

УДК 616:615.33:636.028

DOI 10.48612/vch/hpvg-5rre-ghf9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА**А. С. Порфирьев¹⁾, Р. Н. Файзрахманов¹⁾, В. Г. Софронов¹⁾, Н. И. Данилова¹⁾, И. А. Хусаинов²⁾,
Е. Л. Кузнецова¹⁾**¹⁾Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана
420029, Казань, Российская Федерация²⁾Казанский государственный научно-исследовательский университет
420015, Казань, Российская Федерация

Аннотация. Эксперименты проводили в стандартных условиях вивария кафедры технологии животноводства и зоогигиены ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ на белых крысах линии Wistar, кормление и содержание которых соответствовало зоогигиеническим нормативам. Опыты проводили на 12 самках и 12 самцах живой массой 180-190 граммов, разделенных на 2 группы по 6 самцов и 6 самок в каждой, по принципу пар-аналогов. Первая группа – опыт, в которой крысам в течение 90 суток ежедневно вводили испытуемый препарат в дозе 5 мл, во второй группе – контроль, в которой препарат заменяли на дистиллированную воду в эквивалентном количестве. Испытуемый пробиотический препарат создан на основе микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, способные затормаживать рост патогенной микрофлоры. В начале и конце опыта животных взвешивали на электронных весах Massa K, брали кровь для морфо-биохимического анализа, а на 91-е сутки проводили вскрытие для макроскопического анализа внутренних органов. В процессе исследования субхронической токсичности явных признаков интоксикации и гибели лабораторных животных зарегистрировано не было. В течение всего периода опыта клиническое состояние белых крыс в обеих группах было идентично по внешнему виду, потреблению воды и корма, массы тела животных. В крови опытных крыс по сравнению с контрольными животными установлено более высокое содержание эритроцитов на 15% и на 6% гемоглобина. Лейкоциты, тромбоциты, общий белок, альбумины и глобулины в обеих группах соответствовали физиологической норме. Внутренние органы грудной и брюшной полостей в опытных и контрольных группах не имели видимых изменений.

Ключевые слова: субхроническая токсичность, белые линейные крысы, живая масса, новый пробиотический препарат, биобезопасность, экологическое чистое молоко, морфо-биохимические показатели крови, лактирующие коровы.

Введение. Агропромышленный комплекс Республики Татарстан не стоит на месте, все увереннее развивается. С каждым годом увеличивается поголовье крупного рогатого скота и повышается молочная продуктивность животных [2]. Улучшение всех показателей продуктивности напрямую связано с соблюдением ветеринарно-санитарных правил, улучшением условий содержания и кормления лактирующих коров. Разработка и использование новых пробиотических культур направлено на повышение резистентности крупного рогатого скота, для предотвращения иммунодефицитного состояния и попадания в организм патогенных микроорганизмов [1]. В условиях хозяйств для повышения неспецифической резистентности применяют лекарственные препараты на основе полезных микроорганизмов, которые направлены на улучшение процессов метаболизма [3], [4], [5], [6]. Применение пробиотических препаратов в молочном скотоводстве и выявление их эффективности является актуальной задачей современного агропромышленного комплекса [7], [8]. В связи с тем, что в скотоводческих хозяйствах нередки случаи возникновения маститов у лактирующих коров, нами был разработан пробиотический препарат для профилактики субклинического мастита, используемый путем погружения соска вымени после доения в сосуд с испытуемым средством.

Цель исследования: определить субхроническую токсичность нового пробиотического препарата; экспериментально оценить влияние нового пробиотического препарата на клинические показатели, морфо-биохимический статус крови и состояние внутренних органов при длительном его применении на лабораторных животных.

Материалы и методы исследования. Новый пробиотический препарат представляет собой средство для обработки сосков вымени после доения с содержанием микроорганизмов рода *Bacillus* и гидрофобных компонентов. Биопрепарат предназначен для формирования защитной микрофлоры от развития патогенных и условно-патогенных микроорганизмов на поверхности сосков вымени для эффективной профилактики субклинического мастита. Препарат блокирует сосковый канал от попадания внутрь патогенной микрофлоры и восстанавливает поврежденные ткани сосков, что способствует повышению надоев и увеличивает срок эксплуатации животных – числа лактации.

