

Научная статья

УДК 619:615.015.3:615.28:636.028

doi: 10.34655/bgsha. 2024.77.4.005

Определение максимально переносимой дозы кормовой добавки ТЕОГРАН® Р при хроническом введении лабораторным животным

Анна Леонидовна Москвина

Пензенский государственный аграрный университет, Пенза, Россия

Moskvina.a.l@pgau.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7856-7857>

Аннотация. Проведены исследования по определению максимальной переносимой дозы новой кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р» на лабораторных животных. Действующим компонентом в данной кормовой добавке является тетраметилендиэтилентетрамин (ТМДЭ-ТА). Определение максимальной переносимой дозы осуществляли в рамках изучения канцерогенного действия новой кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р». В качестве тест-объектов использовались аутбредные крысы Вистар в возрасте 8-10 недель и исходной массой тела 190-230 г. Всего было задействовано 24 животных, из которых сформировали 3 опытные и одну контрольную группу. Каждая группа состояла из равного количества самок и самцов. Исследуемые образцы вводили животным внутривентрикулярно, болюсно, при помощи пищеводно-желудочных катетеров. Введение болюсов производили однократное, пять дней подряд, с перерывом в два дня, на протяжении 90 дней. Дозировка исследуемой кормовой добавки составляла 800,0 мг/кг живой массы для особей первой опытной группы, 400,0 мг/кг – для второй опытной, 200,0 мг/кг – для третьей опытной группы. Контрольные особи получали дистиллированную воду. В ходе исследования животных взвешивали в начале, на 45-й день и в конце исследования. В конце исследования был произведен забор крови для проведения общего клинического и биохимического анализа крови. За время эксперимента отсутствовал падеж животных всех групп, задействованных в опыте. Средняя живая масса особей третьей опытной группы была на 10,8 % ниже, чем у животных контрольной группы, отличия в средней массе тела первой и второй опытных групп носили недостоверный характер. Также в крови особей данной группы выявлен умеренный лейкоцитоз, главным образом, за счёт гранулоцитов. Таким образом, максимальная переносимая доза кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р» для крыс при длительном внутривентрикулярном введении составляет 400 мг/кг.

Ключевые слова: лабораторные животные, тетраметилендиэтилентетрамин, канцерогенное действие, доклинические исследования, токсичность.

Original article

Determination of the maximum tolerable dose of the feed additive TEOGRAN® R during chronic administration to laboratory animals

Anna L. Moskvina

Penza State Agrarian University, Penza, Russian Federation

Moskvina.a.l@pgau.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7856-7857>

Abstract. Studies were conducted to determine the maximum tolerated dose of a new feed additive “TEOGRAN® R” on laboratory animals. The active ingredient in this feed additive is tetramethylenediethylenetetramine (TMDETA). The determination of the maximum tolerated dose was carried out as a part of the study of the carcinogenic effect of the new feed additive “TEOGRAN® R”. Outbred Wistar rats aged 8-10 weeks with initial body weight of 190-230 g were used as test objects. In total 24 animals were involved, out of which 3 experimental and 1 control groups were formed. Each group included an equal number of females and males. The studied samples were administered to the animals intragastrically, as a bolus, using esophageal-gastric catheters. Boluses were administered once, five days in a row, with a break of two days, for 90 days. The dosage of the studied feed additive was 800.0 mg/kg of live weight for individuals of the first experimental group, 400.0 mg/kg for the second experimental group, 200.0 mg/kg for the third experimental group. Control individuals were administered with distilled water. During the study, animals were weighed at the start of the study, on the 45th day, and at the end of the study. At the end of the study, blood was drawn for a general clinical and biochemical blood test. During the experiment, there was no mortality of animals of all groups participated in the experiment. The average live weight of individuals in the third experimental group was 10.8% lower than that of animals in the control group; the differences in the average body weight of the first and second experimental groups were not significant. Also, moderate leukocytosis was detected in the blood of individuals of this group, mainly due to granulocytes. Thus, the maximum tolerated dose of the feed additive “TEOGRAN® R” for rats with long-term intragastric administration is 400 mg/kg.

Keywords: laboratory animals, tetramethylenediethylenetetramine, carcinogenic effect, preclinical studies, toxicity

Введение. Современные требования по регистрации кормовых добавок с новыми активными веществами в составе предусматривают целый спектр предварительных научных исследований. Данные исследования особенно важны для тех целевых видов, которые после поступают в пищу людям или же из них производят продукты, используемые человеком в пищу [1]. Одним из таких исследований является исследование по изучению канцерогенных свойств. Одним из ключевых факторов планирования таких исследований является определение максимальной переносимой дозы (МПД). Традиционно для определения МПД принято опираться на значения, полученные в результате исследований токсичности продолжительностью в три месяца [2-7].

