



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.
Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.
Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet11612
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 619:616.28:636.085:546

“Melaniavet” (ear drops). Study of acute and chronic dermal toxicity in laboratory rats

D. Datsiuk¹, V. Hunchak¹, M. Soltys¹, V. Martynyshyn^{2✉}, O. Lisnyak¹

¹Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

²ZVO “Lviv University of Business and Law”, Lviv, Ukraine

Article info

Received 16.09.2024

Received in revised form

16.10.2024

Accepted 17.10.2024

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.

ZVO “Lviv University of
Business and Law”,
Kulparkivska Str., 99, Lviv,
79021, Ukraine.
Tel.: +38-097-519-13-88
E-mail: doctorvettlviv@ukr.net

Datsiuk, D., Hunchak, V., Soltys, M., Martynyshyn, V., & Lisnyak, O. (2024). “Melaniavet” (ear drops). Study of acute and chronic dermal toxicity in laboratory rats. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 26(116), 83–89. doi: 10.32718/nvlvet11612

The acute (subacute) and chronic dermal toxicity of a multi-component agent (gentamicin sulfate, nystatin, ivermectin, dioxidine, dimexide, dexamethasone, lidocaine) with predicted pharmacological activity for external otitis in dogs was investigated. Preliminary studies on the physicochemical and pharmacological properties established that the “Melaniavet” (ear drops) preparation is a stable, miscible formulation for external use. It appears as a clear solution with a yellowish tint and does not separate with sediment formation over 12 months. High-performance liquid chromatography (HPLC) confirmed component compatibility within the preparation and the absence of interactions among individual ingredients when combined in solution. The acute toxicity of “Melaniavet” was evaluated via a single oral administration and dermal application in laboratory rats. The tested agent at a dose of 5000 mg/kg body weight (oral) and 2000 mg/kg (dermal) did not result in mortality or signs of clinical intoxication. The preparation's LD₅₀ is >5000 (2000) mg/kg body weight, classifying it as Class IV in toxicity (low-toxicity substances), category 5 (GHS). A 28-day study on dermal toxicity of the multi-component preparation showed no mortality or signs of intoxication in rats. Experimental animals remained active regardless of the dose administered, and their reflex response and excitability were comparable to those of the control group, which received water on the prepared skin area. Appetite in groups E₂ and E₃ (5x and 10x the optimal dose) was slightly suppressed, leading to a lower body weight than the control by 12.1 % (P < 0.05) and 13.3% (P < 0.05) at the end of the experiment. Prolonged dermal application of “Melaniavet” at the therapeutic dose (0.6 ml/kg body weight) did not produce significant changes in the weight coefficients of internal organs or indicators reflecting their morphological and biochemical status. However, administration at 5x and 10x the therapeutic dose (3 and 6 ml/kg body weight) increased the weight coefficients of the liver, spleen, heart, and kidneys. In the blood serum of group E₃ animals, there was a significant increase in ALT, AST, and AP activity, as well as urea and creatinine levels; the red and white blood cell counts and hemoglobin content showed a tendency to decrease. By the 42nd day, or two weeks after discontinuation of dermal application, experimental groups observed a gradual recovery of functional status.

Key words: Melaniavet, ear drops, laboratory rats, acute and dermal toxicity, blood morphology indicators, blood biochemistry indicators.

“Меланіявет” (вушні краплі). Дослідження гострої і хронічної нашкірної токсичності у лабораторних щурів

