойства **Препарата** были изучены на 12 клинически здоровых морских свинках (МТ 270...320 г) по методу гистаминного шока. После перорального введения **Препарата** в дозе 3,0 мл/кг МТ трое суток подряд и последующей подкожной инъекции гистамина через 6 ч (3 свинки) и 12 ч (3 свинки) время наступления гистаминного шока составило у подопытных свинок 19,1...19,7 мин, у контрольных — 19,2...19,3. Время гибели свинок от гистамина не имело различий между группами. Следовательно, **Препарат** не обладает ни антигистаминной, ни аллергизирующей активностью.

Местнораздражающее действие. Испытание проведено на 3-х группах крыс (n=10 в группе). Через 6 ч после введения белым крысам **Препарата** в однократной (1 мл/гол) и пятикратной (5 мл/гол) терапевтической дозе проводили эвтаназию, вскрывали брюшную полость и осматривали слизистую оболочку желудка и кишечника. Каких-либо изменений ее цвета или целостности, а также отечности, кровоизлияний не обнаруживали.

Не было признаков раздражения конъюнктивы (покраснения, слезотечения, отечности век и пр.) при периодическом осмотре глаз через 15 мин, 1 ч, 6 и 24 ч после инстилляции в глаз кроликам 0,2 мл (200 мг) неразведенного **Препарата**.

Эмбриотоксичность и тератогенные свойства. Их изучали на 36 беременных белых крысах, разделенных на 3 равные по численности группы (контрольную и две опытных). **Препарат** вводили 1 раз в день в дозе 2,0 мл/кг МТ: 1-й опытной группе — с 1-х по 13-е сут беременности, 2-й — с 14-х по 20-е сут. Результаты исследования отражены в табл. 2.

Показатели	Контрольная группа	Опытные группы, получавшие Препарат	
		с 1 по 13 сутки беременности	с 14 по 20 сутки беременности
Число самок	12	12	12
В среднем на 1 самку: желток тел	11,25±1,38	10,81±1,62	11,47±1,34
мест имплантации	8,31±1,47	10,28±1,48	9,66±1,75
мест резорбции	0,61±0,06	0,34±0,06	0,48±0,05
плодов	10,22±1,84	11,01±1,82	9,05±1,34
Средняя масса плода, г	23,02±4,24	25,12±3,55	24,35±3,84
Средняя масса плаценты, г	6,15±1,08	6,99±0,64	6,31±1,06
Погибших яйцеклеток	0,67±0,32	0,42±0,67	0,68±0,34
Общая эмбриональная смертность, %	9,1	11,1	11,4

Как видно из таблицы, значения показателей репродуктивной функции колебались как внутри группы, так и по отношению к контролю. Однако выявить в этих колебаниях какую-то закономерность не представляется возможным из-за больших индивидуальных особенностей животных при низкой статистической значимости разницы между сравниваемыми величинами.

При визуальном изучении внутренних органов, их топографии, разрезов туловища в различных проекциях по методу Вильсона (в модификации отдела эмбриологии ИЭМ АМН СССР) отклонения от нормы и различия с контролем не выявлены. Следовательно, **Препарат** не оказывает эмбриотоксического действия.

Выводы

Исследованный **Препарат** является малотоксичным. Максимальная доза, примененная перорально белым крысам (25000 мг/кг МТ) и цыплятам-бройлерам (50000 мг/кг МТ), не вызывала гибели животных. При ежедневном пероральном введении **Препарата** взрослым белым крысам в дозах 1/20 и 1/10 от максимальной дозы в течение 28 сут не установлено клинически выраженных негативных изменений в поведении и физиологических отправлениях животных, интенсивности их роста, морфологических и биохимических показателях крови. При ежедневном пероральном введении **Препарата** цыплятам-бройлерам в течение 28 сут в дозах 2500 и 5000 мг/кг МТ, начиная с 3-суточного возраста, негативные изменения общеклинических и гематологических показателей не отмечены. От дозы 10000 мг/кг МТ в сыворотке крови статистически достоверно повышалась активность АсАТ (на 9,9 %) и АлАТ (на 17,2 %), коэффициент де Ритгиса составлял 4,88 против 5,20 в контроле. Препарат не обладает местнораздражающим, кумулятивным, аллергизирующим, эмбриотоксическим и тератогенным действием и может применяться цыплятам в дозе 1000...2500 мг/кг МТ.

Библиография

- Горшков, Г.И. Есть ли альтернатива антибиотикам? / Горшков Г.И., Е.Г. Яковлева // Ветеринарный вестник (Белгород). — 2013. — №8 (138). — С. 6-8.
- Игнатова, И.Д. Фармако-токсикологические свойства и терапевтическая эффективность антибактериального препарата на основе флорфеникола: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — защищена 12.04.2007г. — М.: ООО «Цифровичок», 2007. — 15 с.
- Кондрахин, И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И.П. Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко [и др.]. — М.: КолосС, 2004. — 520 с.
- Лекарственные средства для ветеринарного применения в России: справочник. — М.: АстраФармСервис, 2013. — 480 с.
- Марчук, Г.И. Горизонты научного поиска / Г.И. Марчук. — М.: Советская Россия, 1987. — 224 с.
- Машковский, М.Д. Лекарства XX века / М.Д. Машковский. — М.: Новая волна, 1998. — 320 с.
- Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследований в клинике / В.В. Меньшиков. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
- Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.

SUMMARY

A.V. Hmirov¹, G.V. Snosz², G.I. Gorshkov¹

¹ Belgorod State Agrarian Academy named after V.Ya. Gorin.

² Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin.

Determination of the Experimental Preclinical Toxicopharmacological Parameters of Preparation on the Basis of Florphenicol. The preparation containing florphenicol is a low-toxic drug. Its doses of 2,5...5g per Kg of the body weight administered orally (per os) only once and 1/10 of the maximum dose administered during. The period of 28 days didn't cause the clinical signs of poisoning. The preparation when used experimentally caused neither local irritation nor any allergic, embriotoxic, cumulative or teratogenic effect.