



ISSN 2072-2419

№ 3

Международный Вестник Ветеринарии

INTERNATIONAL BULLETIN
OF VETERINARY MEDICINE



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ - 2015

www.spbgavm.ru

Редакционный совет

А.А. Стекольников – гл. ред., член-корр.
РАСХН, д.в.н., проф., СПб
В.Д. Соколов – зам. гл. ред. д.в.н. проф., СПб
А.И. Ятусевич – зам. гл. ред. д.в.н. проф.,
Витебск

Редакционная коллегия

А.А. Алиев, д.в.н., проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
Л.М. Белова, д.б.н., проф., СПб.
М.И. Гулюкин, акад. РАСХН, д.в.н., проф.
Москва.
Н.В. Зеленецкий, д.в.н., проф., СПб.
Л.Ю. Карпенко, д.б.н., проф., СПб.
С.П. Ковалев, д.в.н., проф., СПб.
А.А. Кудряшов, д.в.н., проф., СПб.
В.А. Кузьмин, д.в.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
К.В. Племяшов, д.в.н., проф., СПб.
Б.С. Семенов, д.в.н., проф., СПб.
А.М. Смирнов, акад. РАСХН, д.в.н., проф.,
Москва.

А.А. Сухинин, д.б.н., проф., СПб.
А.Н. Шиков, д.ф.н., проф., СПб.

Редакционно-технический отдел

В.Д. Соколов, д.в.н. проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
А.В. Рыбакова, к.в.н., СПб.

Сдано в набор 26.10.2015

Подписано к печати 26.10.2015

Формат 70×100 1/16.

Бумага глянцевая № 1. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 5,2+1,63 цв. вкл.

Усл. Кр.-отг. 18,2. Тираж 1001 экз.

Editor –in– chief

A.A. Stekolnikov professor, DVM, Corresponding
Member of the Russian Academy of Agricultural
Sciences

Managing Editor

V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
A.I. Yatusевич - professor, DVM, Vitebsk

Editorial Board

A.A. Aliyev - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
L.M. Belova - professor, DBS, St. Petersburg
M.I. Gulyukina - Academician of the Agricultural
Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM,
professor, Moscow
N.V. Zelenevski - professor, DVM, St. Petersburg
L.Y. Karpenko - professor, DBS, St. Petersburg
S.P. Kovalev - professor, DVM, St. Petersburg

A.A. Kudryashov - professor, DVM, St. Petersburg
V.A. Kuzmin - professor, DVM, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg .
K.V. Plemyshev - professor, DVM, St. Petersburg
B.S. Semenov - professor, DVM, St. Petersburg
A.M. Smirnov - Academician of the Agricultural
Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM,
professor, Moscow

A.A. Sukhinin - professor, DVM, St. Petersburg
A.N. Shikov - professor, DFS, St. Petersburg

Technical Department

V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg
A.V. Rybakova - PhD, St. Petersburg

Sent to 03/10/2015

Signed for printing 14/09/2015

The format of 100 × 70 1/16 .

Glossy paper number 1. Offset printing.

Conv. Pec. liter. 5.2 1.63 fl. incl.

Conv. Cr. - ott . 18.2 . Circulation 1001 copies.

На 1 странице обложки расположено: Мельбурнский университет — государственный университет Австралии, старейший в штате Виктория. Основной кампус университета располагается в Пфрвилле, одном из центральных районов города Мельбурна. В Мельбурнском университете обучаются около 40 000 студентов, персонал — 6 000 человек. Особенно развиты в университете искусство, гуманитарные и биомедицинские науки. Входит в группу самых престижных университетов мира. В рейтинге *Times Higher Education* Мельбурнский университет — лучший в Австралии и Океании.

**НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ
ЖУРНАЛ**

Номер госрегистрации СМИ ПИ № ФС 77-28268 от 18 мая 2007 г. Подписной индекс в агентстве Роспечать 82393.

Учредитель — Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГОУ ВПО «СПбГАВМ»)

Журнал основан в январе 2004 года в Санкт-Петербурге и входит в список ведущих лицензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Журнал распространяется по всем регионам России и Республике Беларусь (ВУЗЫ, НИИ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ ОТДЕЛЫ).

Журнал выходит не менее 4 раз в год. В нем публикуются работы по всем основным вопросам ветеринарии и смежным дисциплинам.

В этот журнал Вы можете поместить рекламу Вашей фирмы. Объявления и коммерческая реклама публикуются после оплаты. Срок исполнения – в течение 3 месяцев.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных объявлений.

При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Мнение авторов и редакции по отдельным вопросам может не совпадать.

Плата с аспирантов за публикацию рукописи не взимается.

Справки и технические возможности типографии, в которой печатается журнал, оговариваются по телефону (812) 387-11-58.

Адрес редакции: 196084, СПб, ул. Черниговская дом 5, СПбГАВМ, редакция журнала «Международный вестник ветеринарии» (МВВ).

**RESEARCH AND PRODUCTION
JOURNAL**

State registration number media PI № FS 77-28268 on May 18, 2007. Subscription Index Rospechat 82393.

Founded in January 2004 by Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint - Petersburg State Academy of Veterinary Medicine " (FSEI- HPE " SPbGAVM")

International Bulletin of Veterinary an academic international peer-reviewed journal that publishes original research articles as well as review articles in veterinary sciences and related academic disciplines. It covers all the scientific and technological aspects of veterinary sciences in general, anatomy, physiology, biochemistry, pharmacology, microbiology, pathology, public health, parasitology, infectious diseases, clinical sciences, alternative veterinary medicine and other biomedical fields.

The manuscripts submitted to this journal must be previously unpublished and not be under consideration for publication elsewhere. Manuscripts that are found to have been plagiarized from a manuscript by other authors, whether published or unpublished, will incur plagiarism sanctions.

This journal, including all individual contributions and illustrations published therein, is legally protected by copyright. Any use, exploitation or commercialisation is illegal and liable to criminal prosecution.

Requests about legal photocopy reproduction, copyright or duplication processing should be addressed to the editorial office:

196084, St. Petersburg, ul . Chernihiv house 5 SPbGAVM, Editorial Board of "International Bulletin of Veterinary Medicine" (IBVM), phone +7-812- 3871158 .

