

УДК 636.09:616.993.1:635.5

**Харів І.І., Стибель В.В., Гуфрій Д.Ф., Гутий Б.В., Павлів О.В. ©***Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, м. Львів, Україна***ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ «АМПРОЛІНСИЛУ»**

У статті розглядаються результати експериментальних досліджень із вивчення токсичності «Ампролінсилу» на інфузоріях та на лабораторних тваринах. Встановлено, що у 10% концентрації «Ампролінсил» за 15 хв. спричинив загибель 22% інфузорій. У решти парамецій було сповільнення активної рухливості. За 60 хв. встановлено загибель 50% інфузорій, а за 24 усі парамеції загинули. У інфузорій, що загинули, встановлено зменшення розмірів клітин, клітинної оболонки. У 20% концентрації «Ампролінсил» за 15 хв спричинив загибель майже 50% парамецій. За 30хв загинуло 75%, а за 60 хв – 100% інфузорій. За внутрішньошлункового введення білим щурам встановлено, що препарат «Ампролінсил», у дозі 5000 мг/кг маси тіла і вище, спричиняв появу клінічних ознак інтоксикації вже через 4-5 годин, які характеризувалися порушенням координації рухів, тремором окремих м'язів. Загибель тварин проходила протягом 1-4 діб. Кількість тварин, що загинули, перебувала в прямій залежності від введеного препарату у певній дозі. Після внутрішньо шлункового введення білим мишам встановлено, що препарат «Ампролінсил» у дозі 4000 мг/кг маси тіла і вище спричиняв клінічні ознаки інтоксикації через 5-6 годин, які характеризувалися порушенням координації рухів, тремором окремих м'язів. Тварини збивалися у групи, намагалися заховатися у підстилку. Загибель мишей проходила протягом 1-3 діб в прямій залежності введеного препарату в певній дозі. Введення індики препарату в дозах 5, 25 і 50 г/кг маси тіла не викликало загибелі дослідних птахів упродовж усього часу спостереження. Після введення препарату у дозі 50 г/кг у індики спостерігали різке пригнічення, відмову від корму, реакція на подразники відсутня. На наступну добу стан птахів значно покращився, а на 3-4-ю добу змін в клінічному стані дослідних тварин порівняно з контрольною групою не спостерігали. У результаті досліджень із вивчення гострої токсичності «Ампролінсилу» в дослідах на парамеціях за показниками ЛК<sub>100</sub> – концентрація препарату, за якої за 48 год гине 100% парамецій та на лабораторних тваринах, новий вітчизняний протипротозойний препарат «Ампролінсил» належить до малотоксичних лікарських засобів.

**Ключові слова:** фармакологія, гостра токсичність, бровітакоксид, «Ампролінсил», індики, еймерії, гистомонади.

УДК 636.09:616.993.1:635.5

**Харив И.И., Стибель В.В., Гуфрий Д.Ф. Гутый Б.В., Павлив О.В.***Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого, г. Львов, Украина***ИЗУЧЕНИЕ ГОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ «АМПРОЛИНСИЛА»**

В статье рассматриваются результаты экспериментальных исследований по изучению токсичности «Ампролинсила» на инфузориях и на лабораторных животных. установлено, что в 10% концентрации

