Original researches

Determination of the chronic toxicity of preparation “Bendamin” on laboratory animals

I. S. Varcholyak, B. V. Gutyi

Stepan Gzhyskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Lviv, Ukraine

Received: 10 May 2019

Revised: 18 May 2019

Accepted: 09 June 2019

Stepan Gzhyskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Pekarska str. 50, Lviv, 79010, Ukraine

Tel.: +38-068-136-20-54

E-mail: bvh@ukr.net

Cite this article: Varcholyak, I.S., & Gutyi, B.V. (2019). Determination of the chronic toxicity of preparation “Bendamin” on laboratory animals. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(2), 63–68. doi: 10.32819/2019.71011

Abstract. In the process of creating and introducing each new preparation one of the stages is its toxicological studies with the clarification of the parameters of acute and chronic toxicity in white rats in the long term of its intragastric introduction. The aim of the work was to determine the parameters of the chronic toxicity of the cardiological preparation “Bendamin” on laboratory animals in a laboratory experiment. The studies were carried out on white, sexually-mature, young male rats of the Vistar line of 2–3 months old, weighing 170–185 g, which were kept on a standard ration of the Institute Vivarium of the State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives. Four experimental groups of white rats were formed. The first experimental group served as a control. Other experimental groups were prescribed “Bendamin”, respectively, in therapeutic, 5-fold and 10-fold doses. The preparation in the above doses was given at a specific time, daily, during 30 days, peroral, fasting, using a probe for laboratory animals. During the research period to determine the chronic toxicity of “Bendamin”, no probable changes in the behavior of the experimental animals were observed. It should be noted the slight inhibition of the organism state of the being studied group of rats receiving a 10-fold dose of the preparation. In the investigated group of rats, which was injected the preparation in the 10-fold dose, inhibition of protein synthesis and detoxification function of the liver was established. There is also a violation of the functional state of the liver, which indicates an increase in the activity of aminotransferases in their blood. In the study of the relative weight coefficients of the mass of the internal organs, it was found that the introduction of the “Bendamin” preparation in the 10-fold dose led to a significant change in the relative weight of the liver and the spleen. The “Bendamin” preparation in the therapeutic and 5-fold doses contributed to a slight increase in the weighting coefficient. Lung weight loss occurred at introduction of the preparation in the 5- and 10-fold doses. According to State Standard 12.1.007-76, “Bendamin”, for intragastric introduction, according to the degree of hazard belongs to the fourth-class toxicity – low toxicity substances (DL_{50} more than 50,000 mg/kg body weight).

Keywords: “Bendamin” preparation; chronic toxicity; rat; blood; body mass index; emotional and behavioral reaction.

Визначення хронічної токсичності препарату “Бендамін” на лабораторних тваринах

I. С. Вархоляк, Б. В. Гутій

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, Україна

Анотація. Процес створення та впровадження кожного нового препарату передбачає його токсикологічні дослідження зі з'ясуванням параметрів гострої і хронічної токсичності на білих щурах за умов тривалого внутрішньошлункового введення. Метою роботи було в умовах експерименту визначити параметри хронічної токсичності кардіологічного препарату “Бендамін” на лабораторних тваринах. Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях лінії Вістар 2–3-місячного віку, масою 170–185 г, яких утримували на стандартному раціоні інститутського віварію Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Сформовано 4 дослідні групи білих щурів. Перша дослідна група була контрольною, іншим задавали препарат “Бендамін” відповідно у терапевтичній, 5-ти кратній та 10-ти кратній дозах. Препарат у вищевказаних дозах задавали у визначений час, щоденно, протягом 30 діб, перорально, натще, за допомогою зонда для лабораторних тварин. Протягом періоду досліджень з визначення хронічної токсичності препарату “Бендамін” вірогідних змін у поведінці дослідних тварин не спостерігали. Слід відзначити незначне пригнічення стану організму щурів дослідної групи, які одержували 10-ти кратну дозу препарату. У дослідній групі щурів, яким вводили препарат у 10-ти кратній дозі, встановлено пригнічення протеїнсинтезувальної та дезінтоксикаційної функції печінки. Також встановлено порушення функціонального стану печінки, на що вказує підвищення активності амінотрансфераз у їх крові. При дослідженні відносних вагових коефіцієнтів маси внутрішніх органів встановлено, що введення препарату “Бендамін” у 10-ти кратній дозі призвело до достовірної зміни відносної маси печінки, селезінки. Препарат “Бендамін” у терапевтичній та 5-ти кратній дозах сприяв незначному збільшенню вагового коефіцієнту. Зниження маси легень відбувалося при введенні препарату у 5-ти та 10-ти кратних дозах. Згідно з ГОСТ 12.1.007-76, “Бендамін”, за внутрішньошлункового введення, за ступенем небезпечності відноситься до 4 класу токсичності – малотоксичні речовини (DL_{50} більше 50000 мг/кг маси тіла).