СОДЕРЖАНИЕ

| | | |
|---|--|----|
| Инфекционные болезни | • Профилактические мероприятия в садковых форелевых хозяйствах. <i>Кузнецова Е.В.</i> | 7 |
| Терапия | • Эффективность использования добавок, регулирующих катионно-анионный баланс рациона, для профилактики болезней и повышения продуктивности у коров в послелетельный период. <i>Сенько А.В., Яшин А.В.</i> | 10 |
| Хирургия | • Хирургический метод лечения синуситов у телят. <i>Кукина О.В.</i> | 13 |
| Фармакология, токсикология, фармация | • Алгоритм разработки комбинированных антидиарейных средств. <i>Андреева Н.Л., Соколов В.Д.</i> | 18 |
| | • Ветеринарные препараты на основе наночастиц серебра, модифицированных мирамистином: новые возможности в лечении кошек и собак. <i>Крутяков Ю.А., Климов А.И., Коробкова Е.А., Кузьмин В.А., Лунегов А.М.</i> | 24 |
| | • Изучение аллергических свойств препарата Ципровет-пульмо. <i>Токарева О.А.</i> | 27 |
| | • Распределение ципрофлоксацина в организме цыплят после перорального введения. <i>Заикина Е.Н., Скворцов В.Н., Юрин Д.В.</i> | 30 |
| | • Переносимость и субхроническая токсичность препарата Ципровентор на телятах. <i>Филимонов Д.Н., Павленко Г.И.</i> | 35 |
| | • Строение наночастиц серебра препарата Арговит в зависимости от степени его разведения. <i>Шкиль Н.Н., Бурмистров В.А., Шкиль Н.А.</i> | 39 |
| | • Применение ветеринарного препарата на основе наночастиц серебра для лечения телят с желудочно-кишечными болезнями. <i>Скрипнёва Т.А., Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Забровская А.В., Крутяков Ю.А.</i> | 43 |
| Зооигиена, Санитария, Кормление | • Использование кормовых компонентов с сальмонеллезным бактериофагом против пуллороза птиц. <i>Карамышева Н.Н., Барт Н.Г.</i> | 48 |
| | • Лечение экспериментального колибактериоза цыплят. <i>Заикина Е.Н., Скворцов В.Н., Балбуцкая А.А.</i> | 51 |
| | • Видовое разнообразие представителей рода <i>Staphylococcus</i> , выделенных от домашних и сельскохозяйственных животных с различными гнойно-воспалительными заболеваниями. <i>Балбуцкая А.А., Дмитренко О.А., Войтенко А.В., Скворцов В.Н.</i> | 56 |
| Биохимия, анатомия, физиология | • Острая токсичность Прималактата и влияние его на биохимический статус коров. <i>Брюхова И. В., Шумский Н. И., Масьянов Ю.Н.</i> | 62 |
| | • Гематологические показатели и динамика естественной резистентности поросят после применения бете-каротина. <i>Городилова Л.И.</i> | 66 |
| Экспериментальная фармакология | • Архивирование материалов доклинических исследований как элемент системы качества. <i>Зайцева М.А., Белостоцкий А.В., Пикалова Л.В., Марченко С.Д.</i> | 70 |
| | • Получение диагностических антител, меченных пероксидазой хрена для определения антибиотиков тетрациклинового ряда методом ИФА. <i>Вылегжанина Е.С., Нестеренко И.С., Филиппова К.М., Добрякова Ю.В., Комаров А. А.</i> | 76 |
| | • Моделирование алкогольной зависимости у животных. <i>Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г.</i> | 84 |
| | • Сравнительное токсикологическое изучение носителей для лекарственных средств, применяемых в доклинических исследованиях. <i>Гущина С.В., Макарова М.Н., Пожарицкая О.Н.</i> | 92 |
| | • Экспериментальная фармакокинетика, современные требования, исследования in vitro. <i>Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н.</i> | 98 |

CONTENTS

| | | |
|---|--|-----------|
| Infection disease | • Prevention in the cage trout farms. <i>E. Kuznetsova.</i> | 7 |
| Therapy | • Efficiency of use of the additives regulating cationic and anionic balance of the ration, for prophylaxis of illnesses and efficiency rising at cows during the postnatal period. <i>A.V. Sen'ko, A.V. Yashin.</i> | 10 |
| Surgery | • The surgical treatment of calves sinusitis. <i>O.V. Kukina</i> | 13 |
| Pharmacology, toxicology, pharmacy | • Algorithm of the development combine antidiarrheal drug. <i>V.D. Sokolov, N.L. Andreeva.</i> | 18 |
| | • Use of miramistin stabilized silver nanoparticles in veterinary medicine – new opportunities in treatment of rhinitis of cats. <i>Yu. Krutyakov, A. Klimov, E. Ko-robkova, A. Lunegov, V. Kuzmin.</i> | 24 |
| | • Allergic drug study of properties Ciprovet-pulmo. <i>O. Tokareva.</i> | 27 |
| | • Pharmacokinetics of ciprofloxacin in chickens. <i>E.N. Zaikina, V.N. Skvortzov, D.V. Yurin.</i> | 30 |
| | • Shipping and subchronic toxicity of a preparation Tsiproventor on calfs. <i>D.N. Filimonov, G.I. Pavlenko.</i> | 35 |
| | • Structure of nanoparticles of silver of preparation argovit depending on extent of its cultivation. <i>N. Shkil, V. Burmistrov, N. Shkil.</i> | 39 |
| | • The use of miramistin stabilized silver nanoparticles for the treatment of diseases of the gastrointestinal tract of calves. <i>T. Skripleva, V. Kuzmin, A. Lunegov, A. Zaborovskaya, Yu. Krutyakov.</i> | 43 |
| Zoohygiene, Sanitation, Feeding | • The use of feed ingredients with salmonella bacteriophage against pulloroza birds. <i>N.N. Karamysheva, N.G. Bart.</i> | 48 |
| | • Treatment of experimental avian colibacteriosis. <i>E.N. Zaikina, V.N. Skvortzov, A.A. Balbutskaya.</i> | 51 |
| | • Species diversity of members of the genus staphylococcus isolated from companion and farm animals with different pyoinflammatory diseases. <i>A.A. Balbutskaya, O.A. Dmitrenko, A.V. Voytenko, V.N. Skvortsov.</i> | 56 |
| Biochemistry, anatomy, physiology | • Acute toxicity of primalakt and its influence on the biochemical status of the cows. <i>I.V. Bryukhova, N.I. Shumsky, Y.N. Masyanov.</i> | 62 |
| | • Hematological parameters and dynamics of natural resistance of piglets after beta-carotene supplementation. <i>L.I. Gorodilova.</i> | 66 |
| Experimental pharmacology | • Archiving of material pre-clinical studies as part of the quality system. <i>M.A. Zaitseva, A.V. Belostotsky, L.V. Pikalova, S.D. Marchenko.</i> | 70 |
| | • Production of peroxidase conjugate for the determination of tetracyclines by enzyme-linked immunosorbent assay. <i>E.S. Vylegzhanina, I.S. Nesterenko, K.M. Filippova, J.V. Dobryakova, A.A. Komarov.</i> | 76 |
| | • Modeling of alcohol dependence in animals. <i>V. Kashkin, E. Shekunova, M. Makarova, V. Makarov.</i> | 84 |
| | • A comparative toxicological study of the excipients for drugs used in preclinical studies. <i>S.V. Guschina, M.N. Makarova, O.N. Pozharitskaya.</i> | 92 |
| | • Experimental pharmacokinetics, modern requirements, in vitro studies. <i>M.V. Karolina, O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov.</i> | 98 |



ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ В САДКОВЫХ ФОРЕЛЕВЫХ ХОЗЯЙСТВАХ

Кузнецова Е.В. – к.б.н., заведующий кафедрой аквакультуры, болезней рыб и птиц,
Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины



РЕФЕРАТ

Садковое рыбоводство получило широкое распространение на Северо-Западе РФ. С учетом целого ряда причин в комплексе противоэпизоотических мероприятий в садковом рыбоводстве на первое место выходят профилактические. В период с 1996 по 2015 гг. было исследовано более 20 форелевых рыбоводных хозяйств, треть из них – рыбопитомники. Проведенные исследования в садковых форелевых хозяйствах показали их неблагополучие по целому ряду болезней. Собранные материалы свидетельствуют о том, что с позиции контроля состояния здоровья рыб, садковое рыбоводное хозяйство является открытой системой, мало управляемой и экологически зависимой. Учитывая экологическое разнообразие водоёмов, система профилактических мероприятий в садковом рыбоводстве должна закладываться при разработке РБО хозяйств, с предварительным эпизоотическим обследованием выбранного водоёма ихтиопатологами. При эксплуатации хозяйств крайне важно не допустить завоза возбудителей опасных болезней.

Ключевые слова: болезнь, профилактика, садковые хозяйства.

ВВЕДЕНИЕ

Садковое рыбоводство получило широкое распространение на Северо-Западе РФ. Основными проблемами садковых хозяйств являются загрязнение водоёмов отходами жизнедеятельности рыб с последующим ухудшением экологической обстановки и невозможность проведения в них традиционного для прудового и бассейнового рыбоводства комплекса профилактических и оздоровительных мероприятий. Сведения о болезнях рыб и эпизоотической ситуации в садковых форелевых хозяйствах Северо-запада носят фрагментарный характер [2,3]. В результате ещё не разработано представление (концепция) о путях формирования и поддержания эпизоотического очага в условиях холодноводных (форелевых) рыбоводных садковых хозяйств и, как следст-

вие, основ проведения в них профилактических мероприятий.