Контаминация кормов и кормового

сырья патогенной микрофлорой может служить причиной вспышек различных заболеваний, тем самым нанося значительный экономический ущерб птицеводческим хозяйствам. Для обеззараживания кормов и кормового сырья используют различные методы, одним из перспективных является применение различных веществ, обладающих антимикробной активностью [8-9]. Примером является кормовая добавка «ТЕОГРАН® Р», разработанная ООО БИОФАРМ. Это жидкая кормовая добавка, активным действующим веществом которой является тетраметилэтилендиэтиленetetрамин (ТМДЭТА), в концентрации 35-45%. Растворы ТМДЭТА обладают противовирусным, антибактериальным, а также фунгицидным действием, воздействуя в том числе и на устойчивые к воздействию дезинфектантов микроор-

ганизмы. Применение ТМДЭТА в помещениях с животными и людьми также является безопасным. Данный дезинфектант не является агрессивным по отношению к лакокрасочным и деревянным поверхностям, а также обладает антикоррозийным эффектом [10-11]. На обработанной поверхности образует микропленку, тем самым обеспечивая защиту от повторной контаминации на срок не менее 11 месяцев.

Цель исследования – установление максимальной переносимой дозы (МПД) кормовой добавки с активным действующим компонентом ТМДЭТА на лабораторных животных при хроническом введении.

Материалы и методы. В качестве биологической модели использовались крысы Вистар. Всего в опыте было задействовано 24 особи с равным количеством самцов и самок. Возраст животных на начало исследований составлял 8-10 недель, исходная масса тела – 190-230 г.

Перед началом исследований животные были подвергнуты карантину продолжительностью две недели. В первый день исследования была произведена рандомизация лабораторных животных, из которых сформировали группы: 3 опытные и 1 контрольная группа, по 6 животных в каждой с равным количеством самок и самцов. Взвешивание животных проводили в 1-й, 45-й и 91-й день эксперимента.

Исследуемую кормовую добавку задавали животным внутривентрикулярно в виде болюсов, индивидуально однократно, пять дней подряд, с перерывом в два дня, на протяжении 90 дней. Особи 1-й опытной группы получали добавку в составе болюса в дозе 800,0 мг/кг МТ, 2-й опытной – 400,0 мг/кг МТ, 3-й опытной группы – 200,0 мг/кг. Дозу кормовой добавки разводили в дистиллированной воде с температурой 38°C, в дозе 1 мл/100 г массы тела животного. Контрольные особи получали аналогичный объем дистиллированной воды в болюсе [12].

На протяжении всего эксперимента ежедневно проводили клинический осмотр животных, задействованных в опыте. Токсическое действие кормовой до-

бавки «ТЕОГРАН® Р» при ее длительном применении оценивали по следующим параметрам: число павших животных и сроки гибели; клиническое состояние животных; наличие/отсутствие признаков интоксикации (наличие и характер судорог, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частота и глубина дыхательных движений); поведенческие реакции; влияние кормовой добавки на общие показатели крови и биохимический состав сыворотки крови [13-15].

После завершения эксперимента у всех животных из каждой группы был проведен отбор проб крови для клинических и биохимических исследований. Кровь отбирали путём пункции из полости сердца.

Результаты исследований и обсуждение. В результате клинических исследований установлено, что у контрольных животных после введения дистиллированной воды наблюдались вялость и легкое угнетение, которые проходили через 25-45 мин. Состояние животных второй и третьей опытных групп было схожим с особями контрольной группы, стабилизация состояния наступала через 30-60 минут после введения, также наблюдались нарушения координации. Других значимых нарушений общего состояния и поведения контрольных животных отмечено не было. Данная реакция связана со стрессом на принудительное введение кормовой добавки.

Отличия состояния животных первой опытной группы от контрольных особей было более выражено. Ведение кормовой добавки в дозировке 800 мг/кг вызвала учащение дыхания, угнетение, нарушение координации движения. Состояние животных нормализовалось в течение 45-80 мин после введения. Данная реакция связана как со стрессом на принудительное введение кормовой добавки, так и с её воздействием на организм.

При ежедневном клиническом осмотре животных второй, третьей опытных и контрольной групп не выявляли внешних признаков токсикоза и гибели крыс в течение всего периода эксперимента. Шерстный покров был чистым и блестящим.