Ключові слова: препарат “Бендамін”; хронічна токсичність; щури; кров; індекс маси органів; емоційно-поведінкова реакція.

Вступ

За останні кілька років ветеринарна медицина зробила істотний ривок вперед. Особливо в області діагностики, яка дозволяє не допустити розвиток серйозних патологій у тварин (Varkholiak, 2016; Brett et al., 2019; Oldach et al., 2019). Кардіологія це один із напрямків ветеринарної медицини, який найбільш інтенсивно розвивається. За останні роки було проведено кілька значних досліджень в області лікування серцевої недостатності, були введені нові методи діагностики, виявлено генетичні особливості окремих патологій та з'явилися нові лікарські засоби, наприклад: пімобендан, поліненасичені жирні кислоти, силденафіл, левосимендан, торасемід, небіволл, лізиноприл, клопидогрель та деякі інші (Zhulikova, 2016; Varkholiak, 2016; Tjostheim et al., 2019; Yata et al., 2019). Разом з тим, даних про застосування нових терапевтичних засобів за серцево-судинної патології недостатньо.

Таким чином, обґрунтовано виникає потреба у проведенні всебічних досліджень механізмів дії лікарського засобу, його взаємодії із іншими препаратами, клінічної ефективності лікування та безпеки застосування.

У процесі створення та впровадження кожного нового препарату одним із етапів є його токсикологічні дослідження зі з'ясуванням параметрів гострої та хронічної токсичності на білих щурах за умов тривалого його внутрішньошлункового введення (Gutyj et al., 2017; Todoruk et al., 2018).

У попередніх наших дослідженнях встановлено, що препарат “Бендамін” після введення в шлунок білим мишам та щурам у максимально допустимій кількості не викликає клінічних ознак отруєння та відхилень у поведінці (Varkholiak & Gutyj, 2018).

Метою наших досліджень було в умовах експерименту визначити параметри хронічної токсичності препарату “Бендамін” на лабораторних тваринах.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях лінії Вістар 2–3-місячного віку, масою 170–185 г, яких утримували на стандартному раціоні інститутського віварію Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок.

Експериментальні дослідження проведені у відповідності до вимог лікарсько-біологічного експерименту з підбору аналогів, постановці контролю, дотриманню однакових умов годівлі та утримання під час проведення дослідів та обліку результатів (Kotsiumbas et al., 2006).

Було сформовано 4 дослідні групи білих щурів. Перша група слугувала контролем, дослідним групам задавали препарат “Бендамін” у терапевтичній, 5-ти кратній та 10-ти кратній дозах. Препарат у вищевказаних дозах задавали у визначений час, щоденно, протягом 30 діб, перорально, натще, за допомогою

зонда для лабораторних тварин. На початку та в кінці дослідів щурів зважували, а також, протягом дослідів, вели спостереження за клінічними станом і поведінкою тварин.

Препарат “Бендамін” – це лікарський препарат для тварин, який впливає на серцево-судинну систему. До складу препарату входить інгібітор фосфодіестерази-3 та етилметилгідроксипіридину сукцинат. Останній володіє вираженою антиоксидантною, антигіпоксичною, анкіолітичною, мембрано- та стрес-протекторною активністю.

На 31 добу від початку введення препарату на 5 білих щурах із кожної групи провели визначення дезінтоксикаційної функції печінки за допомогою гексеналової проби (Rozin, 1964). Для цього лабораторним тваринам внутрішньоочеревинно вводили 1%-й розчин гексеналу в дозі 45 мг/кг. Потім реєстрували середній час сну від моменту коли тварина приймала бокове положення.

Одночасно на інших 5 щурах проводили пробу з плаванням за М. Л. Риловою (Rylova, 1964). Для проведення дослідів використовували скляний акваріум. Стоп води в акваріумі – 50 см, температура води – 12–13 °С. Дослідним тваринам прикріплювали вантаж (металеві наважки) – 5% від маси тіла. Перед початком дослідів щура зважували і прикріплювали на хвіст відповідний до його маси вантаж. Потім пускали плавати одночасно дослідних і контрольних тварин, приблизно однакової маси. Слідкували, що тварини постійно плавали. Показником працездатності є час, протягом якого тварина може протриматись на воді. Плавали тварини до повного опускання на дно.

На наступну добу лабораторних тварин за легкого ефірного наркозу декапітували, проводили гематологічні і біохімічні дослідження за загально-визнаними методиками та розтинали визначаючи коефіцієнти маси органів, порівняно з контрольною групою (Malanin et al., 1988; Vlizlo et al., 2012).