Профилактический эффект достигается за счет колонизации обрабатываемых поверхностей культурами пробиотических микроорганизмов, которые снижают активность патогенной микрофлоры по принципу антагонизма, конкурируя за пищевую субстрат и среду обитания.

Эксперименты по выявлению субхронической токсичности были проведены на клинически здоровых белых крысах линии Wistar в течение 90 дней. Животные находились в условиях лаборатории кафедры

технологии животноводства и зооигиены ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ. Кормление осуществляли полноценным рационом. Исследуемый пробиотический препарат ежедневно вводили крысам опытной группы перорально в количестве до 5 мл, а крысам контрольной группы в аналогичном количестве препарат заменяли на дистиллированную воду. Опыты по выявлению степени повреждающего действия при длительном введении нового пробиотического препарата проводили на 12 самцах и 12 самках половозрелых белых крыс живой массой 180-190 граммов, разделенных на 2 группы методом пар-аналогов. В процессе и конце эксперимента, который длился 90 дней, осуществляли взвешивание подопытных крыс на электронных весах, оценивали общее клиническое состояние, отношение к воде и корму.

Проводились морфо-биохимические исследования крови с использованием гематологического и биохимического анализаторов. Кровь для морфологического исследования отбирали в одноразовые пробирки с антикоагулянтном (ЭДТА), а для биохимического анализа – в пробирки с активатором свертывания – кремнеземом.

Результаты исследований и их обсуждение. В течение 90 дней животные опытной группы вместе с основным рационом получали испытуемый новый пробиотический препарат в объеме 5 мл (дозе 5000 мг/кг живой массы), а контрольным животным вводили дистиллированную воду в аналогичных объемах. Результаты влияния пробиотического препарата на динамику массы тела крыс представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Изменение массы тела белых крыс при пероральном введении нового пробиотического препарата

Группа животных	Доза, мл	Живая масса, г		Абсолютный прирост живой массы, г	Среднесуточный прирост, г
		в начале опыта	в конце опыта		
Контроль	-	185,2±0,5	275,2±0,9	+90,0	1,0
Опыт	5	183,9±0,8	275,7±1,1	+91,8	1,0

Данные таблицы свидетельствуют о том, что у крыс, получавших испытуемое средство, достоверных отличий в массе тела по сравнению с контролем не наблюдается. Абсолютный и среднесуточный приросты живой массы тела контрольной и опытной групп были идентичными и находились на уровне физиологической нормы. В первые дни после введения препарата в дозе 5 мл у крыс наблюдались незначительные изменения в их клиническом статусе: некоторое угнетение, частичный отказ от корма, движения несколько замедлились. Спустя 3-е суток состояние крыс нормализовалось и не отличалось от контрольной группы. На 80-е сутки и до конца эксперимента у крыс опытной группы наблюдали аналогичные признаки недомогания, которые исчезали спустя 2-е суток по окончании эксперимента, то есть состояние опытных крыс было хорошим, поведенческие реакции и рефлексы сохранены.

На 91-е сутки из обеих групп были убиты по 5 крыс для дальнейшего проведения морфо-биохимических исследований крови, а также патологоанатомического изучения внутренних паренхиматозных органов. Результаты гематологических исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Морфо-биохимические показатели крови белых крыс при пероральном введении нового пробиотического препарата

Показатель	Ед. изм.	Группа животных			
		N	Контроль	N	Опыт
Эритроциты	10 ¹² /л	5	8,3±0,3	5	9,8±0,4*
Лейкоциты	10 ⁹ /л	5	7,9±0,2	5	7,7±0,5
Гемоглобин	г/л	5	175±0,5	5	187±1,4*
Тромбоциты	10 ⁹ /л	5	358±14,1	5	356±17,5
Общий белок	г/л	5	67,22±1,72	5	68,09±0,63
Альбумин	г/л	5	28,57±2,44	5	29,15±2,56
Глобулин	г/л	5	38,85±2,12	5	39,02±2,85

Примечание: (*) P≤0,05

Данные таблицы показывают, что в крови у крыс, получавших дополнительно с основным рационом новое пробиотическое средство, наблюдалось достоверное увеличение количества эритроцитов в сравнении с контролем на 15%. С повышением уровня эритроцитов в крови животных опытной группы возросло содержание гемоглобина на 6%, что указывает на улучшение физиологического состава крови. Гемоглобин играет ключевую роль, является «транспортным средством» – переносит кислород, обеспечивая энергией для жизни каждой биологической единицы живого организма. Результаты биохимических исследований сыворотки крови как опытных, получавших новое пробиотическое средство, так и контрольной группы, показали, что содержание общего белка, альбумина и глобулина находится в пределах физиологической нормы и достоверных различий не имеет.