Животные охотно потребляли корм и воду; отсутствовало возбуждение или угнетение, мышечные подергивания, тремор, парезы, выделения из носа, глаз, ротовой полости или иные признаки интоксикации.

При ежедневном клиническом осмотре животных первой опытной группы не выявляли гибели крыс в течение всего периода эксперимента. Из внешних признаков токсикоза у животных данной группы отмечалось снижение потребления

корма и повышенная жажда. Шерстный покров к концу исследования был тусклым. Возбуждение или угнетение, мышечные подергивания, тремор, парезы, выделения из носа, глаз, ротовой полости и иные признаки интоксикации у животных отсутствовали.

Показатели массы тела животных, задействованных в опыте, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Динамика массы тела у крыс при применении кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р» в течение 90 дней

Период	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Опытная группа 3	Контрольная группа
В начале исследования, г	210,50±16,38	211,50±12,24	212,50±14,46	211,67±14,31
Через 45 дней, г	230,17±10,67	250,50±17,33	248,33±15,77	251,17±16,12
Через 90 дней, г	256,83±17,30	280,33±21,90	291,00±18,90	284,67±24,07

Как свидетельствуют данные таблицы 1, средняя живая масса животных второй и третьей опытных групп незначительно отличалась от средней массы контрольных особей. Разница с контролем составила: вторая опытная группа, в среднем, меньше на 1,5 %, третья опытная, в среднем, больше на 2,2 %. Средняя живая масса особей третьей опытной группы была на 10,8 % ниже, чем живот-

ные контрольной группы.

Для дополнительной оценки возможного негативного влияния ежедневного потребления исследуемой кормовой добавки были проанализированы результаты клинических и биохимических исследований крови животных, задействованных в эксперименте. Результаты клинических исследований крови приведены в таблице 2, биохимических – в таблице 3.

Таблица 2 – Клинические показатели крови у животных контрольной и опытных групп после 90-дневного курса применения кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р»

Показатели	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Опытная группа 3	Контрольная группа
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	12,43±2,37	9,88±1,56	9,25±1,97	9,27±2,62
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	8,25±2,13	6,87±1,13	6,22±1,16	6,46±2,05
Агранулоциты, 10 ⁹ /л	0,31±0,03	0,32±0,10	0,27±0,12	0,27±0,08
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	3,87±0,26	2,69±0,41	2,77±0,83	2,55±0,64
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,01±0,17	6,71±0,42	6,71±0,42	6,67±0,73
Гемоглобин, г/л	132,00±6,87	135,67±18,42	135,67±18,42	137,17±10,19
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	495,83±85,26	717,33±134,61	717,33±134,61	684,50±58,49
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	3,23±0,53	2,74±0,36	2,74±0,36	2,98±0,38

Таблица 3 – Биохимические показатели крови у животных контрольной и опытных групп после 90-дневного курса применения кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р»

Показатели	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Опытная группа 3	Контрольная группа
Общий белок, г/л	58,90±4,52	64,27±5,43	67,14±4,22	65,09±5,92
Альбумины г/л	37,24±2,40	42,44±3,79	44,08±2,67	43,14±2,75
Глюкоза, ммоль/л	5,34±1,39	4,84±1,55	5,23±1,26	5,13±1,22
Аланинаминотрансфераза, ед/л	138,00±17,06	84,17±30,50	76,17±37,10	81,33±31,92
Аспартатаминотрансфераза, ед/л	95,50±24,55	74,67±14,43	68,67±17,92	64,83±11,13
Щелочная фосфатаза, ед/л	439,00±49,82	243,17±100,57	216,50±129,02	228,00±96,31
Холестерин, ммоль/л	2,50±0,58	2,17±0,82	2,28±0,81	2,21±1,02
Общий билирубин, мкмоль/л	6,71±0,53	5,35±0,67	5,52±0,89	5,49±0,54
Кальций, ммоль/л	2,41±0,08	2,73±0,37	2,86±0,30	2,82±0,37
Фосфор, ммоль/л	1,19±0,38	1,46±0,65	1,55±0,41	1,52±0,55

Анализ результатов клинических исследований крови показал, что введение кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р» в дозировке 200 и 400 мг/кг на протяжении 90-дневного периода не оказывает негативного воздействия на систему крови. Значимых различий между гематологическими показателями животных второй и третьей опытных групп (эритроциты, гемоглобин, лейкоциты, тромбоциты) относительно таковых у животных контрольной группы не зарегистрировано.