«Ампролинсил» за 15 мин причинил гибель 22% инфузорий. У остальных парамеций было замедление активной подвижности. За 60 мин установлена гибель 50% инфузорий, а за 24 часа все парамеции погибли. В инфузорий, погибших установлено уменьшение размеров клеток, клеточной оболочки. В 20% концентрации «Ампролинсил» за 15 мин причинил гибель почти 50% парамеций. За 30 мин погибло 75%, а за 60 мин - 100% инфузорий. После внутрижелудочного введения белым крысам????? установлено, что препарат "Ампролинсил" в дозе 5000 мг / кг массы тела и выше вызывал появления клинических признаков интоксикации уже через 4-5 часов, которые характеризовались нарушением координации движений, тремором отдельных мышц. Гибель животных проходила в течение 1-4 суток. Количество животных, погибших, была в прямой зависимости от дозы введенного препарата. После внутрижелудочного введения белым мышам????? установлено, что препарат "Ампролинсил" в дозе 4000 мг / кг массы тела и выше вызывал клинические признаки интоксикации через 5-6 часов, которые характеризовались нарушением координации движений, тремором отдельных мышц. Животные сбивались в группы, пытались спрятаться в подстилку. Гибель мышей проходила в течение 1-3 суток в прямой зависимости введенного препарата в соответственной дозе. Введение индюкам препарата в дозах 5, 25 и 50 г / кг массы тела не вызывало гибели исследовательских птиц на протяжении всего времени наблюдения. После введения препарата в дозе 50 г / кг в индюшат наблюдали резкое угнетение, отказ от корма, реакция на раздражители отсутствовала. На следующие сутки состояние птиц значительно улучшилось, а на 3-4 и сутки изменений в клиническом состоянии подопытных животных по сравнению с контрольной группой не выявляли. У результате исследований по изучению острой токсичности «Ампролинсила» в опытах на парамеции по показателю ЛК100 - концентрация, при которой за 48 ч погибает 100% парамеций, и на лабораторных животных новый отечественный противопротозойный препарат «Ампролинсил» относится к малотоксичным лекарственным средствам.

**Ключевые слова:** фармакология, острая токсичность, бровитакокид, «Ампролинсил», индюки, эймерии, гистомонады.

UDC 636.09:616.993.1:635.5

**I. Chariv, B. Stybel, D. Hufrij, B. Gutij, O. Pavliv**

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies  
named after S. Z. Gzhytskyj*

### **STUDY OF ACUTE TOXICITY "AMPROLINSYLU"**

The article reviews the results of experimental studies of the toxicity study "Amprolinsylu" on infusoria and in laboratory animals. Found that in 10% concentration "Amprolinsyl" for 15 minutes. caused the deaths of 22% of ciliates. The rest was slowing parametsiy active mobility. For 60 minutes. found death in 50% of ciliates and 24. All parametsiyi died. In ciliates killed installed reducing the size of the cells, the cell membrane. In the 20% concentration "Amprolinsyl" for 15 minutes caused the deaths of almost 50% parametsiy. For 30 minutes lost 75%, and for 60 minutes - 100% ciliates. For intra gastric administration white rats found that the drug "Amprolinsyl", at a dose of 5000 mg / kg and above caused the onset of clinical signs of intoxication after 4-5 hours, and marked by poor coordination of movements,

*tremor individual muscles. The death of animals held for 1-4 days. Number of animals killed was directly dependent on the drug in a particular dosage. After intra gastric administration white mice found that the drug "Amprolinsyl" at a dose of 4000 mg / kg and above caused the clinical signs of intoxication after 5-6 hours, and marked by poor coordination of movements, tremor individual muscles. Stray animals in the group tried to hide in the litter. The death of the mice held for 1-3 days in direct proportion of the drug in a particular dosage. Introduction turkey drug in doses of 5, 25 and 50 g / kg did not cause death of birds throughout the experimental observation time. After injection at a dose of 50 g / kg in turkeys observed a sharp depression, refusal to feed, no response to stimuli. On the following day the state bird is much improved, and the 3-4 th day changes in the clinical condition of experimental animals compared with the control group were observed. The studies of acute toxicity study "Amprolinsylu" in experiments on parametsiyah on indicators LK100 - drug concentration at which 48 hours killed 100% parametsiy and in laboratory animals, domestic new antiprotozoal drug "Amprolinsyl" refers to low-toxic drugs.*

**Key words:** pharmacology, acute toxicity, brovitacoccides, "Amprolinsile", *Silybum marianum*, turkeys, *eimeria*, *histomonades*