Аналіз результатів досліджень проводили за допомогою пакету програм *Statistica 6.0*. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стюдента. Результати вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати

Згідно проведених досліджень по хронічній токсичності новоствореного кардіопрепарату, встановлено, що від задавання білим щурам препарату у терапевтичній дозі, а також у дозі, що у 5 та 10 разів її перевищує, видимих клінічних ознак інтоксикації препаратом не спостерігали. Значущих порушень зовнішнього вигляду, загального стану, поведінкових реакцій також не відзначали. Весь період дослідів (30 діб) дослідні тварини зберігали апетит. Протягом періоду досліджень з визначення хронічної токсичності препарату “Бендамін” вірогідних змін у поведінці дослідних тварин не спостерігали (табл. 1), а характерні поведінкові реакції відображали нормальний функціональний стан центральної нервової системи. Слід відзначити про незначне пригнічення стану організму щурів дослідної групи, які одержували 10-ти кратну дозу препарату.

Таблиця 1. Показники фізіологічного стану і активності білих щурів за 30-добового введення препарату “Бендамін” ($M \pm m$, $n = 6$)

Показник	Група тварин/препарат, доза			
	К (контроль)	Д1 (терапевтична)	Д2 (5-кратна)	Д3 (10-кратна)
Кількість пересічень	13,5 $\pm$ 1,57	13,2 $\pm$ 1,57	12,67 $\pm$ 1,33	11,3 $\pm$ 1,08
Кількість стійок	1,83 $\pm$ 0,60	2,0 $\pm$ 0,51	1,5 $\pm$ 0,43	1,0 $\pm$ 0,37
Кількість заглядань у нірки	4,17 $\pm$ 0,83	4,0 $\pm$ 0,93	3,83 $\pm$ 0,70	4,0 $\pm$ 0,68
Кількість умивань (грумінг)	2,33 $\pm$ 0,42	2,5 $\pm$ 0,43	2,16 $\pm$ 0,31	1,66 $\pm$ 0,67
Кількість дефекацій	2,33 $\pm$ 0,42	2,17 $\pm$ 0,31	2,0 $\pm$ 0,45	2,17 $\pm$ 0,40
Кількість уринацій	1,5 $\pm$ 0,43	1,16 $\pm$ 0,31	1,33 $\pm$ 0,21	1,67 $\pm$ 0,42

Таблиця 2. Морфологічні показники крові білих щурів на 30-ту добу досліді за вивчення хронічної токсичності препарату “Бендамін” ($M \pm m$, $n = 6$)

Показник	Група тварин			
	Контрольна	Д1	Д2	Д3
Еритроцити, Т/л	7,27 $\pm$ 0,58	7,65 $\pm$ 0,74	7,33 $\pm$ 0,95	6,97 $\pm$ 0,35
Гемоглобін, г/л	122,8 $\pm$ 3,4	135,5 $\pm$ 2,2**	129,1 $\pm$ 2,1	110,4 $\pm$ 3,2**
Гематокрит, %	32,72 $\pm$ 3,21	33,10 $\pm$ 1,50	32,84 $\pm$ 3,11	29,71 $\pm$ 2,53
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	16,9 $\pm$ 0,85	17,7 $\pm$ 0,33	17,6 $\pm$ 0,70	15,8 $\pm$ 0,62
Середній об'єм еритроцитів, мкм ³	45,0 $\pm$ 0,54	43,3 $\pm$ 0,57*	44,8 $\pm$ 0,41	42,6 $\pm$ 0,80*

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,025$; *** – $p < 0,001$, відносно контролю.

Дослідження емоційно-поведінкових реакцій лабораторних тварин після введення препарату “Бендамін” протягом 30 діб у терапевтичній та в 5 разів більшій за неї не показало істотно-го впливу на нервову систему. За цих умов виявлена тенденція до пригнічення у тварин, яким задавали препарат “Бендамін” у 10 разів більшій дозі за терапевтичну, що характеризувалося зменшенням горизонтальної (кількості пересічених квадратів) та вертикальної рухової активності (число підйомів на задні кінцівки), грумінгу (кількості умивань). При цьому дослідницька (кількість заглядань тварин у нірки) та емоційна (кількість дефекацій і уринацій) активність не відрізнялися як від тварин всіх дослідних груп (Д1, Д2, та Д3), так і контрольної групи.

При дослідженні гематологічних показників у всіх тварин, яким вводили препарат “Бендамін” відзначали тенденцію до підвищення, порівняно з контролем, рівня гемоглобіну крові та середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті, а саме: у тварин групи Д1 на 10,3 і 4,7%, групи Д2 – на 5,1 і 4,1% (табл. 2).