В крови животных, получавших кормовую добавку «ТЕОГРАН® Р» в дозировке 800 мг/кг, умеренный лейкоцитоз. Повышение количества лейкоцитов произошло, главным образом, за счёт гранулоцитов, к данной фракции относятся нейтрофилы, эозинофилы и базофилы. Повышение концентрации эозинофилов и базофилов является индикатором развития аллергических реакций. Содержание тромбоцитов, эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови животных данной группы находилось в пределах физиологической нормы, но было достоверно ниже показателей контроля, что свидетельствует о негативных последствиях длительного

применения кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р» в дозировке 800 мг/кг.

Все исследуемые биохимические показатели крови контрольных животных и животных второй и третьей опытных групп находились в пределах физиологической нормы, таблица 3. У отдельных животных первой опытной группы выявляли отклонения от физиологической нормы части показателей: снижение содержания альбумина и повышение активности аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы. Средние значения содержания альбумина и общего билирубина, а также активности АЛТ и ЩФ, в первой опытной группе достоверно отличались от показателей контрольных животных, что свидетельствует о нарушении функционирования печени у животных, получавших кормовую добавку «ТЕОГРАН® Р» в дозировке 800 мг/кг на протяжении 90 дней.

Заключение. Исследованиями установлено, что максимальная переносимая доза для крыс при длительном внутрижелудочном введении кормовой добавки «ТЕОГРАН® Р» составляет 400 мг/кг массы тела.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Явников Н.В. Эффективная дезинфекция // *Аграрная наука*. 2020. № 1. С. 40-42. EDN: NQAMXO. doi: 10.32634/0869-8155-2020-334-1-40-42.
2. The Maximum-Tolerated Dose and Pharmacokinetics of a Novel Chemically Modified Curcumin in Rats / H.D. Bhatt [et al.] // *J Exp Pharmacol*. 2022. Feb 9;14: 73-85. doi: 10.2147/JEP.S341927.
3. Биоэтические и экономические аспекты в основе выбора метода изучения токсичности лекарственных средств при однократном введении / О.И. Авдеева, М.Н. Макарова, А.В. Калатанова, М.А. Ковалева // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018. № 1. С. 4-11. EDN: XVYDXV. doi: 10.29296/2618723X-2018-01-01.
4. Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д. Выбор высокой дозы для изучения общетоксического действия новых лекарственных средств // *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023. Т. 11, № 2. С. 145-154. EDN: CZIHAG. doi: 10.30895/2312-7821-2023-11-2-145-154.
5. Acute liver failure induced by thioacetamide: selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats / E. Kobilhová, I. Mrázová, Z. Verneřová, M. Ryska // *Physiol Res*. 2014; 63(4): 491-503. Epub 2014 Apr 3. doi: 10.33549/physiolres.932690.
6. Hodgson E. *A Textbook of Modern Toxicology*. Third Edition. Hoboken, New Jersey: A John Wiley & Sons, inc., 2004. 582 p.
7. Preclinical Research: A Rise or Dawn / Manjunath Sadananda R., Subramani B. // *Pharmacy & Pharmacology International Journal*. 2018;6(1). doi: 10.15406/ppij.2018.06.00147.
8. Повышение экологической устойчивости животноводческих объектов / Р.В. Шкрабак, Е.И. Гаврикова, П.И. Косарев [и др.] // *Безопасность жизнедеятельности*. 2023. № 9 (273). С. 39-45. EDN: RZEQCW.
9. Microbial contamination of poultry feed and the effects on birds' performance / A.C. Mgbeahuruike [et al.] // *Anim. Res. Int*. 2023. 20(1):4834-4861. URL: <https://www.ajol.info/index.php/ari/article/view/247059/233686>
10. Yu J., Baek S.W., Cho S.J. Experimental Study on Decomposition and Evaporation Characteristics of N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine and 1,2,4-Triazole // *Energies*. 2019. 12. 3208. doi: 10.3390/en12173208
11. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 66123, 1,3,6,8-Tetraazatricyclo [4.4.1.13,8] dodecane. Accessed July 21, 2024. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66123>
12. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е.В. Шекунцова, М.А. Ковалева, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2020. Т. 10. № 1. С. 19-28. EDN: KVZBBV. doi: 10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28.
13. Age-related changes in hematological and biochemical profiles of Wistar rats / S. Patel [et al.] // *Lab Anim Res*. 2024;Feb26;40(1):7. doi: 10.1186/s42826-024-00194-7 .
14. Age-Related Individual Behavioural Characteristics of Adult Wistar Rats / S.K. Sudakov, E.V. Alekseeva, G.A. Nazarova, V.G. Bashkatova // *Animals (Basel)*. 2021. Aug 2;11(8):2282. doi: 10.3390/ani11082282 .
15. Organ and body weights changes in female wistar rats exposed to different stressors / Nwogueze B.C., Ojeh A.E., Aloamaka C.P., Igweh J.C., Onyesom I. // *Nigerian journal of science and environment*. 2022. 18 (1). URL: <https://www.njse.org.ng/user/approved/Organ%20and%20body%20weights.pdf>