Вскрытие лабораторных животных осуществляли, руководствуясь Европейской конвенцией о защите позвоночных животных. Убой подопытных крыс проводили с использованием ингаляционного анестетика – диэтилового эфира. После глубокого сна проводили рассечение кожи с подкожной клетчаткой по белой линии живота от ротоглотки до паха, где визуализируется грудная полость и органы брюшной полости. Анатомическим пинцетом осуществляли забор внутренних органов для детальной патологоанатомической аутопсии, оценивая размер, массу каждого органа, степень кровенаполнения и наличие патологических изменений. Макроскопическую оценку проводили в соответствии с общепринятыми методиками в условиях вивария, соблюдая правила асептики и антисептики. При внешнем осмотре внутренние органы обеих групп животных имели нормальный вид, отеков в подкожной клетчатке отмечено не было. Лимфатические узлы были без изменений, правильной формы, следов кровоизлияний не наблюдалось. Мышцы грудной и брюшной стенки имели правильную анатомическую структуру, следов кровяных сгустков отмечено не было. Органокomплекс системы дыхания был нормальной формы и занимал правильное положение. Следов крови, экссудата и трансудата замечено не было. Органы брюшной полости: желудок умеренно наполнен кормовой массой, слизистая блестящая, гладкая, без кровоизлияний. Желудок правильной формой и имеет правильную анатомическую топографию. Тонкий кишечник без видимых изменений следов воспаления, геморрагий не было. Толстый отдел кишечника занимал правильное анатомическое положение, также не было следов кровоизлияний и инородных предметов. Органы мочевыделительной системы были нормальной правильной формы, следов отеков, крови, рубцовой ткани отмечено не было.

Выводы. Изучено влияние нового пробиотического препарата на динамику массы тела, общее состояние, морфо-биохимические показатели крови лабораторных крыс обоих полов при 90-дневном пероральном введении в дозе 5 мл. В результате можно заключить, что при исследовании параметров токсичности препарата гибели среди подопытных животных не наблюдалось. Показатели массы тела в обеих группах достоверно не отличались между собой. Морфология и биохимия крови опытной группы показала достоверное увеличение количества эритроцитов и уровня гемоглобина, остальные параметры соответствовали физиологическим параметрам и были идентичны таковым у контрольных крыс. Весь комплекс систем органов не имел никаких патологических отклонений по сравнению с контролем. В целом, можно заключить, что длительное пероральное воздействие нового пробиотического препарата не оказывает токсического влияния на организм белых крыс.

Литература

1. Иванов, Н. Г. Пробиотики – в плане проведения ветеринарных мероприятий / Н. Г. Иванов, В. К. Тихонов, А. П. Никитина // Научно-образовательная среда как основа развития интеллектуального потенциала сельского хозяйства регионов России : материалы II Международной научно-практической конференции. – Чебоксары : Чувашский государственный аграрный университет, 2022. – С. 173-175.
2. Рекомендации по производству молока. Путь от теленка до коровы: монография / Р. А. Волков, Ф. К. Ахметзянова, Р. Н. Файзрахманов [и др.]. – Казань, 2022. – 366 с.
3. Руин, В. А. Альтернатива кормовым антибиотикам для коров молочной продуктивности / В. А. Руин, А. С. Панфилова. – Текст : электронный // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2022 – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/alternativa-kormovym-antibiotikam-dlya-korov-molochnoy-produktivnosti> (дата обращения : 15.05.2024).
4. Смирнова, Ю. М. Эффективность использования пробиотика «румит» в рационе дойных коров айрширской породы / Ю. М. Смирнова, А. В. Платонов, В. А. Котелевская. – Текст : электронный // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2023. – № 3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/effektivnost-ispolzovaniya-probiotika-rumit-v-ratsione-doynyh-korov-ayrshirskoy-porodu> (дата обращения : 15.04.2023).
5. Ученые нашли замену антибиотикам / Е. Йылдырым, Ю. Лаптев, Л. Ильина, Н. [и др.] // Комбикорма. – 2020. – № 11. – С. 73-77.
6. Функ, И. А. Подбор пробиотических микроорганизмов в состав нового биопрепарата для сельскохозяйственных животных / И. А. Функ // Новосибирский государственный аграрный университет. – Новосибирск : Вестник НГАУ, 2023. – С. 302-208.
7. Colombo E. A. et al. Performance, health, and physiological responses of newly received feedlot cattle supplemented with pre- and probiotic ingredients //Animal. 2021. Т. 15. - № 5. - С. 100-214.
8. Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity //Microbes and environments. 2015.-Т. 30. №. 2. С. 126-132.