Д. Л. Дацюк¹, В. М. Гунчак¹, М. П. Солтис¹, В. П. Мартинишин^{2✉}, О. І. Лісняк¹

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

²ЗВО “Львівський університет бізнесу та права”, м. Львів, Україна

Досліджено гостру (підгостру) та хронічну нашірну токсичність багатокомпонентного засобу (гентаміцину сульфат, ністатин, івермектин, діоксидин, димексид, дексаметазон, лідокаїн) з підтвердженою фармакологічною активністю за зовнішнього отиту в собак. Попередніми дослідженнями з вивчення фізико-хімічних і фармакологічних властивостей встановлено, що препарат під назвою “Меланіявет” (вушні краплі), як розчин для зовнішнього застосування, є взаєморозчинною і стабільною лікарською формою, має прозорий з жовтуватим відтінком колір, розшаруванню з утворенням осаду впродовж 12 міс. не піддається. За допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) підтверджено сумісність компонентів препарату та відсутність взаємодії окремих інгредієнтів при одночасному перебуванні їх у складі розчину. Гостру токсичність препарату “Меланіявет” визначали за одноразового внутрішньошлункового введення і нашірного нанесення в лабораторних щурів. Встановлено, що досліджувані засіб в дозі 5000 мг/кг м.т. (внутрішньошлунково) і 2000 мг/кг м.т. (нашірно) загибелі тварин та клінічного прояву інтоксикації не викликає. DL_{50} препарату >5000 (2000) мг/кг м.т. За класифікацією – IV клас токсичності (малотоксичні речовини), 5 категорія (УГС). Дослідження нашірної токсичності багатокомпонентного препарату впродовж 28-ми діб показало, що він не викликав ні загибелі щурів, ні жодних ознак інтоксикації. Тварини дослідних груп, незалежно від дози досліджуваного засобу, впродовж усього періоду досліді були активними. Їх рефлекторна реакція і збудливість нічим не відрізнялася від тварин, яким на підготовлене місце аплікації наносили воду (К). Апетит у тварин групи Д₂ і Д₃ (5 і 10-ти кратні до оптимальної дози препарату) був децю пригніченим. Як результат, маса тіла щурів цих груп на кінець досліді була меншою від контролю на 12,1 (P < 0,05) і 13,3 % (P < 0,05). Тривале нашірне застосування лабораторним щурам препарату “Меланіявет” у терапевтичній дозі (0,6 мл/кг м.т.) не викликало вірогідних змін у динаміці вагових коефіцієнтів маси внутрішніх органів та показників, які характеризують їх морфологічний і біохімічний статус. Застосування досліджуваного засобу в 5 і 10-ти кратній дозі (3 і 6 мл/кг м.т.), по відношенню до терапевтичної, викликало зростання вагового коефіцієнту маси печінки, селезінки, серця і нирок. У сироватці крові тварин групи Д₃ зростала активність АЛАТ, АСАТ, ЛФ та концентрація сечовини і креатиніну, кількість еритроцитів, лейкоцитів і вміст гемоглобіну у крові тварин тенденційно знижувалась. На 42-у досліді, або через 2 тижні після припинення нашірного нанесення препарату, характерним було поступове відновлення функціонального стану тварин дослідних груп.

Ключові слова: “Меланіявет”, вушні краплі, лабораторні щури, гостра і нашірна токсичність, морфологічні показники крові, біохімічні показники крові.

Вступ

Зовнішній отит є відносно поширеним захворюванням серед собак. За різними даними відсоток даної патології серед цього виду тварин складає від 4,5 до 7,5 %, і навіть 16,5 % (Jovenko & Koval, 2019; Iovenko et al., 2022; Datsiuk et al., 2024).

До чинників, які можуть сприяти патології вуха в собак належать стеноз зовнішнього слухового проходу, надмірний ріст волосся в слуховому каналі, гіперсекреція сірки а також зміна температури і вологості в зовнішньому середовищі. В етіології отитів часто лежать паразитарні та алергічні захворювання. Однак вважається, що визначальними при цьому є мікроорганізми, гриби і кліщі. Пусковим механізмом є, на думку М. А. Куліди, умовно-патогенна мікрофлора, що активізується на тлі переохолодження і зниження природньої резистентності організму (Kulida, 2006).

Багатофакторна етіологія отитів у собак зазвичай ускладнює діагностику патологічного стану а сам процес лікування є тривалим з можливими частими рецидивами (Nuttall & Cole, 2007).

На сьогодні схем терапії отиту зовнішнього вуха в собак достатньо. При цьому дослідники вважають, що кращий результат за терапії цієї патології досягається за умови застосування комплексних препаратів з вираженою протимікробною, фунгіцидною і протизапальною дією. Такими, на сьогодні, є “Аурікап”, “Позатекс”, “Отоспектрин” тощо. Кожен із таких препаратів має свої як позитивні так і негативні характеристики.

З огляду на політропність етіологічних чинників важливою є присутність у складі таких препаратів гормональних, болетамувальних, імуностимулювальних і протипаразитарних складових.

З огляду на тривалий досвід практичної діяльності (клініка “Divet”, м. Ужгород, Україна) та з урахуванням позитивних і негативних результатів з лікування отиту в собак, за різних схем терапії, нами було ство-

рено комплексний препарат (вушні краплі) під назвою “Меланіявет”. До складу цього засобу у формі розчину для зовнішнього застосування входить: гентаміцин (антибіотик з групи аміноглікозидів II-го покоління), ністатин (протигрибковий засіб), івермектин (проти-паразитарна дія), дексаметазон (гормональний), діоксидин (антибактеріальний засіб із похідних хіноксаліну), димексид (протизапальний) і лідокаїн (засіб місцевого знеболення).

Попередніми дослідженнями з вивчення фізико-хімічних і фармакологічних властивостей було встановлено, що препарат, як розчин для зовнішнього застосування, є взаємно розчинною стабільною лікарською формою. Має прозорий із жовтуватим відтінком колір, розшаруванню з утворенням осаду впродовж тривалого часу (12 міс.) не піддається.

За допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) було підтверджено сумісність компонентів, власне відсутність взаємодії між інгредієнтами суміші при одночасному перебуванні їх у складі розчину (Parchenko et al., 2024).