При задаванні шурам препарату у 10-ти кратній дозі за терапевтичну рівень гемоглобіну в крові щурів дослідної групи Д3 знижувався і становив, відповідно, 110,4 $\pm$ 3,2 г/л, середній вміст гемоглобіну в еритроциті знизився на 6,5%, відносно контрольної групи щурів. Кількість еритроцитів у крові дослідних груп Д1 і Д2 зростала на 5,2 і 1%, тоді як у дослідної групи Д3 знижувалася на 4,1% відносно показників контрольної групи. Середній об'єм еритроцитів був найнижчим у щурів дослідних

групи Д1 і Д3. У дослідній групі Д2 середній об'єм еритроцитів був наближений до показника контрольної групи щурів.

Внутрішлункове введення препарату “Бендамін” тваринам групи Д1 впродовжпротягом 30 діб привело до збільшення показника гематокриту до 33,10 $\pm$ 1,50 %, тоді як у контролі даний показник становив 33,10 $\pm$ 1,50 %. Найнижчим показником гематокриту був у дослідній групі Д3 де відповідно становив 29,71 $\pm$ 2,53 %.

При введенні кардіопрепарату “Бендамін” у терапевтичній дозі, 5-ти кратній і 10-ти кратній дозі кількість лейкоцитів у крові щурів дослідних груп Д1, Д2 і Д3 зростала на 4,5, 26,9 і 59,7 %, відносно показників контрольної групи. Кількість тромбоцитів у крові зростала тільки у дослідній групі Д1, де відповідно вона становила 553,0 $\pm$ 75,03 Г/л, тоді як у контролі даний показник становив 499,5 $\pm$ 67,4 Г/л.

Кількість лімфоцитів у крові щурів дослідних груп збільшувалась стосовно дози препарату. Чим більшу дозу препарату вводили шурам, тим більшою була кількість лімфоцитів у їх крові, так у крові дослідної групи Д1 кількість лімфоцитів зросла на 1,7%, у крові дослідної групи Д2 – на 4,1% та у дослідної групи Д3 – на 10% відносно контрольної групи (табл. 3).

У лейкоцитарній формулі крові щурів мало місце зниження відносної кількості моноцитів до 1,90 $\pm$ 0,49 % у крові дослідної групи Д3, до 2,12 $\pm$ 0,25 % у крові дослідної групи Д2 та до

Таблиця 3. Лейкоцитарна формула та показники неспецифічного імунітету білих щурів на 30-ту добу досліді за вивчення хронічної токсичності препарату “Бендамін” ($M \pm m$, $n = 6$)

Показник	Група тварин			
	Контрольна	Д1	Д2	Д3
Лейкоцити, Г/л	7,28 $\pm$ 1,13	7,61 $\pm$ 1,65	9,24 $\pm$ 2,10	11,63 $\pm$ 1,10**
Тромбоцити, Г/л	499,5 $\pm$ 67,4	553,0 $\pm$ 75,0	489,8 $\pm$ 97,1	497,0 $\pm$ 62,4
Лімфоцити, %	61,46 $\pm$ 1,93	62,50 $\pm$ 2,22	64,00 $\pm$ 3,05	67,60 $\pm$ 1,33
Моноцити, %	2,60 $\pm$ 0,41	2,50 $\pm$ 0,50	2,12 $\pm$ 0,25	1,90 $\pm$ 0,49
Еозинофіли, %	2,50 $\pm$ 0,50	2,00 $\pm$ 0,57	1,67 $\pm$ 0,66	1,40 $\pm$ 0,25*
Базофіли, %	1,97 $\pm$ 0,26	1,83 $\pm$ 0,16	1,93 $\pm$ 0,22	1,91 $\pm$ 0,24
Нейтрофіли (сегментоядерні), %	25,30 $\pm$ 2,67	25,51 $\pm$ 1,64	25,00 $\pm$ 2,00	22,40 $\pm$ 1,17
Нейтрофіли (паличкоядерні), %	6,17 $\pm$ 1,74	5,66 $\pm$ 0,90	5,28 $\pm$ 1,35	4,79 $\pm$ 1,50
Фагоцитарна активність нейтрофілів, %	20,20 $\pm$ 1,01	21,87 $\pm$ 0,57	23,35 $\pm$ 1,33*	22,63 $\pm$ 0,51*
Фагоцитарний індекс м.т./нейтрофіл	10,28 $\pm$ 0,58	10,50 $\pm$ 1,10	9,5 $\pm$ 0,17	12,45 $\pm$ 1,44

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,025$, відносно контролю.