Сведения об авторах

1. **Порфирьев Артур Сергеевич**, аспирант II года очной формы обучения кафедры технологии животноводства и зоогигиены, Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35, Республика Татарстан, Россия; e-mail: artur.por99@mail.ru, тел. +7-939-380-68-76.

2. **Файзрахманов Рамиль Наилевич**, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой технологии животноводства и зоогигиены, Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени

Н.Э. Баумана, 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35, Республика Татарстан, Россия; e-mail: gamil140679@mail.ru, тел. +7-927-420-02-14.

3. **Софронов Владимир Георгиевич**, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры технологии животноводства и зоогигиены, Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35, Республика Татарстан, Россия; e-mail: soogigienakgavm@yandex.ru, тел. +7-917-258-26-62.

4. **Данилова Надежда Ивановна**, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры технологии животноводства и зоогигиены, Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35, Республика Татарстан, Россия; e-mail: danai58@yandex.ru, тел. +7-919-621-75-48.

5. **Хусаинов Инназар Асхадович**, кандидат технических наук, доцент кафедры «Пищевой инженерии малых предприятий», Казанский национально-исследовательский университет, 420012, г. Казань, ул. Толстого, д. 8/31, Республика Татарстан, Россия; e-mail: fortes16@yandex.ru, тел. +7-999-155-64-57.

6. **Кузнецова Елена Леонидовна**, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры технологии животноводства и зоогигиены, Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35, Республика Татарстан, Россия; e-mail: karla69@mail.ru, тел. +7-917-248-42-97.

DETERMINATION OF THE SUBCHRONIC TOXICITY OF A NEW PROBIOTIC DRUG

**A. S. Porfiriev¹, R. N. Fayzrakhmanov¹, V. G. Sofronov¹, N. I. Danilov¹, I. A. Khusainov²,
E. L. Kuznetsova¹**

¹Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman
420029, Kazan, Russian Federation

²Kazan State Research University
420015, Kazan, Russian Federation

Abstract. The experiments were carried out in standard conditions of the vivarium of the Department of Animal Husbandry Technology and Animal Hygiene of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine on white rats of the Wistar line, the feeding and maintenance of which corresponded to zoohygienic standards. The experiments were carried out on 12 females and 12 males with a live weight of 180-190 grams, divided into 2 groups of 6 males and 6 females each, according to the principle of pairs of analogues. The first group was an experiment in which the test drug was administered daily to rats for 90 days in a dose of 5 ml, in the second group – a control in which the drug was replaced with distilled water in an equi-volumetric amount. The probiotic drug under test is based on the microorganisms *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, capable of inhibiting the growth of pathogenic microflora. At the beginning and end of the experiment, the animals were weighed on electronic scales Massa K, blood was taken for morpho-biochemical analysis, and on the 91st day an autopsy was performed for macroscopic analysis of internal organs. During the study of subchronic toxicity, there were no obvious signs of intoxication and death of laboratory animals. During the entire period of the experiment, the clinical condition of white rats in both groups was identical in appearance, water and feed intake, and animal body weight. In the blood of experimental rats, compared with control animals, a higher content of erythrocytes by 15% and hemoglobin by 6% was found. Leukocytes, platelets, total protein, albumins and globulins in both groups corresponded to the physiological norm. The internal organs of the thoracic and abdominal cavities in the experimental and control groups had no visible changes.

