

## **ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ**

**Левицький Т. Р.**

*Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів, Україна, e-mail: taraslev@i.ua*

*Проведено визначення параметрів гострої токсичності кормової добавки Ліатоксил при пероральному введенні традиційним методом та методом класифікації гострої токсичності. У результаті проведених досліджень встановлено, що ЛД<sub>50</sub> при дослідженні обома методами є ідентичним. Рекомендовано застосування методу класифікації гострої токсичності - OECD Test № 423 для встановлення класу гострої токсичності технологічних кормових добавок.*

**Ключові слова:** *кормові добавки, безпечність, гостра токсичність, ліатоксил*

Інтенсифікація тваринництва стимулює впровадження на ринок нових продуктів, які застосовуються в кормах для тварин, і, зокрема, кормових добавок. Враховуючи підвищені вимоги до якості та безпечності кормів для тварин, широкого застосування набули технологічні кормові добавки. В промислових умовах, без них неможливо виготовити якісний та безпечний комбікорм.

Зростаючі вимоги до кормів, особливо до їх безпечності, сприяють активізації роботи з розробки нових кормових добавок, створення нових функціональних груп. Так, до їх переліку, згідно Регламенту ЄС №1831 Європейського парламенту і Ради від 22.09.2003 р.[1] у 2009 році було додано функціональну групу інгібітори мікотоксинів (речовини, які можуть пригнічувати, знижувати рівень всмоктування, сприяти виведенню мікотоксинів або інактивувати їх), а у 2015 році – функціональну групу речовин, які покращують гігієнічний стан (субстанції, які позитивно впливають на гігієнічні властивості корму шляхом зменшення мікробіологічного забруднення). Останнім часом широкого розповсюдження набувають комплексні кормові добавки, які володіють властивостями декількох функціональних груп.

Однією з таких добавок є кормова добавка Ліатоксил. Кормова добавка Ліатоксил, яка випускається ТОВ «САНФОРТ», Україна відноситься до категорії технологічних добавок та володіє властивостями функціональної групи речовин, які зменшують забруднення кормів мікотоксинами, консервантів та речовин, які покращують гігієнічний стан.

Гарантування безпечності нових технологічних кормових добавок є важливою проблемою. Такі дослідження повинні включати вивчення безпечності, як на лабораторних, так і на цільових тваринах. [2, 3].

Визначення параметрів гострої токсичності кормових добавок, які вводяться в обіг, передбачено, як вимогами законодавства Європейського Союзу [4], так і вітчизняними вимогами [5]. Однак, методичні підходи до визначення гострої токсичності у Європейському Союзі [4] та в Україні [6] дещо відрізняються. Тому, порівняльна оцінка методів визначення гострої токсичності згідно з вимогами законодавства Європейського Союзу та вітчизняними вимогами є актуальною на даний час.

**Мета роботи.** Вивчити параметри гострої токсичності технологічної кормової добавки Ліатоксил традиційним методом [6] і методом класифікації гострої токсичності [7], та провести їх порівняльну оцінку.

**Матеріали та методи.** Дослідження проведено на базі віварію Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Для проведення досліджень використовували кормову добавку Ліатоксил виробництва ТОВ «САНФОРТ». Кормова добавка Ліатоксил – порошок сірого кольору із специфічним запахом, містить у своєму складі цеоліт, бентоніт, оксид кремнію, фумарову, лимонну, бурштинову кислоти.

Визначення гострої токсичності досліджуваної добавки було проведено методом класифікації гострої токсичності: «Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method» OECD Test № 423 [7] і традиційним методом [6].

Визначення середньо смертельної дози кормової добавки Ліатоксил за традиційним методом проводили у два етапи: орієнтовний і розгорнутий. На орієнтовному етапі, з метою встановлення рівня смертельних доз добавки, було взято широкий інтервал між дозами — 50, 500 та 5000 мг/кг. На кожен дозу було використано по три лабораторних тварини. На розгорнутому етапі було взято менші інтервали між дозами, а саме: 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 та 5000 мг/кг. Кожну дозу добавки вводили 6 щурам. Загальна тривалість спостережень за тваринами складала 14 діб. Під час досліду враховували такі показники: загальний стан, зовнішній вигляд, особливості поведінки тварин, інтенсивність та характер рухливої активності, наявність судом, координацію рухів, реакцію на зовнішні подразники (тактильні, звукові, світлові), стан волосяного покриву, видимих слизових оболонок, відношення до корму, ритм, частоту дихання, час виникнення та характер інтоксикації, її важкість, перебіг, час загибелі тварин або їх одужання, залежно від дози добавки та вираховували ЛД<sub>50</sub>.