Таблиця 4. Біохімічні показники крові білих щурів на 30-ту добу досліді за вивчення хронічної токсичності препарату “Бендамін” ($M \pm m$, $n = 6$)

Показники	Група тварин			
	К (контроль)	Д1	Д2	Д3
АлАТ, Од/л	53,4 $\pm$ 2,45	54,2 $\pm$ 3,16	60,2 $\pm$ 4,10	70,3 $\pm$ 3,34**
АсАТ, Од/л	173,4 $\pm$ 3,85	178,2 $\pm$ 5,01	180,1 $\pm$ 3,50	186,2 $\pm$ 4,24*
ЛФ, мккат/л	1,80 $\pm$ 0,30	2,00 $\pm$ 0,42	2,25 $\pm$ 0,25*	2,77 $\pm$ 0,42*
Креатинін, мкмоль/л	74,07 $\pm$ 2,66	67,4 $\pm$ 2,11*	70,16 $\pm$ 2,85	86,6 $\pm$ 3,14*
Сечовина, ммоль/л	5,65 $\pm$ 0,20	5,70 $\pm$ 0,32	5,76 $\pm$ 0,26	4,89 $\pm$ 0,47
Загальний протеїн, г/л	66,65 $\pm$ 2,70	69,36 $\pm$ 3,55	66,91 $\pm$ 4,10	61,32 $\pm$ 4,02
Альбуміни, г/л	26,30 $\pm$ 1,82	31,00 $\pm$ 3,64	25,04 $\pm$ 3,36	18,95 $\pm$ 3,11
Глобуліни, г/л	40,35 $\pm$ 3,61	38,36 $\pm$ 4,85	41,87 $\pm$ 5,20	42,37 $\pm$ 5,31

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,025$, відносно контролю.

2,50 $\pm$ 0,50% у крові дослідної групи Д1.

У лейкограмі також зареєстровано незначне зменшення кількості паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів у крові щурів дослідних груп Д1 і Д2. Найнижчими дані показники були у щурів дослідної групи Д3, яким згодовували препарат “Бендамін” у 10 разів більшій дозі за терапевтичну, де відносно контролю вона знизилася на 1,4 і 2,9%.

Відсоток еозинофілів і базофілів був найнижчим у дослідній групі Д3, де відповідно він становив 1,40 $\pm$ 0,25 і 1,91 $\pm$ 0,24%, тоді як у контрольній групі щурів він був значно більшим і коливався у межах 2,50 $\pm$ 0,50 і 1,97 $\pm$ 0,26%.

Крім цього, встановлено незначне підвищення показників неспецифічної ланки імунної системи білих щурів, а саме: фагоцитарної активності нейтрофілів і фагоцитарного індексу (див. табл. 3).

Установлено, що найвищою фагоцитарна активність нейтрофілів була у крові дослідної групи Д3, де порівняно з контрольною групою вона зросла 2,43%. Аналогічні зміни спостерігаємо і при дослідженні фагоцитарного індексу, який був вищим у крові дослідної групи Д1 і Д3 на 2,1 і 21%, тоді як у крові щурів дослідної групи Д2 даний показник був нижчим на 7,6%, відносно контролю.

За терапевтичної дози препарату відхилень у показниках крові, що характеризують функціональний стан печінки не було. При введенні препарату у 5-ти кратній і 10-кратній дозі встановлено у щурів дослідної групи Д2 і Д3 підвищення ак-

тивності аланін-амінотрансферази на 12,7 і 31,6%, відносно контрольної групи щурів. Аналогічні зміни спостерігаємо і при визначенні активності аспартат-амінотрансферази, яка у дослідної групи Д2 збільшилася на 3,9%, а у сироватці крові дослідної групи Д3 на 7,4% відносно щурів контрольної групи. Також встановлено у сироватці крові дослідних щурів підвищення лужної фосфатази, яка у дослідної групи Д1 збільшилася на 11%, у дослідної групи Д2 – на 25% та у дослідної групи Д3 – на 54%, відповідно (табл. 4).

Протеїнсинтезувальна та дезінтоксикаційна функції печінки в тварин дослідних груп суттєвих змін не зазнавали, а показники, що їх характеризують, мали тенденцію до незначного зростання. Так рівень загального протеїну в крові дослідної групи Д1 зріс на 4%, а концентрація сечовини – на 1% відносно контролю. Лише у дослідної групи Д3 встановлено пригнічення протеїнсинтезувальної та дезінтоксикаційної функції печінки, на що вказує зниження рівня загального білку до 61,32 $\pm$ 4,02 г/л проти 66,65 $\pm$ 2,70 г/л у контролі та концентрації сечовини до 4,89 $\pm$ 0,47 ммоль/л проти 5,65 $\pm$ 0,20 ммоль/л у контролі.