С учетом целого ряда причин (трудности в своевременной диагностике, невозможности обработки рыб лечебными препаратами непосредственно в садках, воздействие на рыб в садках неблагоприятных природных факторов и др.) в комплексе противоэпизоотических мероприятий в садковом рыбоводстве на первое место выходят профилактические. В их основу должны быть положены научно-обоснованные рекомендации, разработка которых возможна только после многолетних исследований в полносистемных форелевых хозяйствах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 1996 по 2015 гг. было исследовано более 20 форелевых рыбоводных хозяйств, треть из них – рыбопитом-

ники. Водоёмы, на которых расположены форелевые хозяйства, различны в экологическом отношении. Садковые хозяйства отличаются также по форме собственности, объёму производства, технической оснащённости, источникам посадочного материала и др. Температуру воды и уровень кислорода в садках измеряли термооксиметром. С помощью химических экспресс-тестов оценивали уровень нитритов, нитратов и рН. Непосредственно на базе хозяйств были проведены паразитологические, патологоанатомические, гематологические исследования рыб и отбор проб для микробиологического исследования. Отбирали только живых рыб разных возрастных групп. Идентификация возбудителей, определение уровня обсеменения и чувствительность к лечебным препаратам проводилась в ФГУ «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У радужной форели зарегистрировано пять вирусов, способных вызывать 100 % гибель рыб, особенно опасных для молоди [4]. О распространении вирусных болезней в форелевых садковых хозяйствах судить крайне сложно, так как регулярных исследований уже давно не проводилось. Это в первую очередь связано с отсутствием государственного финансирования. В то же время необходимость подобных исследований крайне актуальна на фоне периодически возникающих случаев гибели рыб в разных хозяйствах и их массовых перевозках при наличии сопровождающих документов, в которых информация о вирусных болезнях отсутствует.

Несмотря на возможность проведения бактериологических исследований рыб в ветеринарных лабораториях в последние годы они проводятся не регулярно. В ходе наших исследований во всех форелевых хозяйствах во все сезоны года были обнаружены рыбы с клиническими при-

знаками флавобактериозов. Вспышка стрептококкоза у молоди форели была отмечена летом 2011 года в одном хозяйстве. Хроническое течение болезни сопровождалось поражением глаз рыб. Провоцирующим фактором стала высокая температура воды. Такие опасные бактериальные болезни форели, как фурункулоз, бактериальная почечная болезнь и йерсиниоз в последние годы в садковых рыбоводных хозяйствах не регистрировались.

Из микозных болезней форели наиболее распространённым является сапролегниоз. Весной у части самцов маточного стада отмечалось поражение сапролегниозом с разной степенью тяжести, что можно объяснить их крайним физиологическим истощением после зимней нерестовой компании. С повышением температуры и началом активного питания большинство рыб выздоравливало.

Все обследованные форелевые хозяйства оказались неблагополучны по паразитарным болезням. В первую очередь следует отметить триенофороз, вызываемый плероцеркоидами цестод *Trienocephalus crassus* и *T. nodulosus*. Уровень заражения гельминтами сеголетков в обследованных садковых хозяйствах варьировал в пределах 0,5–2,0 %, т.е. был небольшой при низкой интенсивности инвазии. Другой паразит - личинки трематод рода *Diplostomum* в двух хозяйствах оказались массовыми у мальков форели. Их численность была достаточно высокой и достигала 30 метацеркарий в обоих глазах, что приводило к частичному разрушению хрусталиков. В целом, заражённость рыб в садковых хозяйствах была небольшой. Максимум инвазии рыб диплостомидами в хозяйствах был отмечен в конце сентября. Выявлено резкое снижение опасности протозойных болезней форели (ихтиофтириоз, костииоз, триходиниоз). Причина заключается в том, в последние годы в садки, устанавливаемые на значи-

тельном расстоянии от береговой линии и на большой глубине, высаживают крупную молодь форели (от 10 г. и выше) [1]. В ходе наблюдений было установлено, что аргулоз представляет потенциальную опасность для форелевых садковых хозяйств. На рыбе рачок был встречен летом при прогревании воды до 20°C и выше с экстенсивностью инвазии менее 1%.

К алиментарным болезням форели в садковых хозяйствах следует отнести ожирение. Наличие у форели большого количества полостного жира (особенно у крупных рыб), а также светлый цвет печени объясняется их избыточным кормлением. Это приводит к липоидной дегенерации клеток печени рыб, что проявляется изменением цвета органа и подтверждается при гистологическом исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время основным и крайне серьезным упущением ветеринарной службы страны следует признать отсутствие открытой информации о распространении болезней рыб и регулярных диагностических исследований. В то же время проведенные исследования в садковых форелевых хозяйствах показали их неблагополучие по целому ряду болезней. Собранные материалы свидетельствуют о том, что с позиции контроля состояния здоровья рыб, садковое рыбоводное хозяйство является открытой системой, мало управляемой и экологически зависимой. Оно находится под прямым влиянием абиотических и биотических факторов водной среды, включая гидрологические и гидрохимические показатели, возбудителей инфекционных и паразитарных болезней и их промежуточных хозяев т.п. Учитывая экологическое разнообразие естественных и искусственных водоёмов, система профилактических мероприятий в садковом рыбоводстве должна закладываться при разработке РБО хозяйств, с предварительным эпизоотическим обследо-

ванием выбранного водоёма ихтиопатологами. При эксплуатации хозяйств крайне важно не допустить завоза возбудителей опасных болезней.

Prevention in the cage trout farms.

E. Kuznetsova.

ABSTRACT

A net cage rearing of fish is a modern direction of aquaculture. Aquaculture development inevitably entails increased fish diseases problems. The materials for this research were collected in more than 20 trout fish cage farms. The materials collected indicate that, from a position of control fish health, fish farming cage is an open system, there is little controlled and environmentally dependent. The maintaining the good epizootic condition of the fish farms needs rational planning of sanitary and prophylactic measures.

Key words: disease, prevention, cage farms.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронин В.Н., Кузнецова Е.В., Чернышева Н.Б. Важность экологического подхода в комплексе профилактических мероприятий при садковом рыбоводстве // Тез. докл. Межд. научно-практической конф. «Мировые тенденции развития аквакультуры и современные методы переработки водных биоресурсов». -М. -2010: -С. 32-33.
2. Евсеева Н.В. Состояние и перспективы ихтиопатологических исследований в аквакультуре Карелии // Материалы научной конференции «Садковое рыбоводство». -Петрозаводск. -2008. -С. 68-71.
3. Куденцова Р.А., Юнчис О.Н., Воронин В.Н. Бактериальные заболевания лососевых, вызываемые *Flavobacterium psychrophilum* // Рыбное хоз-во, ВНИЭРХ, серия «Болезни гидробионтов в Аквакультуре». -М. -2000. -Вып. 3. -С. 1-10.
4. Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases // Ithaca, NY: Cornell University Press. -1988.



ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДОБАВОК, РЕГУЛИРУЮЩИХ КАТИОННО-АНИОННЫЙ БАЛАНС РАЦИОНА, ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ У КОРОВ В ПОСЛЕОТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Сенько А.В. - к.в.н., докторант кафедры внутренних болезней животных
Яшин А.В. – д.в.н., профессор, зав. кафедрой внутренних болезней животных
Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины



РЕФЕРАТ

Объектом исследований были коровы черно-пестрой породы, содержащиеся в условиях СПК «ЩучинАгропродукт».

Для оценки эффективности применения кормовых добавок в рационах коров были сформированы две группы животных по принципу пар-аналогов: контрольная и опытная, по 30 голов в каждой группе.

Первая группа была контролем, животные этой группы получали корма без добавок регулирующих катионно-анионный баланс (КАБ), второй группе дополнительно скармливали разработанные нами специальные добавки для групп раздоя: «ТурбоСтрат», «МегаВит» и сухостоя «ВитаАнион» производства ООО «Биоком» РБ.

В сухостойный период использовали анионную кормовую профилактическую добавку «ВитаАнион», а в период раздоя белково-катионную «ТурбоСтарт» и катионную «МегаВит» в период раздоя и дальнейший период лактации и первый период сухостоя.