References

1. Yavnikov N.V. Effective disinfection. *Agrarian science*. 2020;1:40-42 (In Russ.). doi: 10.32634/0869-8155-2020-334-1-40-42
2. Bhatt H.D. [et al.] The Maximum-Tolerated Dose and Pharmacokinetics of a Novel Chemically Modified Curcumin in Rats. *J Exp Pharmacol*. 2022;Feb 9;14: 73-85. doi: 10.2147/JEP.S341927.
3. Avdeeva O.I., Makarova M.N., Kalatanova A.V., Kovaleva M.A. Bioethical And Economic Aspects In The Basis Of A Choice Of A Method Of Studying Of Toxicity Of Medical Products At Single Introduction. *Laboratory Animals for Science*. 2018;1:4-11 (In Russ.). doi: 10.29296/2618723X-2018-01-01
4. Engalycheva G.N., Subaev R.D. High Dose Selection for General Toxicity Studies of New Medicines. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):145-154 (In Russ.) doi: 10.30895/2312-7821-2023-11-2-145-154.
5. Kobilhová E., Mrázová I., Verneřová Z., Ryska M. Acute liver failure induced by thioacetamide: selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats. *Physiol Res*. 2014;63(4):491-503. Epub. 2014. Apr. 3. doi: 10.33549/physiolres.932690.
6. Hodgson E. *A Textbook of Modern Toxicology*. Third Edition. Hoboken, New Jersey: A John Wiley & Sons, inc., 2004. 582 p.
7. Manjunath Sadananda R., Subramani B. Preclinical Research: A Rise or Dawn. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*. 2018;6(1). doi: 10.15406/ppij.2018.06.00147.
8. Shkrabak R.V., Gavrikova E.I., Kosarev P.I. et al. Increasing the environmental sustainability of livestock facilities. *Bezopasnost zhiznedeatelnosti*. 2023;9(273);39-45 (In Russ.)

9. Mgbeahuruike A.C. [et al.] Microbial contamination of poultry feed and the effects on birds' performance. *Anim. Res. Int.* 2023;20(1):4834-4861. URL: <https://www.ajol.info/index.php/ari/article/view/247059/233686>
10. Yu J., Baek S.W., Cho S.J. Experimental Study on Decomposition and Evaporation Characteristics of N,N,N2,N2-Tetramethylethylenediamine and 1,2,4-Triazole. *Energies*. 2019;12:3208. doi: 10.3390/en12173208
11. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 66123, 1,3,6,8-Tetraazatricyclo [4.4.1.13,8] dodecane. Accessed July 21, 2024. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66123>.
12. Shekunova E.V., Kovaleva M.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Dose selection in preclinical studies: cross-species dose conversion. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(1):19-28 (In Russ.). doi: 10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28.
13. Patel S. [et al.] Age-related changes in hematological and biochemical profiles of Wistar rats. *Lab Anim Res*. 2024;Feb26;40(1):7. doi: 10.1186/s42826-024-00194-7 .
14. Sudakov S.K. [et al.] Age-Related Individual Behavioural Characteristics of Adult Wistar Rats. *Animals (Basel)*. 2021;Aug2;11(8): 2282. doi: 10.3390/ani11082282 .
15. Nwoguzie B.C., Ojeh A.E., Aloamaka C.P., Igweh J.C., Onyesom I. Organ and body weights changes in female wistar rats exposed to different stressors. *Nigerian journal of science and environment*. 2022;18(1). URL: <https://www.njse.org.ng/user/approved/Organ%20and%20body%20weights.pdf>

Информация об авторах

Анна Леонидовна Москвина – аспирант, кафедра ветеринарии.

Information about the authors

Anna L. Moskvina – Post-graduate student, Chair of Veterinary Science.

Статья поступила в редакцию 05.08.2024; одобрена после рецензирования 20.09.2024; принята к публикации 24.10.2024.

The article was submitted 05.08.2024; approved after reviewing 20.09.2024; accepted for publication 24.10.2024.