При дослідженні протеїнових фракцій у крові щурів встановлено, що рівень альбумінів у крові тварин групи Д1 і Д2 зростав, тоді як групи Д3 знижувався. Рівень глобулінів у крові щурів групи Д1, яким вводили препарат “Бендамін” у терапевтичній дозі, знизився на 5%, тоді як у крові щурів дослідних груп Д2 і Д3 рівень глобулінів зріс на 4 і 5% відносно показників контрольної групи.

Таблиця 5. Маса тіла та коефіцієнти маси окремих внутрішніх органів щурів на 30-ту добу досліді за вивчення хронічної токсичності препарату “Бендамін” ($M \pm m$, $n = 6$)

Показники	Групи тварин			
	К (контроль)	Д1	Д2	Д3
Маса тіла, г	191,11 $\pm$ 1,25	194,9 $\pm$ 4,12	192,5 $\pm$ 5,15	180,9 $\pm$ 2,48**
Печінка	36,2 $\pm$ 1,70	36,5 $\pm$ 2,32	37,0 $\pm$ 1,44	43,9 $\pm$ 2,10*
Нирка права	3,11 $\pm$ 0,23	3,29 $\pm$ 0,12	3,17 $\pm$ 0,33	3,01 $\pm$ 0,13
Нирка ліва	3,14 $\pm$ 0,18	3,35 $\pm$ 0,06	3,24 $\pm$ 0,40	3,08 $\pm$ 0,13
Селезінка	3,85 $\pm$ 0,32	3,88 $\pm$ 0,14	3,94 $\pm$ 0,56	4,22 $\pm$ 0,47*
Серце	4,52 $\pm$ 0,39	4,54 $\pm$ 0,35	4,31 $\pm$ 0,72	3,94 $\pm$ 0,21
Легені	10,02 $\pm$ 1,56	9,90 $\pm$ 1,05	9,27 $\pm$ 0,91	9,50 $\pm$ 0,75

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,025$ відносно контролю.

Таблиця 6. Результати проведення функціональних проб ($M \pm m$, $n = 20$)

Група тварин	Гексеналова проба Середній час сну, хв.	Проба з плаванням Середній час плавання, хв.
контрольна	$28,7 \pm 1,66$	$12,58 \pm 1,45$
Д1	$32,3 \pm 1,58$	$9,01 \pm 1,32$
Д2	$30,7 \pm 0,65$	$11,69 \pm 1,72$
Д3	$29,4 \pm 1,88$	$12,87 \pm 1,57$

Вірогідне зростання у сироватці крові щурів дослідної групи Д3 рівня креатиніну $86,6 \pm 3,14$ мкмоль/л ($p < 0,001$) і зниження концентрації сечовини до $4,89 \pm 0,47$ ммоль/л на 20,5% вказує на наявні системні порушення в роботі не тільки печінки, а також і нирок.

Одним із інтегральних показників, що відображають рівень метаболічних процесів у організмі тварин за їх інтоксикації є зміна маси тіла та окремих внутрішніх органів. Саме тому важливим за вивчення хронічної токсичності препарату “Бендамін” є визначення маси тіла та коефіцієнтів маси окремих внутрішніх органів. Встановлено, що при введенні препарату в 10-ти кратній дозі, сприяло зменшенню маси тіла білих щурів на 5%, порівняно з контрольною групою. При цьому нами відзначено, що у щурів групи Д1 і Д2 маса тіла мала тенденцію до незначного зростання (табл. 5).

При дослідженні відносних вагових коефіцієнтів маси внутрішніх органів встановлено, що введення препарату “Бендамін” у 10-ти кратній дозі привело до достовірної зміни відносної маси печінки, селезінки, ($43,9 \pm 2,10$; $4,22 \pm 0,47$) проти відповідних контрольних значень ($36,2 \pm 1,70$; $3,85 \pm 0,32$).

Препарат “Бендамін” у терапевтичній та 5-ти кратній дозах сприяв незначному збільшенню вагового коефіцієнту нирок, тоді як при введенні препарату у значно більший дозі встановлено зменшення вагового коефіцієнту досліджуваних органів.

У 10-ти кратній дозі препарату по відношенню до терапевтичної, виявлено зниження вагового коефіцієнта серця дослідної групи Д3 на 12,8% відносно контрольної групи. Зниження маси легень відбувалося при введенні препарату у 5-ти та 10-ти кратних дозах по відношенню до терапевтичної відповідно до $9,27 \pm 0,91$ і $9,50 \pm 0,75$.