Критерії процедури реєстрації препаратів для людей і тварин є одними з найважливіших аспектів фармацевтичного законодавства. В Україні Державний департамент ветеринарної медицини видав наказ № 7 від 17.02.1999 р. “Про посилення контролю за якістю і безпечністю ветеринарних препаратів і кормових добавок”. Основний рівень вимог до контролю якості препаратів диктує Міжнародний стандарт GLP (Незалежна лабораторна практика).

Проведення доклінічних досліджень регулюється вимогами регуляторних настанов Міжнародної конференції по гармонізації технічних вимог при реєстрації лікарських засобів для використання людиною (ICH), а саме: ICP S6 “Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology Derived Pharmaceuticals. Note for Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (CHMP/ICH/300/95 adopted November 2009, Addendum to ICH S6, Preclinical Safety

Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. S6(R₁)”.

Одним із важливих завдань при створенні нового препарату є, поряд з визначенням ефективності, дослідження його безпечності. Її зазвичай визначають в гострих (підгострих) і хронічних експериментах на лабораторних тваринах. Завданням досліджень в гострому досліді є встановлення токсичної дії препарату за одноразового введення в організм тварин і встановлення параметрів небажаної дії. При цьому важливим показником гострої токсичності є з'ясування дози DL₅₀ або дози, яка викликає загибель чи ефект у 50% піддослідних тварин. Отриманий результат кількісної характеристики токсичної дії досліджуваної речовини дає право відносити її до певного класу токсичності. Крім того, DL₅₀, встановлене в гострому досліді, є основою для формування схеми досліджень токсичності препарату чи новоствореної хімічної субстанції за довготривалого застосування (хронічна токсичність).

Мета дослідження

Метою роботи є вивчення гострої (підгострої) токсичності комплексного препарату “Меланіявет” за одно- і багаторазового застосування у лабораторних тварин.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження з вивчення гострої (підгострої) токсичності препарату “Меланіявет” проводили у 2023-2024 рр. на лабораторних щурах в умовах віварію. Експериментальна частина роботи відповідала вимогам Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментах і для інших наукових цілей (EST №123. Страсбург, 1986) та Ухвали 1-го національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) ([Yevropeiska konventsia... , 1986](#)).

Місцем проведення лабораторних досліджень, при роботі з біоматеріалом, були лабораторії фармакології та токсикології Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів і кормових добавок (м. Львів) та кафедри фармакології і токсикології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

Групи тварин (контроль і дослід) формувались із подібних за віком і масою дорослих одностатевих (самки, самці), здорових та невагітних щурів. Умови утримання тварин (клітки по 3 особини в кожній, контрольована температура, повітря і вологість, двохразове прибирання), годівлі (повнокомпонентна гранульована суміш) та постійний доступ до води були відповідними і відповідали всім вимогам, які ставляться до тварин в експерименті.

Тварини контрольних і дослідних груп мали, перед безпосереднім проведенням досліджень, 7-ми денний підготовчий період своєрідної акліматизації.

Вивчення гострої токсичності препарату “Меланіявет” за внутрішньо-шлунокового введення. Досліджувані засіб у формі розчину застосовували

білим щурам віком 3–4 міс., масою тіла 220–240 г шляхом одноразового введення, безпосередньо в шлунок, з допомогою спеціального зонда.

Діапазон доз “Меланіявету” становив від 500, 1000, 3000 і до 5000 мг на кг маси тіла (мг/кг м.т.). Для кожної дози препарату група тварин складала по 6 особин. Для максимально досліджуваної дози (5000 мг/кг м.т.) число щурів в експерименті становило 12.

Візуальний огляд за тваринами, на тлі дії препарату, вели впродовж 14 діб. Основними показниками, на які звертали увагу були: фізіологічний і функціональний стан організму щурів, поведінкові реакції, рефлекторна активність, відношення до корму і води, стан шкіри і шкірного покриву, слизових оболонок, частота дихальних рухів, дефекація (характер калових мас, частота), діурез (колір і частота). В оцінці дії препарату, залежно від стосованих доз, важливо було зафіксувати час виникнення і характер токсичної дії, важкість перебігу, час загибелі або одужання.

Вивчення гострої нашкірної токсичності препарату “Меланіявет”. Основним нормативним документом, який регламентує дослідження з нашкірної токсичності були вимоги ОЕСД №402 (Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure). Для з'ясування гострої дермальної токсичності методом фіксованих доз було підбрано групи здорових щурів з неущкодженою шкірою масою тіла 220–230 г.

На заздалегідь підготовлену ділянку шкіри (вистригали і виголювали шерсть на ділянці, яка за обсягом становила понад 10 % загальної площі поверхні тіла), з дорзального боку наносили досліджувані засіб в дозах 200, 1000 і 2000 мг/кг м.т. (одна тварина на одну дозу). Другий етап досліджень передбачав нанесення препарату аналогічно, але в дозі лише 2000 мг/кг м.т. і 2-м тваринам. Засіб на шкірі утримували впродовж 24 год. за допомогою пористої марлевої пов'язки та не подразливої стрічки.