Keywords: subchronic toxicity, white linear rats, live weight, new probiotic drug, biosafety, ecological pure milk, morpho-biochemical blood parameters, lactating cows.

References

1. Ivanov, N. G. Probiotiki - v plane provedeniya veterinarnykh meropriyatij / N. G. Ivanov, V. K. Tihonov, A. P. Nikitin // Nauchno-obrazovatel'naya sreda kak osnova razvitiya intellektual'nogo potenciala sel'skogo hozyajstva regionov Rossii : materialy II Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii. – Cheboksary : Chuvashskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2022. – S. 173-175.
2. Rekomendacii po proizvodstvu moloka. Put' ot telenka do korovy: monografiya / R. A. Volkov, F. K. Ahmetzyanova, R. N. Fayzrahmanov [i dr.]. – Kazan', 2022. – 366 s.
3. Ruin, V. A. Al'ternativa kormovym antibiotikam dlya korov molochnoj produktivnosti / V. A. Ruin, A. S. Panfilova. – Tekst : elektronnyj // Vestnik Kurskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii, 2022 – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/alternativa-kormovym-antibiotikam-dlya-korov-molochnoj-produktivnosti> (data obrashcheniya : 15.05yu2024).
4. Smirnova, Yu. M. Effektivnost' ispol'zovaniya probiotika «rumit» v racione dojnyh korov ajrshirskoj porody / Yu. M. Smirnova, A. V. Platonov, V. A. Kotelevskaya. – Tekst : elektronnyj // Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka. – 2023. – № 3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/effektivnost-ispolzovaniya-probiotika-rumit-v-ratsione-dojnyh-korov-ajrshirskoj-porody> (data obrashcheniya : 15.04.2023).

5. Uchenye nashli zamenu antibiotikam / E. Jyldyrym, Yu. Laptev, L. Il'ina, N. [i dr.] // Kombikorma. – 2020. – № 11. – S. 73-77.
6. Funk, I. A. Podbor probioticheskikh mikroorganizmov v sostav novogo biopreparata dlya sel'skokozyajstvennykh zhivotnyh / I. A. Funk // Novosibirskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet. – Novosibirsk : Vestnik NGAU, 2023. – S. 302-208.
7. Colombo E. A. et al. Performance, health, and physiological responses of newly received feedlot cattle supplemented with pre- and probiotic ingredients //Animal. 2021. T. 15. - № 5. - P. 100-214.
8. Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity //Microbes and environments. 2015.- T. 30. №. 2. P. 126-132

Information about authors

1. **Porfiriev Artur Sergeevich**, postgraduate student of the II year of full-time study at the Department of Livestock Technology and Zoo Hygiene, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 420029, Kazan, Sibirsky Trakt str., 35, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: artur.por99@mail.ru, tel. +7-939-380-68-76.
2. **Fayzrakhmanov Ramil Nailevich**, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Animal Husbandry Technology and Zoo Hygiene, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 420029, Kazan, Sibirsky Trakt str., 35, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: ramil140679@mail.ru, tel. +7-927-420-02-14.
3. **Sofronov Vladimir Georgievich**, Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Animal Husbandry Technology and Zoo Hygiene, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 420029, Kazan, Sibirsky Trakt str., 35, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: soogigienakgavm@yandex.ru, tel. +7-917-258-26-62.
4. **Danilova Nadezhda Ivanovna**, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Animal Husbandry Technology and Zoo Hygiene, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 420029, Kazan, Sibirsky Trakt str., 35, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: danai58@yandex.ru, tel. +7-919-621-75-48.
5. **Khusainov Innazar Askhadovich**, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Food Engineering of Small Enterprises, Kazan National Research University, 420012, Kazan, Tolstogo str., 8/31, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: fortes16@yandex.ru, tel. +7-999-155-64-57.
6. **Kuznetsova Elena Leonidovna**, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Livestock Technology and Animal Hygiene, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 420029, Kazan, Sibirsky Trakt str., 35, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: karla69@mail.ru, tel. +7-917-248-42-97.