Відомо, що тривалість гексеналового сну в тварин залежить від здатності мікосомальних ензимів печінки шляхом глюкуронізації нейтралізувати гексенал (Gutyj et al., 2016; 2017). Зазвичай у клінічно здорових щурів, за нормального функціонального стану печінки, сон триває 25–30 хв. Тривалість сну тварин відраховували з моменту приймання ними бокового положення до перших спроб змінити його та виражали в хвилинах. Встановлено, що у щурів контрольної групи середній час сну становив $28,7 \pm 1,66$ хв. У щурів, яким вводили препарат “Бендамін” у терапевтичній дозі встановлено збільшення середнього часу за гексеналової проби на 23%. Також встановлено середній час плавання щурів даної дослідної групи $9,01 \pm 1,32$ хв, тоді як у контрольній групі середній час плавання становив $12,58 \pm 1,45$ хв (табл. 6).

Препарат “Бендамін” у 5-кратній і 10-кратній дозі не впливав на результати функціональних проб, на що вказує середній час сну у щурів Д3 і Д4 груп $30,7 \pm 0,65$ і $29,4 \pm 1,88$ хв і середній час плавання – $11,69 \pm 1,72$ і $12,87 \pm 1,57$ хв.

Обговорення

Патології серцево-судинної системи займають провідне місце серед хвороб незаразної етіології і є основною причиною смертності. Статистичні дані вказують про те, що хвороби сер-

ця виявляють у 5–10% пацієнтів, що поступили на прийом до лікаря. Встановлено ряд факторів ризику виникнення патології серцево-судинної системи, зокрема породну схильність: собаки дрібних і середніх порід схильні до розвитку набутих хвороб клапанів (хронічна хвороба клапанів, ендокардіоз), в той час як для собак великих порід характерний розвиток дилатаційної кардіоміопатії (ДКМ) і хвороб перикарду (Undhad et al., 2012; Varkholiak, 2016; Zhulikova, 2016).

Зважаючи на аналіз даних вітчизняних і зарубіжних дослідників розробка зручного у застосуванні та безпечного комплексного кардіологічного препарату, використання якого дозволить підвищити ефективність лікування тварин і широкого спектру серцево-судинних патологій є на часі та становить актуальність проведення досліджень для ветеринарної медицини.

Відповідно до постанови Департаменту ветеринарної медицини “Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин”, затверджених Головним управлінням ветеринарної медицини Мінсільгосппроду України від 16 грудня 1996 р., кожний новий препарат, що рекомендується для лікування тварин, повинен відповідати таким вимогам (Todoruk et al., 2018):

- новий препарат, у порівнянні з препаратом-аналогом, повинен проявляти вищу терапевтичну ефективність;
- він повинен бути не токсичним для тварин, яким його застосовують;
- препарат або його метаболіти не повинні впливати на санітарну якість та поживну цінність тваринницької продукції;
- у процесі виробництва та застосування препарат не повинен спричиняти шкоди для довкілля.

Метою визначення хронічної токсичності препарату “Бендамін” є виявлення шкідливої дії препарату у випадках його довготривалого введення в організм дослідних тварин.

Саме тому визначення хронічної токсичності препарату “Бендамін” проведено на білих щурах, як добре вивченому виді лабораторних тварин, що узгоджується з вимогами проведення доклінічних досліджень лікарських засобів згідно з “Доклінічним дослідженням ветеринарних лікарських засобів” та “Методическими указаниями по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов применяемых в ветеринарии”, з використанням шляху введення, який передбачається застосовувати в клінічній практиці ветеринарної медицини (Kotsiumbas et al., 2006).

Підсумовуючи результати клінічних, морфологічних і біохімічних показників крові, можна стверджувати, що введення піддослідним тваринам препарату “Бендамін” у терапевтичній і 5-и кратній дозах протягом 30 діб не викликає видимих клінічних ознак інтоксикації, а досліджувані гематологічні та біохімічні показники не виходять за межі показників тварин контрольної групи.

При дослідженні відносних вагових коефіцієнтів маси внутрішніх органів встановлено, що введення препарату “Бендамін” у 10-ти кратній дозі привело до достовірної зміни відносної маси печінки, селезінки. У терапевтичній і 5-ти кратній дозах препарат сприяв незначному збільшенню вагового коефіцієнту нирок, тоді як при введенні препарату у значно більший

дозі встановлено зменшення вагового коефіцієнту нирок.

Препарат “Бендамін” після введення в 5-кратній і 10-кратній дозі протягом 30 діб суттєво не впливає на функціональний стан внутрішніх органів дослідних тварин.

Висновки

Протягом періоду досліджень із визначення хронічної токсичності препарату “Бендамін” вірогідних змін у поведінці дослідних тварин не відмічено, а 10-ти кратна доза препарату викликає незначне пригнічення стану організму щурів.