После завершения опыта проводили анализ эффективности коррекции КАБ рациона путем постановки индивидуального диагноза на гипокальциемию и ее наиболее частое осложнение – гипомагниемию.

Установлено, что проведение коррекции КАБ рациона позволила снизить скрыто протекающую гипокальциемию и гипомагниемию у коров в послеотельный период на 43,3% и 50%. Анализ показателей биохимического анализа крови показал, что часть метаболитов имели достоверное отличие между опытной и контрольной группой, но при этом находились в пределах физиологических колебаний. Обращает на себя внимание показатель содержания кальция в крови коров опытной и контрольной групп. Он достоверно ($p < 0,001$) снижен в контрольной группе на 1,4 ммоль/л и выходит на минимальный предел физиологических колебаний. Аналогичная тенденция отмечается и при анализе на содержание магния в крови опытной и контрольной групп. Его содержание в контрольной группе составило 0,7 ммоль/л, что на 0,3 ммоль/л меньше чем в опытной группе. Анализ хозяйственных показателей показал на высокую эффективность добавок. Так, применение добавок позволило уменьшить непроизводительное выбытие коров на 23,3 %, заболеваемость эндометритами на 14,6 % и увеличить среднесуточный удой на 4,2 л/гол.

Ключевые слова: катионно-анионный баланс (КАБ), гипокальциемия, гипомагнемия, гепатодистрофия, кислотно-щелочной баланс, анионы серы и фосфора, кислотно-щелочной баланс, биодоступность, сухостойный период.

ВВЕДЕНИЕ

Результаты мониторинга болезней высокопродуктивных коров свидетельствуют о том, что основная масса проблем со здоровьем животных возникает в течение первых двух месяцев после отёла. Потребность высокопродуктивных коров в питательных веществах не всегда удаётся обеспечить за счёт кормов, поэтому животные используют резерв, накопленный в сухостойный период. Недостаток энергии объясняется тем, что животные при резком увеличении молокоотдачи после отёла не в состоянии поесть необходимое количество качественного корма, что бы в полной мере компенсировать энергетические затраты. Повышенное использование запасов организма вызывает метаболические нарушения, приводящие к быстрому снижению живой массы, уменьшения удоя и ухудшения общего физиологического состояния. В связи с чем появляются массовые заболевания и большой процент выбытия животных [1,2,3,4]. С целью обеспечения высокопродуктивных коров питательными веществами, необходимо вводить в рацион комплексные добавки в соответствии с физиологическими потребностями организма.

В связи, с вышеизложенным, целью нашего исследования является изучить эффективность использования комплексных добавок для профилактики нарушений обмена веществ у коров в послеродовой период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2010-2013 гг. в СПК «ЩучинАгропродукт» Щучинского района Гродненской области. Объектом исследований были коровы черно-

пестрой породы.

Для оценки эффективности применения кормовых добавок в рационах коров были сформированы две группы животных по принципу пар-аналогов: контрольная и опытная, по 30 голов в каждой группе.

Первая группа была контролем, животные этой группы получали корма без добавок регулирующих катионно-анионный баланс (КАБ), второй группе дополнительно скармливали разработанные нами специальные добавки для групп раздоя: «ТурбоСтрат», «МегаВит» и сухостоя «ВитаАнион». При разработке кормовых профилактических добавок учитывали, что теоретически все катионы и анионы кормов способны оказывать влияние на ионную разницу крови.

Разница между количеством катионов и анионов, абсорбированных из кормов, определяет ряд биохимических показателей крови. Концентрацию этих ионов принято выражать в миллиэквиваленте на килограмм сухого вещества рациона. Ее подсчитывают только для концентрации Na^+ , K^+ , Cl^- и S^- , исходя из общепризнанного уравнения [4]:

$$\text{КАБ мгэкв/кг СВ} = [(\% \text{Na} \times 0,0023 + \% \text{K} \times 0,0039) - (\% \text{Cl} \times 0,00355 + \% \text{S} \times 0,0016)]$$

Биохимические исследования проводились в научно-исследовательской лаборатории УО «ГГАУ» на автоматическом биохимическом анализаторе DIALA-VAutolyzer. Полученный цифровой материал был подвергнут статистической обработке с использованием методов вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью коррекции КАБ рационов до и после родов использовали специализированные добавки производства ООО «Биоком». В сухостойный период использовали анионную кормовую профилактическую добавку «ВитаАнион», а в период раздоя

Заболееваемость гипокальциемией и гипомагниемией в опытной и контрольной группах

| Болезнь | Контрольная группа, n=30 | | Опытная группа, n=30 | |
|----------------|--------------------------|----|----------------------|------|
| | Гол. | % | Гол. | % |
| Гипокальциемия | 18 | 60 | 5 | 16,7 |
| Гипомагниемия | 18 | 60 | 3 | 10 |

белково-катионную «ТурбоСтарт» и катионную «МегаВит» в период раздоя и дальнейший период лактации и первый период сухостоя

После завершения опыта проводили анализ эффективности коррекции КАБ рациона путем постановки индивидуального диагноза на гипокальциемию и ее наиболее частое осложнение - гипомагниемии (табл.1).

Из данных таблицы видно, что коррекция КАБ рациона позволила снизить скрыто протекающую гипокальциемию и гипомагниемии у коров в послеродовой период на 43,3% и 50%. Так, если до коррекции КАБ рациона в стаде отмечалось до 18 случаев проявления гипокальциемии и гипомагниемии из 30 голов, то после проведения коррекции КАБ рациона эти показатели снизились на 13 и 15 голов соответственно.

При биохимическом анализе крови установили, что часть показателей имели достоверное отличие между опытной и контрольной группой, но при этом находились в пределах физиологических колебаний.

Обращает на себя внимание показатель содержания кальция в крови коров опытной и контрольной групп. Он достоверно ($p < 0,001$) снижен в контрольной группе на 1,4 ммоль/л и выходит на минимальный предел физиологических колебаний. Аналогичная тенденция отмечается и при анализе на содержание магния в крови опытной и контрольной групп. Его содержание в контрольной группе составило 0,7 ммоль/л, что на 0,3 ммоль/л меньше, чем в опытной группе. Анализ

хозяйственных показателей показал на высокую эффективность применения добавок в хозяйстве.

Установлено, что применение добавок, позволяет уменьшить непродуцированное выведение коров на 23,3 %, заболеваемость эндометритами на 14,6 % и увеличить среднесуточный удой на 4,2 л/гол.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что проведение коррекции КАБ рациона позволила снизить скрыто протекающую гипокальциемию и гипомагниемии у коров в послеродовой период на 43,3% и 50%. Анализ показателей биохимического анализа крови показал, что часть метаболитов имели достоверное отличие между опытной и контрольной группой, но при этом находились в пределах физиологических колебаний. Обращает на себя внимание показатель содержания кальция в крови коров опытной и контрольной групп. Он достоверно ($p < 0,001$) снижен в контрольной группе на 1,4 ммоль/л и выходит на минимальный предел физиологических колебаний. Аналогичная тенденция отмечается и при анализе на содержание магния в крови опытной и контрольной групп. Его содержание в контрольной группе составило 0,7 ммоль/л, что на 0,3 ммоль/л меньше, чем в опытной группе. Анализ хозяйственных показателей показал на высокую эффективность добавок.

Efficiency of use of the additives regulating cationic and anionic balance of the ration, for prophylaxis of illnesses and efficiency rising at cows during the post-natal period.

A.V. Sen'ko, A.V. Yashin.

ABSTRACT

We studied the efficiency of complex additives for the prevention of metabolic disorders in cows in the period after calving. Found that the prophylactic use of feed additives "VitaAnion" "TurboStrat" and "MegaVit" CAB correction diet reduces postnatal hypocalcaemia 43,3%, and reduce the frequency of occurrence of hypomagnesaemia 50%, which reduces non-productive cows outflow 23,3% and reduces the incidence of endometritis by 14,6% and increases the productivity of the animals on the 4,2 l.