**Актуальність теми.** У проведених попередніх дослідженнях встановлено, що за еймеріозо-гістомонозної інвазії індиків високу терапевтичну ефективність проявляє бровітаксид за сукупного застосування з плодами розторопші плямистої [1,2,3,4]. Бровітаксид - це 12,5% премікс, що містить: ампроліуму хлористоводневого 12,5 г, вітаміну А – 1млн ОД, вітаміну К – 200 мг, борошна кукурудзяного до 100г. Ампроліум – протиеймеріозний препарат групи бензамідазолів. В організмі еймерій ампроліум блокує метаболізм глюкозо-6-фосфатдегідрогіназу, що призводить до розладів обміну вуглеводів і загибелі паразитів. Оскільки в тонкому кишечнику, де паразитують еймерії, настає деструкція епітеліальних клітин слизової оболонки, це призводить до катарального запалення, токсини еймерій затримують згортання крові, тому в складі комплексного препарату бровітаксиду наявний вітамін К, що діє гемокоагулянтно, та вітамін А, що активує регенерацію епітелію слизових оболонок. У ряді експериментальних досліджень встановлено, що за протозойних інвазій пригнічується стан імунної системи, внаслідок чого у тварин і птиці розвивається вторинний імунодефіцит. У таких тварин протозойна інвазія ускладнюється вірусною і бактеріальною мікрофлорою [5,6]. У наших дослідженнях на інтактних індиках встановлено, що бровітаксид навіть у терапевтичній дозі (2 г/кг корму) пригнічує імунну систему птиці. Враховуючи вищевикладене про імунодепресивну дію бровітаксиду, ми розробили метод лікування індиків, після якого застосовували бровітаксид сукупно з плодами розторопші плямистої – по 2 г/кг корму обох препаратів 5 діб поспіль. Висока терапевтична ефективність плодів розторопші плямистої зумовлена флаволігнанамі групи «Силімарину». Останні блокують надмірне перекисне окиснення ліпідів і захищають клітинні мембрани від агресивних форм кисню. Усе це забезпечує препарату високу гепатопротекторну та антиоксидантну дії. Другим надзвичайно важливим компонентом плодів розторопші плямистої є широкий набір і високий рівень вітамінів. Зокрема,

вітамін С (аскорбінова кислота) активує синтез антитіл – імуноглобулінів класів IgA та IgM. Вітамін С посилює активність компонента, підвищує імунну функцію інтерферону та посилює неспецифічну ланку імунного захисту організму проти бактеріальних інфекцій [253]. Вітамін К, що входить до складу розторопші забезпечує стабільне згортання крові, а мікроелементи Купрум, Ферум і Кобальт беруть участь в еритропоезі. Вітамін А і Е забезпечують швидку регенерацію епітелію кишечника ураженого еймеріями [7]. Внаслідок детального вивчення фармакодинаміки бровітакокциду і плодів розторопші плямистої, для лікування птиці, ураженої еймеріями і гістомонадами, ми розробили препарат «Ампролінсил». Цей препарат містить ампроліум – протиеймеріозний засіб і силімарин – антиоксидантний, гепатопротекторний та імуностимулювальний засіб. Ампролінсил призначений для профілактики та лікування птиці при протозоозах, особливо за змішаних асоціативних інвазіях. З профілактичною метою задають із кормом 1 г/ кг корму, з лікувальною – 2 г/ кг корму. Як і в препараті бровітакокцид, «Ампролінсил» містить ампроліум хлористоводневий, що діє протипротозойно. Замість синтетичних вітамінів А і К у даний препарат входять розмелені плоди розторопші плямистої, що містять природні вітаміни А, К, Е, групу В та мікроелементи: Купрум, Ферум, Кобальт та інші, що значно розширюють та підвищують фармакологічну дію препарату «Ампролінсил». У відповідності з методичними рекомендаціями з доклінічного вивчення лікарських препаратів [8], кожний новий препарат необхідно дослідити за такими показниками: визначити токсичність «Ампролінсилу» біопробою на інфузоріях; установити токсичність препарату «Ампролінсил» на лабораторних тваринах після одноразового введення (гостра токсичність); дослідити кумулятивні властивості препарату на білих щурах; дослідити токсичність «Ампролінсилу» на лабораторних тваринах після довготривалого введення (хронічна токсичність); вивчити ефективність «Ампролінсилу». Дослідження проводили відповідно до методичних рекомендацій «Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин» і «Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів» [9,10].