Як і в попередньому досліді, показниками, на які звертали уваги при огляді тварин, були зовнішній вигляд, стан шкіри і слизових оболонок, апетит, ритм і частота дихання а також час появи, характер і важкість інтоксикації, її перебіг, а також час загибелі тварин або одужання.

Вивчення нашкірної токсичності “Меланіявету” за тривалого застосування. Відповідно до вимог ОЕСД №410 (Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28 day Study) в досліді використано лабораторних щурів, які не мали ушкоджених ділянок шкіри, масою 225–245 г.

На площі, не меншій ніж 10 % загальної поверхні шкіри, підготували місце для маніпуляції. Після вистригання і виголювання шерсті (повторювали процедуру щотижня) досліджувані розчин на дорзальну поверхню тіла наносили якомога рівніше. Контакт препарату зі шкірою підтримували щоденно, впродовж 28 діб, за допомогою фіксованої пористої марлевої пов'язки. По завершенню часу експозиції залишки досліджуваного засобу змивали водою, очищуючи повністю місце експлікації. За схемою досліді було сформовано 4 групи щурів-аналогів, по 5 тварин в кожній. Тваринам групи контролю, на попередньо підготовлену ділянку шкіри, наносили воду дистильовану, а іншим – досліджувані розчин в різних дозах,

а саме: щурам I-ої дослідної групи (D_1) препарат із розрахунку 0,6 мл/кг м.т.; II-ої (D_2) – 3 мл/кг м.т. і III-ої (D_3) – 6 мл/кг м.т.

На наступну добу, по завершенні досліду (29-а доба від початку), з метою оцінки отриманих результатів досліджень тварин контрольної і дослідних груп, за легкого хлороформного наркозу, піддавали декапітації. Відбирали проби крові для гематологічних і біохімічних досліджень, проводили макроскопічну оцінку внутрішніх органів, визначали їх масу та вагові коефіцієнти.

Аналіз морфологічних і біохімічних показників крові проведено на основі загальноновизнаних методик, з використанням гематологічного (Mythic-18) і біохімічного (HumaLyzer 3000) аналізаторів.

Результати та їх обговорення

За вивчення гострої токсичності препарату “Меланіявет” було встановлено, що досліджуваний засіб у дозах від 500 до 5000 мг/кг м.т. після внутрішньошлункового введення загинули тварин не викликав.

Візуально тварини впродовж 14-ти діб спостереження жодних ознак інтоксикації не проявляли. При цьому характерними в щурів були рухова активність та висока збудливість. Тварини з апетитом поїдали корм, пили воду, випорожнення були регулярними а калові маси мали сформований вигляд. Відзначено, що застосування препарату в найбільшій досліджуваній дозі (5000 мг/кг м.т.) загинули у тварин цієї групи теж не викликало, але дещо впливало на їх активність. Характерним було незначне пригнічення їх загального стану. При цьому щурі добре поїдали корм, а їх видимі слизові оболонки набували природного забарвлення (блідорозовий колір) вже за кілька годин після застосування препарату.

Отже, DL_{50} для “Меланіявету”, у цьому конкретному випадку, становив понад 5000 мг/кг м.т., що дає підстави віднести досліджуваний засіб до IV класу токсичності – малотоксичні речовини.

За вивчення гострої нашкодливої токсичності “Меланіявету” було встановлено, що на першому етапі визначення діапазону доз препарат в початковій дозі 200 мг/кг м.т., після 24-годинної експозиції, викликав у щурів незначне і нетривале в часі почервоніння шкіри. Вже через 2–3 години остання у тварин дослідної групи набувала природного блідорозового забарвлення.

Застосування препарату в дозі 1000 мг/кг м.т. спричиняло у тварин почервоніння шкіри на місці аплікації і тимчасове пригнічення стану центральної нервової системи, яке згодом зникало. Препарат в дозі 2000 мг/кг м.т. викликав подібні, але більш виражені зміни у щурів.

Отже, з урахуванням того, що препарат за нашкодливої його нанесення в дозі 2000 мг/кг м.т. не викликав загинули тварин а окремі клінічні ознаки перебігу, які супроводжували цей період досліду, мали тимчасовий і відновлювальний характер за системою класифікації гострої токсичності (УГС) препарат “Меланіявет” належить до 5-ої категорії (клас 5).

Дослідження токсичності препарату “Меланіявет” впродовж 28-и діб його нашкодливої застосування показало, що він не викликає ні загинули щурів, ні жодних ознак інтоксикації. Тварини дослідних груп, незалежно від дози досліджуваного засобу, впродовж цього періоду досліду були активними, їх рефлекторна активність і збудливість нічим не відрізнялася від тварин, яким на підготовлене місце аплікації наносили воду (К). При цьому необхідно відзначити, що тварини 2-ої і 3-ої дослідних груп (D_2 і D_3) були дещо пригнічені, корм поїдали не апетитно. Це, очевидно, позначилось і на масі тіла щурів. Так, вона на 29-у добу досліду була, порівняно з контролем, на 12,1 ($P < 0,05$) і 13,3 % ($P < 0,05$) меншою.