Key words: cationic and anionic balance (CAB), feed additives, prophylactic metabolic disorders, hypocalcemia, hypomagnesiemia, gepatodistrofiya, drycow.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куртяк Б.М. Особливості обміну речовин в організмі корів у передродовий і після родовий періоди тароль вітамінів А,

В і Е [Текст] :Автореф. дис. Наздобуття наук. ступеня д-ра вет. наук: спеціальність – 03.00.04. Біохімія” / Б.М. Куртяк – Львів. -2006. –29с.

2. Леньо М.І. Кислотно-основний баланс у здорових та хворих на кетоз корів: Автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спеціальність – 16.00.01 „Діагностика і терапія тварин” / М.І. Леньо. – Біла Церква. -2006. –22с.

3. Dietary Cation-Anion Difference Effects on Performance and Acid-Base Status of Dairy Cows Postpartum [Text] / W. Hu, M.R. Murphy, P.D. Constable, and E. Block // J. Dairy Sci. –2007. –Vol. 90, № 7. – P. 3367–3375. –Bibliog. : 33 title –P. 3374–3375

4. Riond J.-L. Animal nutrition and acid-base balance [Text] / J.-L. Riond // Eur. J. Nutr. –2001. –Vol. 40. -№ 5. –P. 245–254. –Bibliog. : 87 title – P. 252–254



ХИРУРГИЯ

УДК:616.216:636.2-053.31

ХИРУРГИЧЕСКИЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ СИНУСИТОВ У ТЕЛЯТ

Кукина О.В. – к.в.н., ассистент кафедры общей хирургии,
Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины



РЕФЕРАТ

Верхние дыхательные пути являются воротами для проникновения в организм условно-патогенной и патогенной микрофлоры. Особую значимость в этом вопросе имеет начальная часть верхних дыхательных путей – нос и околоносовые пазухи.

Воспалительные процессы такой, сравнительно большой пазухи, как верхнечелюстная, не всегда распознаются и приносят большой экономический ущерб. Трудности в диагностике и лечении связаны с полиэтиологичностью заболевания. В этой связи изыскание новых эффективных препаратов, методов лечения и профилактики ранних респираторных болезней новорожденных животных остается актуальной задачей ветеринарной науки.

В статье приведены результаты по разработке хирургического доступа к верхнечелюстной пазухе у телят раннего постнатального онтогенеза, для получения смыва со слизистой пазухи и введения комплексного лекарственного раствора в полость пазухи с ле-

чебной целью.

Представлена информация о динамике гематологических, биохимических показателей, а также показателей естественной резистентности и иммунной реактивности организма телят при верхнечелюстном синусите и их динамика после внутривенного введения лекарственных препаратов. Основными компонентами лекарственного раствора явились: ариветин, 0,5% раствор метрогила и 0,5% раствор новокаина. Исследования были проведены на телятах черно-пестрой породы, в возрасте 4-6 недель с массой тела от 40 до 60 кг.

Проведенные нами исследования доказывают, что верхнечелюстной синусит телят это не местный воспалительный процесс, а заболевание всего организма как единого целого, развивающееся на ранних этапах жизни животных, характеризующееся значительными изменениями в крови, в частности изменения указывают на развивающийся иммунодефицит.

Лечение больных телят при верхнечелюстном синусите методом введения в полость верхнечелюстной пазухи комплексного лекарственного раствора способствует нормализации морфологического состава крови, повышению процента нейтрофилов, повышению активности фагоцитов, увеличению концентрации иммуноглобулинов, повышению бактерицидной и лизоцимной активностей в сыворотке крови.

Ключевые слова: верхнечелюстной синусит, телята, пазуха, воспаление, диагностика, пункция, лечение.

ВВЕДЕНИЕ

На слизистой оболочке верхних дыхательных путей имеется сапрофитная микрофлора, потенциальная вирулентность которой уравнивается защитными приспособлениями макроорганизма [1]. При стрессовых состояниях это равновесие нарушается и на фоне ослабления организма, симбиотная микрофлора выступает в роли патогенного агента, обуславливая возникновение воспалительного процесса [3]. Однако основная роль в возникновении синуситов принадлежит экзогенной инфекции, которая может попадать в пазуху из полости носа - через естественное отверстие, гемато - и лимфогенными путями [5].

Показатель эвакуаторной способности околоносовых пазух у крупного рогатого скота незначительно изменяется от момента образования у плодов и до окончательного формирования у взрослых животных, а значит, истечение экссудата через естественное отверстие у молодняка совершается легче, нежели у взрослых. Хорошо развитая сеть лимфатических сосудов в слизистой оболочке верхне-

челюстной пазухи позволяет использовать ее для всасывания лекарственных веществ, введенных в ее полость [8].

Выводящая способность слизистой оболочки пазухи при острых синуситах проходит в период от нескольких дней, до нескольких недель, а при хронических - от нескольких недель, до нескольких месяцев. Таким образом, это свойство задержки эвакуации можно использовать для депонирования лекарственных веществ, при введении в полость пазухи. Наиболее достоверный диагностический прием при синусите - пробный прокол пазухи (пункция). Причем пункция может быть использована не только как диагностический прием, но и как лечебное мероприятие [2,6].

При внутривенном введении антибиотиков всасывание идет медленнее по сравнению с внутримышечным и они дольше сохраняются в организме телят [4,9]. Таким образом, создается депо препарата, что пролонгирует его лечебную концентрацию в крови в течение нескольких дней. Такой способ введения антибиотиков рационален, препятствует раз-

витию устойчивых форм возбудителей, не дает негативных явлений на организм телят, позволяет увеличить интервалы между инъекциями от 2-ух до 3-ех суток, а также прост, безопасен и легко выполняем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа по изучению лечебной эффективности введения комплексного лекарственного раствора в полость верхнечелюстной пазухи телят проводили в зимне-весенний период на телятах с клиническими признаками воспаления верхнечелюстной пазухи, в возрасте 4-6 недель с массой тела от 40 до 60 кг, черно-пестрой породы. По принципу аналогов были сформированы две подопытные группы животных (n=10) и контрольная - из клинически здоровых телят (n=10).

Первая подопытная группа больных телят подвергалась лечению путем внутримышечного введения комплекса лекарственных веществ. Для этого выполняли пункцию верхнечелюстной пазухи с последующим введением раствора лекарственных препаратов: 0,5%-ный раствор метрогила-5мл, стимулятор лейкопоза – ариветин 50нг (1мл) и до полного шприца в 10мл набирали 0,5%-ный раствор новокаина.

Вторая подопытная группа телят не подвергалась лечению. И служила контролем изменений показателей крови и смывов со слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи при развитии воспалительного процесса в ней без лечения. У всех телят взятие проб крови проводили до введения раствора лекарственных препаратов и на 3, 5, 7 и 14 сутки от начала лечения. Введение лекарственного вещества в верхнечелюстную пазуху осуществляли дважды (повторное на пятые сутки после первого).

Прокол пазухи осуществляли иглой внутривенного катетера №3 через кожу нижнего века, отступив от внутреннего угла глаза на 1,0-1,5 см с направлением

иглы на нижний край ноздри противоположной стороны. При проколе основания глазницы ощущался легкий треск и провал иглы в полость (в этом возрасте у телят основание глазницы еще практически не окостеневшее).

Для того чтобы получить смыв со слизистой оболочки пазухи, не вынимая иглы, через ее просвет вводили катетер диаметром 1,3 мм длиной 135 мм и сначала делали пробную аспирацию на наличие содержимого в пазухе. Чаще всего аспирированный экссудат представлял собой мутную жидкость сероватого цвета тягучей консистенции, порой с взвесью хлопьев фибрина в количестве от 5,0 до 10,0 мл. У отдельных телят содержимое обнаруживалось в обеих пазухах.