**Матеріал і методи.** Виходячи з цього, ми визначили мету роботи, а саме вивчити токсичність «Ампролінсилу» на інфузоріях та на лабораторних тваринах і на основі цих даних дати обґрунтування застосування «Ампролінсилу» у практиці ветеринарної медицини.

Досліди проводили на інфузоріях *Paramecium caudatum* за методикою Е.Г.Голубкової у модифікації ДНДКІ ветеринарних препаратів і кормових добавок [243]. Культуру інфузорій вирощували в пептоновому середовищі, що в 100мл дистильованої води містить: пептону – 2 г, глюкози – 0,5 г, дріжджового екстракту 0,1 г, солі морської 0,1 г. У флакон антибіотика наливали 10 мл пептонового середовища і вносили 0,2 мл інокуляту парамецій. Перед тестуванням готували 10– і 100- кратні розведення «Ампролінсилу». Для його отримання до 9 мл культури інфузорій додавали 1 мл розчину «Ампролінсилу». Підрахунок інфузорій проводили за допомогою лічильної камери Богорова. Загальна кількість інфузорій у кожному досліді 100–150 екземплярів, у

стаціонарній фазі росту в якій більшість клітин були великих розмірів. Кожен дослід проводили у 5 разовій повторності. За допомогою бінокулярного мікроскопа «МБС – 9», за збільшення 6 х 4, підраховували загальну кількість інфузорій до введення «Ампролінсилу», та кількість клітин, які загинули за 15, 30 і 60 хв та 24; 48 год після введення «Ампролінсилу». Токсичність «Ампролінсилу» в гострому досліді на інфузоріях визначали за тест-критерієм  $DL_{100}$  – концентрація препарату, за якої гине 100 % клітин. Встановлення параметрів гострої токсичності препарату. Досліди з вивчення гострої токсичності препарату «Ампролінсилу» проводили на 30 білих щурах, 2-3 – місячного віку, масою 170-190 г та 30 білих мишах 2-3 – місячного віку, масою 19-22 г. Препарат вводили у шлунок піддослідним тваринам за допомогою металевого зонда для лабораторних тварин натще, одноразово. Дослід проведено на 5 групах тварин, по 6 тварин у кожній. Препарат вводили лабораторним тваринам у наступних дозах: для білих щурів – 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 мг/кг за діючою речовиною (Д.Р.) і для білих мишей – 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 мг/кг (за Д.Р.). Вивчення гострої токсичності препарату «Ампролінсил» для індиків проводили на молодняку 25-денного віку, масою тіла 1000-1200 г. Препарат вводили у зоб дослідним індичатам у дозах: 5, 25 і 50 г/кг маси тіла птахів. Високі дози препарату вводили дрібними частинами з інтервалом 2-3 години. Після введення препарату спостереження за лабораторними тваринами та птицею вели протягом 14 діб. У першу добу досліді тварини знаходились під постійним наглядом. Після цього враховували такі показники: загальний стан, зовнішній вигляд, особливості поведінки тварин, інтенсивність та характер рухливої активності, наявність судом, координацію рухів, реакцію на зовнішні подразники (тактильні, звукові, світлові), стан волосяного покриву, видимих слизових оболонок, відношення до корму, ритм, частоту дихання, час виникнення та характер інтоксикації, її важкість, перебіг, час загибелі тварин або їх одужання. Під час досліді враховували загибель лабораторних тварин та, залежно від дії препарату в певній дозі, вираховували середньосмертельні дози ( $DL_{50}$ ) даної лікарської форми за методом Г. Кербера.

### Результати досліджень та їх обговорення.

#### 1. Токсичність «Ампролінсилу» на інфузоріях

У результаті проведених досліджень (табл. 1) встановлено, що в 1% концентрації (терапевтична) «Ампролінсил» не спричиняє загибелі інфузорій.