За візуальною макроскопічною оцінкою внутрішніх органів у тварин контрольної і дослідних груп якихось відхилень не відзначено. Зовнішній вигляд, величина і колір печінки, селезінки, серця, легень і нирок у тварин всіх груп були подібними. За ваговими коефіцієнтами, або співвідношенням маси окремих органів до маси тіла тварин було встановлено, що у щурів I-ої групи (D_1), на тлі дії препарату в мінімальній досліджуваній дозі (0,6 мл/кг м.т.), цей показник стосовно селезінки і нирок був, порівняно з контролем, вищим на 7,3 і 4,2 % (табл. 1).

У тварин II-ої дослідної групи (3 мл/кг м.т.) – вагові коефіцієнти маси печінки, серця і нирок зростали на 14,4 ($P < 0,05$), 18,0 ($P < 0,05$) і 26,4 % ($P < 0,001$), відповідно. На цьому тлі аналогічний показник селезінки мав тенденцію до зниження, порівняно з контролем, на 5,0 %.

У тварин III-ої дослідної групи (D_3) довготривале нашкодливо застосування Меланіявету в найвищій досліджуваній дозі (6 мл/кг м.т.) сприяло зростанню вагового коефіцієнту маси печінки на 14,7, селезінки на 8,7, серця на 18,2 і нирок на 22,6 %.

Зростання вагових коефіцієнтів маси досліджуваних внутрішніх органів у тварин II-ої і III-ої дослідних груп слід, очевидно, розглядати як результат нерівномірної зміни, в процесі росту, маси тіла тварин і окремих органів. За відсутності у тварин цих 2-х груп належного апетиту маса їх тіла зростала повільніше, ніж морфологічно і функціонально змінювались внутрішні органи.

Вважається, що у процесі зміни гомеостазу, на тлі можливої дії токсикантів, найреактивнішою є система крові. Нами вивчено вплив різних доз вушних крапель “Меланіявету”, за тривалого нашкодливої їх нанесення, на морфологічний склад крові щурів дослідних груп (табл. 2).

За результатами дослідження встановлено, що застосування препарату “Меланіявет” у тварин дослідної групи I (D_1) викликало зростання в їх крові вмісту гемоглобіну на 5,4% і кількості еритроцитів на 6,9 %. Вищими, порівняно з контролем, були у щурів цієї групи і величина гематокриту та кількість тромбоцитів (на 5,2 і 13,4 % відповідно). Суттєвих відмінностей в індексах червоної крові (MCHC, MCH і MCV) не відзначено. За оцінкою лейкограми характерним було зростання гранулоцитів на 4,8 %, на тлі тенденції до зниження відсотка лімфоцитів і моноцитів.

Таблиця 1

Вагові коефіцієнти маси внутрішніх органів білих щурів на 29-у добу досліді (M ± m, n = 5)

Внутрішні органи	Групи тварин			
	Контроль	1 група Д ₁	2 група Д ₂	3 група Д ₃
Печінка	28,5 ± 1,12	28,0 ± 2,21	32,6 ± 1,13*	32,7 ± 1,48
Селезінка	2,19 ± 0,07	2,35 ± 0,32	2,08 ± 0,19	2,38 ± 0,52
Серце	4,22 ± 0,27	4,27 ± 0,29	4,98 ± 0,097*	4,99 ± 0,11
Легені	7,84 ± 0,89	8,81 ± 1,99	11,8 ± 1,56	9,77 ± 1,74
Нирка права	4,02 ± 0,06	4,48 ± 0,19	5,08 ± 0,19***	5,58 ± 0,39**
Нирка ліва	4,34 ± 0,15	4,23 ± 0,19	5,07 ± 0,19*	5,21 ± 0,18**
Маса тіла, г	208,0 ± 7,18	207,0 ± 9,82	183,0 ± 3,39*	180,3 ± 5,57*