Если содержимое не поступало в шприц, то через катетер в пазуху вводили 5,0 см³ стерильного 0,9%-го раствора натрия хлорида. После чего аспирировали жидкость обратно в шприц и, не отсоединяя шприца, вновь вводили в пазуху. Таким образом, поступали пять раз и в результате получали ~ 4,0 см³ смыва из пазухи.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении клинических и лабораторных исследований в подавляющем большинстве случаев мы наблюдали следующее развитие клинических признаков верхнечелюстного синусита у телят в возрасте 1,0-1,5 месяца: явления лихорадки, общее угнетение, слабость, одышка и сопящее дыхание, усиление деятельности сердца. Отмечали одностороннее истечение экссудата из носовой полости, наличие с этой же стороны слезотечения или подсохших корочек возле глаз, нередко был дерматит с выпадением шерсти, образованием корочек и «гношной дорожки» на щеке и дерматит на носогубном зеркальце и особенно вокруг ноздрей в виде покраснения и шелушения, вплоть до повреждений в виде эрозий.

Одни из указанных признаков были

выражены сильнее, другие – слабее или вовсе отсутствовали.

Одновременно с этим в крови регистрировался слабо выраженный общий лейкоцитоз, анемия. В лейкограмме отмечалась нейтропения с достоверным снижением количества сегментоядерных ($p < 0,01$) и увеличением палочкоядерных ($p < 0,001$) нейтрофилов, на фоне умеренного моноцитоза и лимфоцитоза. Базофилы практически не обнаруживались. Эозинофилы встречались лишь в единичных случаях.

Биохимические изменения проявлялись уменьшением уровня общего белка сыворотки крови при значительном повышении альбуминов ($p < 0,001$) и существенном снижении всех глобулиновых фракций в сыворотке крови.

Также у больных телят мы отмечали снижение показателей естественной резистентности организма (лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови), уменьшение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови и достоверное снижение всех показателей фагоцитоза.

В смывах со слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи от больных телят нами было отмечено повышение показателей содержания иммуноглобулинов классов А, IgM ($p < 0,01$), IgG₁ ($p < 0,001$) и снижение содержания IgG₂. А также было установлено достоверное снижение лизоцимной активности смыва ($p < 0,01$) при повышенной бактерицидной активности ($p < 0,05$). Полученные нами данные свидетельствуют о развивающемся иммунодефиците у больных телят.

В процессе проводимого лечения при клиническом обследовании было установлено, что у больных телят первой подопытной группы подвергавшихся лечению внутриполостным введением лекарственных препаратов на первый и пятый день опыта аппетит улучшался уже с третьего дня от начала опыта, они были более подвижными, активными, начиная

с третьего-четвертого дня отмечалось просветление и уменьшение носовых истечений, к седьмым-восьмым суткам опыта носовые истечения полностью исчезали. Температура тела у телят этой группы находилась в диапазоне $39,2 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, пульс – $100,7 \pm 4,6$ ударов в минуту и количество дыхательных движений за минуту составило $20,7 \pm 3,1$.

В то время как у телят второй подопытной группы, у которых процесс развивался дальше и через пять-шесть дней у этих телят появляются признаки повреждения нижних отделов дыхательной системы. Температура тела таких телят имела значение $39,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, пульс учащался до $110,7 \pm 6,4$ ударов в минуту, количество дыхательных движений составляло $28,0 \pm 4,8$ в минуту.

В результате внутримышечного введения лекарственного раствора у телят было отмечено повышение уровня лизоцимной активности, а также значительное ($p < 0,01$) увеличение уровня бактерицидной активности в смывах со слизистой верхнечелюстной пазухи. Причем процент повышения показателей в смывах был значительно выше, нежели процент изменения показателя в сыворотке крови. Также содержание иммуноглобулина А, важного фактора защиты слизистой оболочки в смывах телят подвергнутых лечению оставалось на конец опыта повышенным в 3 раза в сравнении с показателем у здоровых телят. Следовательно, местное применение лекарственных средств при лечении синуситов имеет хорошие результаты в повышении местных гуморальных факторов защиты слизистой оболочки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хирургическое лечение верхнечелюстного синусита у телят методом введения в полость верхнечелюстной пазухи комплексного лекарственного раствора содержащего антисептический, иммуностимулирующий и патогенетический ком-

поненты способствует сокращению сроков выздоровления, нормализации морфологического состава крови, и повышению основных показателей естественной резистентности организма телят.

The surgical treatment of calves sinusitis.

O.V. Kukina

ABSTRACT

The upper respiratory tract is the way for penetrating of conditionally-pathogenic and pathogenic microorganisms into the organism. The initial part of the upper respiratory tract, and namely the nose and the paranasal sinuses, are of great importance in this aspect.

Inflammatory processes of such a rather big sinus as maxillary are not always revealed and bring to great economic losses. Difficulties of diagnostics and treatment are connected with polyetiology of the disease. Thus, finding new effective preparations, treatment methods and prevention of early respiratory diseases among newborn cattle (calves) remain to be an urgent task for veterinary.

In the suggested article, the results in development of surgical approach to the maxillary sinus of calves of early postnatal ontogeny in order to get the smear from the sinus and input complex drug solution into the sinus cavity for treatment are shown.

Which is presented, is the information about the progress of hematological biochemical indices as well as these of organism natural resistance and immune reactivity of the calves suffering from siagonantritis. The progress after intracavitary input of drug preparations is observed. The main components of the drug preparation were: arivetin, 0.5% metrogil solution and 0.5% Novocaine solution. The research was held with calves of black-variegated breed of 4-6 weeks growth weighing from 40 to 60 kilos.

The research we have carried out prove that siagonantritis of calves is not a local inflammatory process but the disease of the

organism as a whole, which develops on early phases the cattle life and is characterized with considerable changes in blood, in particular, these changes point to the developing immunodeficiency.

Treating the calves suffering from maxillary sinusitis by means of input the complex drug preparations into the sinus cavity assists to normalization of blood morphological composition, increase of neutrophil percentage and phagocytes activity, rising of immunoglobulin concentration, increase of bactericidal and lysozyme activity in blood serum.

Key words: maxillary sinusitis, calves, sinus, inflammation, diagnostics, puncture, treatment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белкин Б.Л. Влияние микроклимата на физиологические функции телят // Ветеринария. -1998. -№7. -С.52-54.
2. Бычай Г.А., Мелешков Ф.С. Оперативные доступы к верхнечелюстной пазухе (через костный слезный пузырь) // Земля сиб., дальневосточная. -1984. -Т.12. -С.42.
3. Васильев М.Ф. Иммунологические основы комплексного лечения больных кетозом коров и родившихся от них телят: Дис...докт. вет. наук: 16.00.01. -СПб. -1996. -392с.
4. Дадыбаев Ж.М. Некоторые показатели клеточных и гуморальных факторов иммунитета у телят, больных респираторными заболеваниями // Вклад мол. уч. и спец. в научно-технический прогресс в с.-х. пр. -Фрунзе. -1990. -ч.2. -С.10-11.
5. Золотарева А.И. Ранняя диагностика бронхита у новорожденных телят // Ветеринария. -2013. -№3. -С. 43-47.
6. Ковалев С.П. Показатели иммунитета у больных анемией телят // Мат. науч.-практ. кон. по актуальным проблемам вет. и зоотехнии. -Казань. -2001. -С. 21-23.
7. Соколова Л.Н. Комбинированная антибактериальная терапия при болезнях дыхательных путей и критерии эффективности лечения // Актуальные проблемы вет. мед.: сб. науч. тр.- СПб., 2010.- №141.-

С.45-49.

8. Федоров Ю.Н., Верховский О.А. Иммунодефициты домашних животных. -М. -1996. -95с.

9. Ndoutamia G. Determination des parame-

tres hematologiques et biochimiques des petits ruminants du Tchad // Revue Med. Vet. -2005. -Т.156. -№4. -Р. 202-206.



ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ, ФАРМАЦИЯ

УДК619:615

АЛГОРИТМ РАЗРАБОТКИ КОМБИНИРОВАННЫХ АНТИДИАРЕЙНЫХ СРЕДСТВ

Андреева Н.Л.- д.б.н., профессор, зав. кафедрой,
Соколов В.Д.- д.в.н., профессор кафедры фармакологии и токсикологии,
Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины



РЕФЕРАТ

Разработка эффективных комбинированных лекарственных средств является существенным дополнением при создании новых лекарственных препаратов. Особенно это важно в период импортзамещения лекарств, которых как и отечественных продуктов питания явно недостаточно. На кафедре фармакологии и токсикологии СПбГАВМ на протяжении ряда лет с успехом проводится создание новых комбинированных лекарственных средств при различных патологиях животных. При этом, используются специальные алгоритмы, позволяющие более полно и последовательно учесть все стадии создания новых препаратов. Эти алгоритмы содержат от 11 до 15 позиций. Причем, с появлением новых знаний, совершенствуются и сами алгоритмы. Например, алгоритм по разработке антидиарейных средств содержал в начале 7 позиций, сейчас – 11. Алгоритм включает в себя проработку параметров патогенеза болезни и используемых лекарственных средств. Диарин сравнивали с наиболее эффективным и востребованным антидиарейным средством «Лерс». Так был разработан антидиарейный препарат «Диарин», который и в настоящее время является одним из лучших при лечении желудочно-кишечных болезней молодняка с/х животных и плотоядных. В течение недавних 5-и лет по этой же схеме разработали еще 2 новых антидиарейных средства – энтерин и витацид. Которые оказались также эффективнее, чем средства, используемые в хозяйствах.

Ключевые слова: диарея, лекарственные средства, алгоритм.

ВВЕДЕНИЕ

Диареи молодняка с/х и других животных, особенно телят, до настоящего времени встречаются повсеместно. Лучшим средством борьбы с ними является выявление и устранении причины, что не все-

гда возможно из-за полиэтиологичности этой болезни, наличия многочисленных предрасполагающих факторов, в том числе еще в утробе матери, отрицательно влияющих на устойчивость будущего теленка [1]. По литературным данным и

собственным клиническим наблюдениям патогенезу многих диарей у телят присущи резкое изменение моторной и секреторной функции желудочно-кишечного тракта – первая усиливается, вторая ослабевает, что приводит к различным нарушениям, как в кишечнике, так и во всем организме. Нарушение процессов всасывания, изменение микробного пейзажа (в сторону увеличения гнилостной микрофлоры) приводит к неполному усвоению питательных веществ корма, их гниению, образованию кормовых и микробных токсинов. С развитием диареи происходит обезвоживание организма и усиление интоксикации. Организм, стремясь уменьшить возникшие нарушения гомеостаза «отвечает» различными реакциями, в том числе воспалительной, аллергической, иммунной и другими с увеличением выработки медиаторов (гистамин, серотонин, циклооксигеназа, брадикинин и др.), активацией холинергической системы и факторов специфической и неспецифической защиты, что в свою очередь может не только сгладить, но и активировать патологический процесс. Все это проявляется хорошо известными симптомами – диареей, повышением (иногда наоборот снижением) температуры тела, учащением сердцебиения, дыхания, слабостью и т.д. Эти явления патогенеза в свое время мы условно назвали патологические мишени. При проведении лечебно-профилактических мероприятий необходимо устранение выявленных причин (пусть даже далеко не всех) и назначение эффективных антидиарейных средств, которых и в настоящий день явно недостаточно (именно эффективных). В практике для этих целей используются различные фармакологические средства: антибиотики, пробиотики, солевые растворы, препараты из растений и т.д. Арсенал таких средств весьма велик, эффективность различная, как и затраты, в том числе, и рабочего времени [1,6,13,3, 4,5,8,

11,14]. В этой связи разработка новых эффективных антидиарейных средств весьма актуальна и отвечает запросам производства. Тем более, что в современном лекарствоведении существуют и не ослабевают две основные проблемы – снижение эффективности и повышение побочного действия лекарственных средств [10,12,13,15,16]. В этих целях целесообразно использовать специальные алгоритмы, которые позволяют более детально и последовательно продумать все необходимые стадии разработки нового лекарственного средства [12,13]. Практика показывает (об этом красноречиво говорят материалы наших фармакологических форумов), что за последние 5-7 лет в этих структурах энтузиастами разработано много различных лекарственных средств, однако большинство из них так и остались научными разработками, используемые в лучшем случае для отчетов внутри ВУЗов. Причин две – всего один контролируемый монопольный ветеринарный орган в Москве на всю необъятную Россию, и высокая стоимость экспертизы - 250000 рублей. У кого из педагогов, да и у научных сотрудников НИИ найдутся такие средства? Мы не ставили вопрос о том, что контроль и экспертизу лекарственных препаратов не только можно, но и давно нужно проводить на местах, где имеется достаточный научный фармакологический и токсикологический потенциал [12,13]. Практика показывает (об этом красноречиво говорят материалы наших фармакологических форумов), что за последние 5-7 лет в этих структурах энтузиастами разработано много различных лекарственных средств, однако большинство из них так и остались научными разработками, используемые в лучшем случае для отчетов внутри ВУЗов. Причин две – всего один контролируемый монопольный ветеринарный орган в Москве на всю необъятную Россию, и высокая стоимость экспер-

тизы - 250000 рублей. У кого из педагогов, да и у научных сотрудников НИИ найдутся такие средства? Мы не раз ставили вопрос о том, что контроль и экспертизу лекарственных препаратов не только можно, но и давно нужно проводить на местах, где имеется достаточный научный фармакологический и токсикологический потенциал [12,13]. С общероссийской программой импорт замещения это просто необходимо делать, и значительно снизить стоимость проводимых экспертиз или вообще проводить их бесплатно, как было в Союзе. На местах это вполне возможно. Тем не менее, пока этот вопрос не решается, новые эффективные лекарственные средства разрабатывать надо. По нашему мнению возможно два подхода для решения этой проблемы. В мегаполисах необходимо кооперироваться с крупными научными центрами химической или биологической промышленности, прецеденты в этом плане имеются. Во втором случае упор следует сделать на комбинированные лекарственные средства [5,8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В идеальном варианте, при разработке антидиарейного средства, необходимо учитывать, если не все, то основные патологические мишени. Исходя из этиопатогенеза, созданный препарат, прежде всего, должен проявлять противовоспалительное, антимикробное, антиаллергическое, иммуностимулирующее и холинолитическим действием. Кроме того, не проявлять токсикологических эффектов. Быть доступным по цене и удобным в применении. Одновременно с этим в него не должно входить много ингредиентов. Например, зарубежные исследователи считают, что в комбинированный препарат должно входить не более 3-4 компонентов.

На протяжении ряда лет при создании новых комбинированных препаратов, в том числе и антидиарейных, используем,

предложенный нами, специальный алгоритм разработки [13]. Почему необходим именно алгоритм? Он позволяет более детально и последовательно продумать все необходимые стадии разработки нового лекарственного средства. Этот алгоритм включает в себя: 1. Тщательно выясняем проблемные патологии в животноводстве и наиболее эффективные и менее токсичные лекарственные средства, используемые в данный момент которые берем за эталон. 2. Не менее тщательно изучаем патогенез болезни, для лечения которой разрабатываем препарат. 3. Определяем основные патологические мишени болезни. 4. Подбираем лекарственные вещества, воздействующие на эти мишени, с обязательным учетом их побочного действия [6,9]. 5. Определяем совместимость подобранных веществ. 6. Готовим наиболее оптимальную лекарственную форму. 7. Испытываем полученный препарат на лабораторных животных. 8. По всем параметрам изучаем токсичность сначала на лабораторных животных. 9. Изучаем эффективность препарата, в зависимости от патологии. 10. Предварительные производственные испытания на ограниченном контингенте пользовательных животных. Новый препарат должен тогда удовлетворять исследователей, когда он превосходит по основным фармакологическим позициям (эффективность и безвредность), или быть не хуже выбранного препарата сравнения и обязательно дешевле. 11. Регламентация нового препарата. Этот пункт алгоритма наиболее трудный. Требуется не только написания большого количества бумаг, но и больших средств. Вот пример. На разработанное нами достаточно эффективное антидиарейное средство Диарин, мы не могли получить сертификат и лицензию, как и регламентировать новое наставление (ранее оно было утверждено ГУВ МСХ). Вот пример. На разработанное нами достаточно эффективное анти-

диарейное средство Диарин, мы не могли получить сертификат и лицензию, как и регламентировать новое наставление (ранее оно было утверждено ГУВ МСХ). А в республике Беларусь этот препарат был утвержден.