Таблиця 1

#### Час загибелі інфузорій за дії «Ампролінсилу» в різних концентраціях

Концентрація препарату	Відсоток інфузорій, які загинули				
	15хв	30хв	60хв	24год	48год
1%	-	-	-	-	-
10%	22	37	62	100	+
20%	45	75	100	+	+

Примітка: - відсутність загибелі інфузорій; + абсолютна загибель інфузорій.

Хоча в перші 30 хв клітини були збуджені, на що вказує прискорений хаотичний рух. У окремих особин можна було бачити швидке обертання навколо умовної перпендикулярної вісі тіла клітини.

У 10% концентрації «Ампролінсил» за 15 хв. спричинив загибель 22% інфузорій. У решти парамецій було сповільнення активної рухливості.

За 60 хв встановлено загибель 50% інфузорій, а за 24 год. усі парамеції загинули. У інфузорій, що загинули, встановлено зменшення розмірів клітин, клітинної оболонки.

У 20% концентрації «Ампролінсил» за 15 хв спричинив загибель майже 50% парамецію. За 30хв загинуло 75%, а за 60 хв – 100% інфузорій.

**2. Гостра токсичність.** За внутрішньошлункового введення білим щурам встановлено, що препарат “Ампролінсил”, у дозі 5000 мг/кг маси тіла і вище спричиняв появи клінічних ознак інтоксикації вже через 4-5 годин, які характеризувалися порушенням координації рухів, тремором окремих м’язів. Загибель тварин проходила протягом 1-4 діб. Кількість тварин, що загинули, була в прямій залежності від дози введеного препарату.

Матеріали отриманих даних досліджень та підрахунки  $DL_{50}$  препарату наведені у таблиці 2.

$DL_{50}$  розраховували за формулою:

$$DL_{50} = LD_{100} - \Sigma (z d) / m,$$

де:  $DL_{100}$  – доза, від якої загинули всі тварини;

$\Sigma$  – символ суми;

$z$  – половина загальної кількості тварин, які загинули від дії дослідного препарату у двох наступних дозах;

$d$  – різниця двох наступних доз;

$m$  – кількість тварин у групі на кожну дозу.

$$DL_{50} = 8000 - [(1000+2500+3500+5500):6] = 5916,7 \text{ мг/кг.}$$

Таблиця 2

**Середньосмертельні дози препарату “Ампролінсилу” на білих щурах за внутрішньошлункового введення після обчислення за методом**

**Г. Кербера**

Препарат у дозі, мг/кг	4000	5000	6000	7000	8000
Вижило	6	4	3	1	0
Загинуло	0	2	3	5	6
$Z$	1,0	2,5	3,5	5,5	
$d$	1000	1000	1000	1000	
$z d$	1000	2500	3500	5500	

Отже,  $DL_{50}$  препарату “Ампролінсил” при внутрішньошлунковому введенні білим щурам становить 5916,7 мг/кг.

Після внутрішньошлункового введення білим мишам встановлено, що препарат “Ампролінсил” у дозі 4000 мг/кг маси тіла і вище спричиняв клінічні ознаки інтоксикації через 5-6 годин, які характеризувалися порушенням координації рухів, тремором окремих м’язів. Тварини збивалися у групи,

намагалися заховатися у підстилку. Загибель мишей проходила протягом 1-3 днів в прямій залежності від введеного препарату в певній дозі.

Матеріали отриманих даних досліджень та підрахунки  $DL_{50}$  препарату висвітлені у таблиці 3.

$DL_{50}$  розраховували за формулою:

$$DL_{50} = LD_{100} - \sum (z d) / m,$$

де:  $DL_{100}$  – доза, від якої загинули всі тварини;

$\sum$  – символ суми;

$z$  – половина загальної кількості тварин, які загинули від двох наступних доз;

$d$  – різниця двох наступних доз;

$m$  – кількість тварин у групі на кожну дозу.

$$DL_{50} = 7000 - [(500+2000+3500+5000):6] = 5166,7 \text{ мг/кг.}$$

Таблиця 3

**Середньосмертельні дози препарату “Ампролінсилу” на білих мишах за внутрішньошлункового введення після обчислення за методом Г. Кербера**

Препарат у дозі, мг/кг	3000	4000	5000	6000	7000
Вижило	6	5	3	2	0
Загинуло	0	1	3	4	6
$Z$	0,5	2,0	3,5	5,0	
$d$	1000	1000	1000	1000	
$z d$	500	2000	3500	5000	

Отже,  $DL_{50}$  препарату “Ампролінсилу” після внутрішньошлункового введення білим мишам становить 5166,7 мг/кг.