Примітка: * – P < 0,05, ** – P < 0,01, *** – P < 0,001

Таблиця 2

Морфологічні показники крові білих щурів на 28-у добу досліді (M ± m, n = 5)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	1 група Д ₁	2 група Д ₂	3 група Д ₃
Гемоглобін, г/л	163,6 ± 4,76	172,4 ± 5,50	155,6 ± 1,50	157,4 ± 1,63
Еритроцити, 10 ¹² /л	7,28 ± 0,26	7,78 ± 0,36	6,86 ± 0,13	6,89 ± 0,06
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	12,3 ± 1,31	10,7 ± 2,41	9,48 ± 1,12	8,86 ± 0,87
Гематокрит, %	40,6 ± 0,84	42,7 ± 1,26	38,9 ± 0,35	39,5 ± 0,37
МСНС, г/дл	39,9 ± 0,72	40,4 ± 0,36	39,9 ± 0,23	39,9 ± 0,35
МСН, пг	22,5 ± 0,45	22,2 ± 0,52	22,7 ± 0,55	22,9 ± 0,24
МСV, мкм ³	55,9 ± 1,09	55,04 ± 1,18	56,9 ± 1,34	57,3 ± 0,66
Тромбоцити 10 ⁹ /л	363,8 ± 56,7	412,4 ± 84,7	374,8 ± 53,1	380,8 ± 93,4
Лімфоцити, %	48,02 ± 5,19	46,7 ± 5,98	32,4 ± 6,52	36,4 ± 3,61
Моноцити, %	6,36 ± 0,44	5,50 ± 0,59	5,50 ± 0,59	5,62 ± 0,29
Гранулоцити, %	45,6 ± 5,54	47,8 ± 6,23	62,1 ± 7,06	57,9 ± 3,86

Примітка: * – P < 0,05, ** – P < 0,01

Зростання дози досліджуваного препарату до 3 і 6 мл/кг м.т. (II і III-я дослідні групи) мало в оцінці гематологічних показників дещо відмінну від тварин I-ої дослідної групи динаміку. Так, відзначено, що у щурів II-ої групи концентрація гемоглобіну в крові, порівняно з контролем, була вже на 4,9 % меншою, як і кількість еритроцитів – на 5,8%. На тлі зростання на 3,02 % числа тромбоцитів величина гематокриту зменшувалась на 4,2 %.

На тлі зниження в крові щурів лейкоцитів на 22,9 % в їх крові зростав, порівняно з контролем, відсоток гранулоцитів (на 36,2 %), а кількість моноцитів і лімфоцитів зменшувалась на 13,5 і 32,5 %, відповідно.

За аналогією зменшувався і вміст гемоглобіну та кількість еритроцитів і лейкоцитів, порівняно з контролем, у крові тварин III-ої дослідної групи (на 3,8, 5,4 і 27,9 %, відповідно). Кількість тромбоцитів перевищувала аналогічний показник щурів контрольної групи на 10,5 %. Тенденція до зниження в крові моноцитів і лімфоцитів була характерною і для тварин цієї дослідної групи, хоч у цифровому вимірі, порівняно з II-ою дослідною, була менш виражена.

Отже, на тлі довготривалого нашкодженого нанесення досліджуваного засобу в щурів дослідних груп відзначено окремі відхилення гематологічних показників. При цьому, не можна виключати, що в динаміці таких змін можуть лежати як вплив окремих складни-

ків, що входять до рецептури цього багатокомпонентного засобу так і препарату в цілому.

Організм тварини по-різному реагує на тривале поступлення в їх організм чужорідних речовин. При цьому, вважається, що першою такою реакцією є адаптивно-приспосувальна, яка через механізми центральної і гуморальної регуляції забезпечує відповідну стабільність гомеостазу тварин.

Функціональний стан окремих органів і систем організму є особливо важливим в забезпеченні його гомеостазу. За поступлення в організм чужорідних речовин відбувається ряд структурно-метаболических змін, які можуть впливати на ріст і розвиток організму в цілому, і на роботу окремих органів і систем, зокрема. Так, нами за оцінкою біохімічних показників сироватки крові в щурів встановлено, що наявна певна динаміка їх змін є залежною від дози препарату за тривалого нашкодженого його нанесення (табл. 3).

При цьому було з'ясовано, що застосування "Меланіявету", навіть в дозі 0,6 мл/кг м.т. (I-а група), вже сприяло незначному зниженню функціонального стану печінки. Так, в сироватці крові щурів цієї дослідної групи на 10,1 % тенденційно знижувалась концентрація сечовини та активність лактатдегідрогенази (ЛДГ). Стосовно рівня креатиніну, то його концентрація в крові щурів зростала на 14,1%, а активність АсАТ і ЛФ, відповідно, на 10,6 і 8,1 % була вищою ніж у тварин групи контролю.

Таблиця 3

Біохімічні показники крові білих щурів на 28-у добу (M ± m, n = 5)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	I група Д ₁	II група Д ₂	III група Д ₃
Загальний протеїн, г/л	72,6 ± 1,03	72,4 ± 1,27	71,3 ± 2,37	59,4 ± 13,3
Альбумін, г/л	30,5 ± 1,47	32,02 ± 0,67	31,5 ± 0,62	32,9 ± 0,94
Сечовина, ммоль/л	6,7 ± 0,45	6,02 ± 0,16	8,58 ± 0,17**	8,32 ± 0,46*
Креатинін, мкмоль/л	53,5 ± 3,91	61,02 ± 4,08	68,9 ± 7,11	58,1 ± 4,38
АсАТ, Од/л	153,1 ± 5,03	169,4 ± 12,2	209,5 ± 12,3**	260,7 ± 22,7**
АлАТ, Од/л	62,5 ± 4,85	62,7 ± 2,45	109,3 ± 10,5**	164,8 ± 22,3**
ЛФ, Од/л	153,9 ± 9,37	166,3 ± 15,6	234,4 ± 11,5***	235,3 ± 26,8*
ЛДГ, Од/л	1930,6 ± 166,4	1743,4 ± 134,8	2202,2 ± 204,3	1983,8 ± 99,7