Принцип методу класифікації гострої токсичності полягає у поетапній процедурі з використанням на кожному етапі трьох тварин. Кормова добавка вводиться перорально кожній групі піддослідних тварин у заданій дозі. Залежно від смертності і/або передсмертного стану тварин для того, щоб зробити висновок про гостру токсичність досліджуваної кормової добавки, в середньому потрібно 2–4 етапи. Рівень дози кормової добавки, яка використовується, як початкова, вибирається з одного із чотирьох фіксованих рівнів: 5, 50, 300 і 2000 мг/кг маси тіла. Відсутність або наявність смертності тварин, дозованих

на одному етапі, визначає дію на наступному етапі: 1) немає необхідності у подальшому дослідженні; 2) дозування трьох тварин такою ж дозою; 3) дозування трьох тварин наступним зростаючим або спадаючим рівнем дози. Коли наявна інформація показує, що на найвищому рівні дози (2000 мг/кг маси тіла) смертельний результат малоімовірний, то її встановлюють початковою дозою. Враховуючи цю інформацію та дані про склад кормової добавки Ліатоксил, за стартову дозу було прийнято дозу 2000 мг/кг. Досліджувана добавка вводилася одноразово за допомогою шлункового зонда.

Тварин обстежували індивідуально щоденно впродовж 14 діб. Обстеження включало облік загибелі тварин, зміни шкіри і шерсті, очей і слизових оболонок, дихальної, кровоносної, вегетативної і центральної нервової систем, а також активність і характер поведінки.

Оскільки загибелі тварин на першому етапі не було відмічено, то згідно схеми дослідження було проведено другий етап з введенням трьом тваринам тієї ж дози [7].

Маса тіла тварин визначалася безпосередньо перед введенням досліджуваної кормової добавки та на 7 і 14 добу досліду. У кінці досліду було проведено забій та патологоанатомічний розтин тварин для вивчення стану внутрішніх органів.

**Результати роботи.** Отримані результати досліджень з встановлення параметрів гострої токсичності кормової добавки Ліатоксил за умов внутрішньошлункового уведення білим щурам традиційним методом, подані у таблиці 1.

**Таблиця 1** – Результати гострого досліду за внутрішньошлункового введення кормової добавки Ліатоксил білим щурам

| Тварини  | Доза, мг/кг |      |      |      |      |      |
|----------|-------------|------|------|------|------|------|
|          | 1000        | 1500 | 2000 | 3000 | 4000 | 5000 |
| Живі     | 6           | 6    | 6    | 6    | 6    | 6    |
| Загинуло | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |

У результаті досліджень встановлено, що за введення кормової добавки Ліатоксил білим щурам у дозах від 1000 до 5000 мг/кг, симптомів отруєння не спостерігали. Клінічних ознак порушення зі сторони дихальної та сечовидільної системи, а також розлади шлунково-кишкового тракту були відсутні. Неадекватних реакцій та загибелі тварин не спостерігали. За загальними клінічними показниками, поведінкою, відношенням до корму, води, станом зовнішніх слизових оболонок, а також за функцією шлунково-кишкового тракту, сечовидільної системи дослідні щури не відрізнялися від тварин контрольної групи.

Максимальна введена доза склала 5000 мг/кг маси тіла тварин. У результаті проведених досліджень кормова добавка Ліатоксил належить до малотоксичних речовин – 4 клас згідно з ГОСТ 12.1.007-76 [9].

Для проведення досліджень методом класифікації гострої токсичності на 1 етапі було сформовано за принципом аналогів групу тварин у кількості 3 голови. Кормову добавку Ліатоксил вводили тваринам у дозі 2000 мг/кг у вигляді суспензії з 1 % крохмалем. При спостереженні за тваринами загибелі тварин не відмічено. Тому, згідно схеми досліду, було проведено наступний етап дослідження на 3 тваринах із введенням тієї ж дози.

Результати дослідження, наведені у таблиці 2, свідчать, що введення кормової добавки Ліатоксил на 1 і 2 етапах дослідження не призвело до загибелі дослідних тварин.

**Таблиця 2** – Результати дослідження гострої токсичності за внутрішньошлункового введення кормової добавки Ліатоксил білим щурам

| Етап дослідження | Кількість тварин у групі | Доза кормової добавки, мг/кг | Результати |          |        |
|------------------|--------------------------|------------------------------|------------|----------|--------|
|                  |                          |                              | Захворіло  | Загинуло | Вижило |
| 1                | 3                        | 2000                         | 0          | 0        | 3      |
| 2                | 3                        | 2000                         | 0          | 0        | 3      |

Результати, наведені у таблиці 2 показують, що протягом періоду спостереження загибелі піддослідних тварин відмічено не було. За введення кормової добавки Ліатоксил білим щурам у дозі 2000 мг/кг клінічних симптомів отруєння не спостерігали. Тварини були рухливими, будь-яких відхилень з боку поведінкових реакцій і загального стану щурів не відмічено. Змін шкіри і шерсті, очей і слизових оболонок у тварин обох груп протягом спостереження відмічено не було. Клінічні ознаки порушення зі сторони дихальної та сечовидільної систем, а також розлади шлунково-кишкового тракту були відсутні. Жива маса тварин протягом досліду суттєво не змінювалася.

При патологоанатомічному розтині в кінці досліду, видимих патологічних змін внутрішніх органів не виявляли. Це свідчить про відсутність негативного впливу кормової добавки Ліатоксил на організм тварин.