Введення індикам препарату в дозах 5, 25 і 50 г/кг маси тіла не викликало загибелі дослідних птахів упродовж усього часу експерименту. Після введення препарату у дозі 50 г/кг у індишат виявили різке пригнічення, відмову від корму, реакція на подразники відсутня. На наступну добу стан птахів значно покращився, а на 3-4-ю добу змін в клінічному стані дослідних тварин у порівняно з контрольною групою не встановили.

Дані досліджень наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

**Показники токсичності препарату на індиках**

Кількість тварин у групі	Препарат у дозі, г/кг	Число загиблих тварин		
		всього	у %	середній час загибелі
3	5	0	0	<b>0</b>
3	25	0	0	<b>0</b>
3	50	0	0	<b>0</b>

Отже,  $LD_{50}$  за його внутрішньо шлунковому введенні лабораторним тваринам “Ампролінсилу” (білі миші та щури) є більшою 5000 мг/кг.

**Висновки.**

1. У результаті досліджень із вивчення гострої токсичності «Ампролінсилу» в дослідях на парамеціях за показниками ЛК<sub>100</sub> – концентрація препарату, за якої за 48 год гине 100% парамецій, та на лабораторних тваринах новий вітчизняний протипротозойний препарат «Ампролінсил» належить до малотоксичних лікарських засобів (4-й клас токсичності за ГОСТ 12.1.007-76).

**Література**

1. Харів І.І. Вплив розторопші плямистої на показники неспецифічної резистентності організму індиків. // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького /І.І. Харів //Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. - Том 13, № 3 (45). Ч. 1. – Львів, 2010. – С.292-296.

2. Харів І.І. Стан імунної системи індиків, уражених асоціативною еймеріозо-гістомонозною інвазією. /І.І. Харів //Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Том 13, № 4 (50). Ч. 1. – Львів, 2011. – С. 481-485.

3. Харів І.І. Вплив бровітакоксиду і плодів розторопші плямистої на активність ферментів у сироватці крові індиків, уражених асоціативною еймеріозо-гістомонозною інвазією / І.І. Харів // Вісник Житомирського національного агроєкологічного університету ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА . Житомир, 2012, № 1, (32). Т 3, Ч.1, С. 98-102

4. Харів І.І. Білоксинтизувальна функція печінки в інтактних індиків на тлі дії бровітакоксиду і плодів розторопші плямистої / І.І. Харів Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. Львів, - 2012, в.13, № 3-4 , С. 258-262

5. Тимофеев Б. А. Эймериоз птиц / Б.А. Тимофеев // Ветеринарный консультант. – М., 2004. – №5. – С. 6-10.

6. Прыдыбайло Н.Д. Иммунодефициты у сельскохозяйственных животных и птиц, профилактика и лечение их иммуномодуляторами /Н.Д. Прыдыбайло //Докл. ВАСХНИЛ – 1991. - №12. – С. 44-45.

7. Rui G.C. Advances in pharmacological studies of silimarin / G.C. Rui // Met. Inst. Oswaedo. Crur. – 1991. - №86. – P. 2205-2211.

8. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І.Я. Коцюмбас і співавтори. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.

9. Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин: Методичні рекомендації / Косенко М.В., Малик О.Г., Коцюмбас І.Я., Патерега І.П., Чура Д.О. - К., 1997. - 34 с.

10. Маланин Л.П. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве / Л.П. Маланин, А.П. Морозов, А.С. Селиванова // Ветеринарные препараты: Справочник / Под ред. А.Д. Третьякова. – М.: Агропромиздат, 1988. – С. 239-289.

Рецензент – д.вет.н., професор Гунчак В.М.