За введення тваринам 10-ти кратної дози препарату “Бендамін”, встановлено пригнічення протеїнсинтезувальної, дезінтоксикаційної функції печінки та підвищення активності амінотрансфераз у крові, що вказує на порушення функціонального стану печінки.

10-ти кратна доза препарату приводить до достовірної зміни відносної маси печінки, селезінки; терапевтична та 5-ти кратна доза сприяє незначному збільшенню вагових коефіцієнтів внутрішніх органів. Зниження маси легень відбувалося при введенні препарату у 5-ти та 10-ти кратних дозах.

References

- Brett, J., Wylie, C., & Brown, J. (2019). A case of significant hypotension following a human ingestion of veterinary pimobendan. *Clinical Toxicology*, 1–2.
- Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., & Vavrysevich, Y. (2017). Research on acute and chronic toxicity of the experimental drug Amprolinsyl. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 41–45.
- Gutyj, B., Paska, M., Levkivska, N., Pelenyo, R., Nazaruk, N., & Guta, Z. (2016). Study of acute and chronic toxicity of “Injectable Mevesel” nvestigational drug. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*, 6(2), 174–180.
- Kotsiumbas, I. Ia., Malyk, O. H., & Patereha, I. P. (2006). *Doklinichni doslidzhennia veterynarnykh likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of veterinary medicinal products]. Lviv, Triada plus (in Ukrainian).
- Malanin, L. P., Morozov, A. P., & Selivanova, A. S. (1988). *Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu toksicheskikh svoystv preparatov, primenyaemykh v veterinarii i zhivotnovodstve*. Veterinarnye preparaty: Spravochnik [Guidelines for the determination of toxic properties of drugs used in veterinary medicine and animal husbandry. Veterinary drugs. Directory]. Moscow, Agropromizdat (in Russian).
- Oldach, M. S., Ueda, Y., Ontiveros, E. S., Fousse, S. L., Harris, S. P., & Stern, J. A. (2019). Cardiac effects of a single dose of pimobendan in cats with hypertrophic cardiomyopathy; A randomized, placebo-controlled, crossover study. *Frontiers in Veterinary Science*, 6.
- Rozin, D. G. (1964). Sovremennaya ocenka toksichnosti hlorproizvodnykh uglerodov zhirnogo rjada po geksenalovomu testu na belyh myshah [Modern toxicity assessment of chlorine derivatives of fatty carbons on the hexenal test in white mice]. *Farmakologiya i Toksikologiya*, 5, 613–614 (in Russian).
- Rylova, M. L. (1964). *Metody issledovaniya hronicheskogo dejstviya vrednykh faktorov sredy v jeksperimente* [Methods for studying the chronic effects of harmful environmental factors in the experiment]. Leningrad. (in Russian).
- Tjostheim, S. S., Kelliham, H. B., Grint, K. A., & Stepien, R. L. (2019). Effect of sildenafil and pimobendan on intracardiac heartworm infections in four dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 23, 96–103.
- Todoriuk, V. B., Hunchak, V. M., Gutyj, B. V., Gufriy, D. F., Hariv, I. I., Khomyk, R. I., & Vasiv, R. O. (2018). Preclinical research of the experimental preparation “Ferosel T.” *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 1(1), 3–9.
- Undhad, V., Fefar, D., Jivani, B., Gupta, H., Ghodasara, D., Joshi, B., & Prajapati, K. (2012). Cardiac troponin: an emerging cardiac biomarker in animal health. *Veterinary World*, 5(8), 508.
- Varkholiak, I. S. (2016). The usage of medicines at the cardiovascular pathologies in dogs and cats. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 18, 3(71), 261–265.
- Varkholiak, I. S., & Gutyj, B. V. (2018). Determination of acute toxicity of “Bendamin” drug in laboratory animals. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(92), 209–212.
- Vlizlo, V. V., Fedoruk, R. S., & Ratych, I. B. (2012). *Laboratorni metody doslidzhen u biolohii, tvarynnystvi ta veterynarii medytsyni : dovidnyk* [Laboratory methods of research in biology, livestock and veterinary medicine: directory]. Lviv, Spolom (in Ukrainian).
- Yata, M., Kooistra, H. S., & Beijerink, N. J. (2019). Cardioresenal and endocrine effects of synthetic canine BNP1-32 in dogs with compensated congestive heart failure caused by myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 462–470.
- Zhulikova, O. A. (2016). Monitoring of cats and dogs cardiovascular diseases incidence in Blagoveschensk, Amur region. *Dal'nevostochnyj Argrarnyj Vesnik*, 2(38), 49–56 (in Russian).