Примітка: * – P < 0,05, ** – P < 0,01, *** – P < 0,001

Як результат пострезорбтивної дії досліджуваного засобу характерною була динаміка змін окремих біохімічних показників у тварин II-ої дослідної групи. Як, і в попередній групі, вміст протеїну загального в сироватці крові щурів був подібним до аналогічного в контролі. Однак, у тварин цієї групи відзначено вірогідне зростання в крові концентрації сечовини (на 28,1 %, P < 0,01) і креатиніну (на 28,8 %). Активність ЛДГ теж була вищою порівняно з контролем. При цьому відзначаємо вірогідне підвищення активності АсАТ на 70,3 % (P < 0,01), АлАТ на 74,9 % (P < 0,01) та ЛФ – на 52,3 % (P < 0,001).

На зниження функціонального стану печінки і особливо її протеїнсинтезувальної функції вказує на зниження у крові щурів III-ої дослідної групи вмісту протеїну загального (на 18,2 %), за підвищеної концентрації сечовини на 24,2 % (P < 0,05) і креатиніну на 8,6 %. Стосовно активності ензимів: відзначено їх суттєве зростання порівняно з контролем. Активність АлАТ була у понад 2,5 рази вищою, АсАТ – на 70,3 % (P < 0,01) і ЛФ – на 52,9 % (P < 0,05).

Отже, підсумовуючи можна зробити висновок, що досліджуваний багатокомпонентний засіб через свою активну пострезорбтивну дію піддавався всмоктуванню з ділянки аплікації та системно, впродовж всього

періоду дослідження, впливав на роботу окремих систем і органів.

Встановлено, що довготривале нанесення досліджуваного засобу на шкіру, особливо в дозах у 5 і 10 раз більших за оптимальну, викликало функціональні і морфологічні зміни з боку печінки. Підтвердженням цьому було зниження в сироватці крові загального протеїну, висока трансферазна активність ензимів та більша, порівняно з аналогічним показником в крові щурів контрольної групи, концентрація сечовини і креатиніну.

В оцінці хронічної токсичності досліджуваного засобу важливою є відновлюваність показників функціонального стану тварин за припинення поступлення препарату в їх організм. На табл. 5 подано результати гематологічних показників тварин контрольної і дослідних Д₁, Д₂ і Д₃ груп на 42-добу або через 14 днів після повного припинення нанесення “Меланіявету” на шкіру тварин.

Як результат було з’ясовано, що в організмі тварин всіх дослідних груп, в цей період дослідження, морфологічні показники крові суттєво не відрізнялися, хоч і були ще дещо відмінними від аналогічних в контролі.

Подібна тенденція була і за оцінки біохімічних показників крові (табл. 5).

Таблиця 4

Гематологічні показники у щурів на 42-у добу, або через 14 днів після припинення нашкірного нанесення препарату “Меланіявет” (M ± m, n = 5)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	1 група	2 група	3 група
Гемоглобін, г/л	174,0 ± 3,16	172,8 ± 5,12	168,4 ± 3,06	166,4 ± 5,14
Еритроцити, 10 ¹² /л	7,10 ± 0,40	7,60 ± 0,22	7,0 ± 0,34	7,44 ± 5,14
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	11,6 ± 0,92	10,6 ± 1,14	11,2 ± 1,42	10,8 ± 1,08
Гематокрит, %	39,6 ± 1,14	40,4 ± 1,60	40,6 ± 1,52	39,2 ± 1,44
МСНС, г/дл	43,9 ± 0,88	44,1 ± 1,02	41,5 ± 0,90	42,4 ± 0,98
МСН, пг	24,5 ± 0,65	22,7 ± 0,32	24,1 ± 0,48	22,4 ± 0,60
МСV, мкм ³	55,7 ± 0,94	53,2 ± 1,40	58,0 ± 1,12	52,7 ± 1,24
Тромбоцити 10 ⁹ /л	388,4 ± 40,4	370,6 ± 50,2	390,2 ± 70,4	410,6 ± 44,4
Лімфоцити, %	48,2 ± 4,16	46,7 ± 5,08	45,2 ± 6,02	44,4 ± 4,06
Моноцити, %	5,82 ± 0,22	6,06 ± 0,40	5,50 ± 0,40	5,60 ± 0,34
Гранулоцити, %	46,8 ± 4,12	47,8 ± 4,0	48,2 ± 3,22	47,6 ± 5,14