У результаті проведених досліджень при вивченні гострої токсичності було встановлено, що кормова добавка Ліатоксил за введення у дозі 2000 мг/кг живої маси, не має негативного впливу на лабораторних тварин (білих щурів). Розрахункове

значення  $LD_{50}$  згідно схеми досліджу становить вище 5000 мг/кг. Кормова добавка Ліатоксил може бути віднесена до продуктів 5 категорії небезпеки за показником гостра токсичність згідно Гармонізованої комплексної системи класифікації хімічних речовин і сумішей [8].

**Висновки.** Параметри гострої токсичності кормової добавки при визначенні традиційним методом та методом класифікації гострої токсичності є ідентичними.

$LD_{50}$  визначене традиційним методом становить вище 5000 мг/кг. Кормова добавка згідно з ГОСТ 12.1.007-76 відноситься до 4 класу токсичності (малотоксичних речовин). Метод визначення гострої токсичності традиційним методом дозволяє отримати достовірне значення  $LD_{50}$  з використанням великої кількості тварин.

$LD_{50}$  кормової добавки Ліатоксил визначене методом класифікації гострої токсичності згідно схеми досліджу становить вище 5000 мг/кг. Кормова добавка згідно з Гармонізованою комплексною системою класифікації хімічних речовин і сумішей відноситься до 5 класу токсичності. Метод визначення гострої токсичності згідно Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method дозволяє отримати орієнтовне значення  $LD_{50}$  для визначення класу токсичності кормових добавок з мінімальними затратами праці і з використанням мінімальної кількості тварин.

З метою економії ресурсів та враховуючи принципи гуманного поводження з тваринами можна рекомендувати застосування методу класифікації гострої токсичності – OECD Test № 423 для встановлення класу гострої токсичності при доклінічних дослідження технологічних кормових добавок.

#### Список літератури

1. Regulation (EC) № 1831/2003 of the european parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Official Journal of the European Union L 268, 18.10.2003, p. 29).
2. Оцінка безпечності кормових добавок. Загальні підходи (Методичні рекомендації) / І.Я.Коцюмбас, Т.П.Левицький, Г.П.Ривак, С.О.Шаповалов і ін. // Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, Львів-2011, 21 с.
3. Т.П.Левицький. Загальні підходи до оцінки безпечності кормових добавок // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Львів-2013. Вип. 14 № 3, 4, С. 301-308.
4. Commission Regulation (EC) № 429/2008 of 25 April 2008 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the preparation and the presentation of applications and the assessment and the authorisation of feed additives (Official Journal of the European Union L 133, 22.5.2008, p. 60).
5. Перелік матеріалів реєстраційного доосьє та порядок його формування. Затверджено Наказом Державного комітету ветеринарної медицини України 14.07.2008 N 133
6. Коцюмбас І.Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І.Я. Коцюмбас, О.Г. Малик, І.П. Патерега, О.Л. Тішин, Ю.М. Косенко та ін. За ред. д-ра вет. наук, проф. І.Я. Коцюмбаса.– Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.
7. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method.
8. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System 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.
9. ГОСТ 12.1.007-76.ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – Введ. 01.01.77. – Проверен 01.10.81; Изменён № 1; Переиздан 01.12.81. – М.: Изд-во стандартов, 1982. – 6 с.

#### COMPARATIVE ASSESSMENT OF METHODS FOR DETERMINATION THE ACUTE TOXICITY OF TECHNOLOGICAL FEED ADDITIVE

*Levytskyy T. R.*

*State scientific-research control institute of veterinary medicinal products and feed additives, Lviv, Ukraine*

*The aim is to explore the parameters of acute toxicity of technological feed additive Liatoksyl using traditional method and acute toxic class method and make their comparative assessment.*

*Materials and methods. Research conducted at the vivarium of the State Research Institute for Veterinary medicines and feed additives. For research was used Liatoksyl fodder additive produced by "SANFORT". Feed additive Liatoksyl - gray powder with a specific smell, contains in its structure zeolite, bentonite, silica, fumaric, citric, succinic acid.*

*Determination of the acute toxicity additive exploration was conducted by of acute toxicity classification method "Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method" OECD Test № 423 and traditional method. Determining the average lethal dose of feed additive Liatoksyl conducted on white rats in two stages: the estimated and deployed. Total applied 45 animals. The total duration of observation of the animals was 14 days. The principle of the method of classification of acute toxicity is phased procedure using at each stage of the three animals. The study was conducted in two phases on white rats. The feed supplement was administered orally to each group of experimental animals at a given dose. Total used 6 animals. At research using actue toxicity classification method was founded that LD50 of feed additive is higer that 5000 mg/kg and it belongs to 5<sup>th</sup> category of danger belongs to the Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures.*

*Conclusions: Parameters of acute toxicity feed additive in determining the traditional method and the method of classification of acute toxicity are identical. In order to save resources and taking into account the principles of humane treatment of animals we can recommend the use of the method of classification of acute toxicity - OECD Test № 423 for setting class acute toxicity preclinical studies of technological feed additives.*

**Keywords:** *feed additives, safety, acute toxicity, liatoksyl*