Примітка: * – P < 0,05, ** – P < 0,01

Таблиця 5

Біохімічні показники сироватки крові щурів на 42-у добу ($M \pm m, n = 5$)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	I група	II група	III група
Загальний протеїн, г/л	70,4 ± 0,88	71,08 ± 1,06	69,6 ± 1,12	66,8 ± 0,88
Сечовина, ммоль/л	6,90 ± 0,55	6,60 ± 0,38	6,70 ± 0,60	7,28 ± 0,48
Креатинін, мкмоль/л	55,4 ± 2,12	60,2 ± 4,04	57,4 ± 2,88	57,0 ± 3,66
АсАТ, Од/л	150,2 ± 6,18	160,4 ± 2,88	180,4 ± 4,66*	212,4 ± 8,82*
АлАТ, Од/л	64,3 ± 6,18	65,2 ± 4,46	80,2 ± 6,60*	102,2 ± 4,88**
ЛФ, Од/л	155,8 ± 7,50	166,4 ± 6,84	170,6 ± 5,50	180,4 ± 6,0
ЛДГ, Од/л	1900,6 ± 60,4	1850,4 ± 90,6	1940,4 ± 102,4	1980,6 ± 44,6

Встановлено, що вміст загального протеїну в сироватці крові щурів груп Д₂ і Д₃ поступово збільшувалася а концентрація сечовини і креатиніну була подібною до показника тварин контрольної групи. Однак, важливо відзначити, що і на цей період, тобто через 14 діб після припинення застосування досліджуваного препарату, активність АсАт і АлАТ була ще доволі високою (на 18,5 % і 38,0 % менша ніж на 28-у добу досліду але вірогідно вища за показник тварин контрольної групи на 41,4 і 58,9 %).

Висновки

1. За умови одноразового внутрішньошлункового введення “Меланіявету” в дозі 5000 мг/кг м.т. загибель тварин не наступала за відсутності клінічного прояву ознак інтоксикації. Отже, за DL₅₀ “Меланіявет” є препаратом IV класу токсичності (малотоксичні речовини).

2. Одноразове нашкірне застосування багатоконпонентного засобу “Меланіявет” (вушні краплі) в дозі 2000 мг/кг м.т. загибелі тварин не викликає. Пригнічення загального стану у тварин, на тлі дії препарату, як і незначна гіперемія на місці його нанесення мали короткотерміновий і відновлювальний характер. За класифікацією УГС – препарат 5 категорії, токсичності.

3. Тривале нашкірне застосування лабораторним щурам препарату “Меланіявет” у терапевтичній дозі не викликало вірогідних змін в динаміці показників, що характеризують морфологічний і біохімічний склад крові.

4. Застосування досліджуваного засобу в 10-ти кратній, по відношенню до терапевтичної, дозі викликало зростання вагового коефіцієнту маси печінки, серця і нирок. У сироватці крові тварин групи Д₃ зростає активність АсАт, АлАТ, ЛФ та концентрація сечовини і креатиніну а кількість еритроцитів, лейкоцитів, вміст гемоглобіну в крові тенденційно знижуються.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

Chemerovska, I., & Rublenko, I. (2023). Monitoring of microflora in case of infectious pathology in dogs and

cats. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 25(112), 3–15. DOI: 10.32718/nvlvet11201

Datsiuk, D. L., Hunchak, V. M., Gutyj, B. V., Chariv, I. I., Vasiv, R. O., Martynyshyn, V. P. (2024). Otitis externa in dogs (prevalence, etiology, clinical course, and treatment regimens. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary scientific*, 26(114), 62–69. DOI: 10.32718/nvlvet11410.

Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2. P.11.

Iovenko, A., & Koval, G. (2019). Monitoring of contagious skin diseases of dogs and cats in Odessa. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 21(93), 160–163. DOI: 10.32718/nvlvet9328.

Iovenko, A., Yurchenko, M., & Koval, H. (2022). The spread of dogs’ otitis in Odesa city. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 24(107), 40–43. DOI: 10.32718/nvlvet10707.

Kulida, M. A. (2006). Zachvoriuvanna vukh u sobak. *Naukovyi visnyk LNAVМ*, 2, 94–98 (in Ukrainian).

Nuttall, T., & Cole, L. K. (2007). Evidence based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for treatment of Pseudomonas otitis in dogs. *Vet. Dermatol.*, 18(2), 69–77. DOI: 10.1111 j.1365-3164.2007.00575.x.

Parchenko, V., Datsiuk, D., Hunchak, V., & Martynyshyn, V. (2024) Quantitative determination of the components of the mixture-ear drops “Melavet” by the method of high-performance liquid chromatography. *Scientific Messenger LNAVМ Series: Veterinary scientific*, 26(113), 150–155. DOI: 10.32718/nvlvet11323.

Yevropeiska konventsia pro zakhyst khrebetnykh tvaryn, shcho vykorystovuietsia dlia doslidnykh ta inshykh tsilei. Strasburh, 18 bereznia. 1986 r. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text (in Ukrainian).

ICH TOPIC S6 (R₁). Document “Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Note for Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals”.