Исходя из позиций алгоритма, остановили свой выбор на диареях телят раннего возраста, которые и до сих пор являются проблемными для животноводства, а существующие средства для их лечения не достаточно эффективны. При создании «Диарина» выбрали молочную кислоту (издавна используется при различных патологиях ЖКТ), метилурацил (иммуностимулирующее, регенерирующее и адаптогенное действие) и диоксидин (антимикробное средство из группы хинолонов с широким спектром антимикробного действия, щадит молочнокислую микрофлору кишечника). Все ингредиенты растворяются в литре воды и в качестве раствора в бутылках разной емкости готовый препарат реализуется потребителю, с указанием дозы и способа применения. Сколько каких компонентов добавлять на 1 л воды, показали кропотливые эксперименты с последующей проверкой на токсичность и эффективность в сравнении с выбранным аналогом.

Когда мы разрабатывали диарин, наиболее эффективным и востребованным антидиарейным средством был «Лерс», состоящий из 9-и компонентов (различные соли минеральных веществ + два антимикробных средства. – фурацилин и этакридина лактат, расфасованные в трех пакетах, из за несовместности ингредиентов). За сутки перед употреблением препараты растворяются в воде, тщательно размешиваются и в рекомендуемых дозах задаются больным животным.

В работе использовали фармакологические, токсикологические, эпизоотологические, биохимические и другие достоверные методы исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно алгоритма из патологических мишеней (патогенеза) усилия направили на микробный фактор, воспаление, аллергическую реакцию, иммунодефицит, токсикозы. Исходя из этого, в состав будущего препарата включили вышеперечисленные ингредиенты. Тщательно поработали с разными количествами каждого ингредиента. За основу брали их терапевтические дозы, тем не менее, пришлось нивелировать в разных вариантах. Выяснили совместимость компонентов. Выбрали самую удобную лекарственную форму – раствор. Полученный комбинированный препарат получил название «Диарин» [7]. Установили, что диарин проявляет антимикробное, противовоспалительное, иммуностимулирующее, детоксикационное и ростостимулирующее действие. На лабораторных животных, а затем на ограниченном контингенте пользовательных животных выяснили возможные токсикологические эффекты и отработали оптимальные лечебно-профилактические дозы для телят, плотоядных и цыплят. Производственные опыты, проведенные на значительном поголовье телят, в нескольких хозяйствах Ленобласти показали, что диарин не уступал, а почти во всех случаях превосходил лечебную и профилактическую эффективность комбинированных средств и Лерса. Диарин, представляет раствор, сразу готовый для употребления, тогда как Лерс перед применением следовало растворить и выдержать сутки. Оптимальная доза Диарина составила 0,3мл/кг, в среднем 10 мл на теленка, курс 1-2 раза в день до выздоровления (обычно 3-5 дней). При внесении в молозиво или в молоко Диарин растворяется в кипяченой воде 1:10. Доза Лерса от 150 мл/теленка, в тяжелых случаях до 1 литра. Эффективность Диарина составила 87 -95%, Лерса – до 90%. Характерно, что и в настоящее время Диарин практически также эффек-

тивен.

В течение последних пяти лет эффективность лечения и профилактики телят больных диареями, в сравнительном аспекте изучили лечебно-профилактическое действие двух средств – энтерина и витацита, также используя вышеуказанный алгоритм.

В опытах на новорожденных телятах выяснили профилактическое и лечебное действие 4-х указанных антидиарейных средств. Диарин, энтерин и витацит задавали в дозе 0,3 мл/кг, лерс, согласно существующих рекомендаций (с профилактической целью 250 мл, с лечебной по 500 мл). Препараты задавали 2 – 3 дня подряд, с молозивом (первые три препарата предварительно разводили кипяченой водой 1:10) В каждую группу подбирали по 10 животных.

Установили, что все четыре препарата проявляли выраженное лечебно-профилактическое действие при диареех телят. Профилактическая эффективность энтерина, витацита и лерса составила 80-90%, диарина – 95%. Лечебная эффективность всех антидиарейных средств составила 100%. С профилактической целью было достаточно применять препараты 2 дня подряд, с лечебной целью 2-3 дня подряд.

Профилактическая эффективность лекарственных средств, обычно используемых в хозяйстве для лечения диарей (антибиотики, различные отвары), была ниже и составила 65-75%, тогда, как лечебная эффективность также была в пределах 100%, но время лечения затягивалось до 3-5 дней, что позднее сказывалось на здоровье телят (больше случаев бронхопневмоний) При этом стоимость израсходованных препаратов была значительно выше. Следовательно, оба антидиарейных средства по-прежнему, как и два новых энтерин и витацит высокоэффективны при диареех телят [1,6,2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный в СПбГАВМ, в начале девяностых годов антидиарейный препарат Диарин, до настоящего времени эффективен, особенно при желудочно-кишечных болезнях молодняка животных. Препарат удобен в применении и обладает целой гаммой позитивных фармакологических эффектов. Предложенный алгоритм для разработки антидиарейных средств может с успехом использоваться исследователями для создания новых препаратов.

Algorithm of the development combine antidiarrheal drug.

V.D. Sokolov, N.L. Andreeva.

ABSTRACT

The development of effective combine medical products is significant addition in creating new drugs. It is especially important in the import substitution period of drugs, which are not enough, such as national food products. At the Department of pharmacology and toxicology of SPbGAVM the creating of new combine medical products for different pathologies of animals has been being made for several years. Herewith, the special algorithms are used, which allow more fully and consistently note all the stages of development of new drugs. These algorithms contain from 11 to 15 positions. Moreover, with the appearing of new knowledge, the new algorithms are being improved. For example, algorithm for development of antidiarrheal means contained 7 positions at the beginning, and 11 positions nowadays. The algorithm includes the study of the parameters of the pathogenesis of the disease and the medical products used. Diarin was compared with the most effective and popular antidiarrheal drug "Lers". That's why an antidiarrheal drug "Diarin" was developed, which nowadays is one of the best in the treatment of gastrointestinal diseases of young farm animals and carnivores. During the recent 5 years under the same scheme, 2 new Antidiarrheal drug have

been developed – Enterin and Vitacid, which were also more effective than the drugs, that are used in the farms.

Key words: diarrhea, medical products, algorithm.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Н.Л., Власова Л.М., Петрова О.Г., Усмонова Н.П. Изучение эффективности противозндометричных и антидиарейных средств // Мат. 4 съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов России «Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации» М. –2013. –С.45-48.
2. Власова Л.М. Разработка и испытание антидиарейного средства энтерин // Ветеринарная практика. СПб. -2008. -№3. С. 108-110.
3. Петрова О.Г., Соколов В.Д. Проверка эффективности антидиарейных средств // Матер. II междунар. конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов, посвящённого восьмидесятилетию засл. деят. науки РФ, проф. Соколова В.Д. «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии». СПб. -2012. –С. 208-209.
4. Ришко О.А. Исследование эффективности применения кормовых добавок «Гастровет» и «Гидроактив» при диспепсии у новорожденных телят в условиях хозяйства // Международный вестник ветеринарии. –СПб. –2014. –№1. –С. 20-25.
5. Соколов В.Д. Комбинированное применение антимикробных средств // Сборник трудов ЛВИ. –Л. –1990. –С.5-9.
6. Соколов В.Д. Больше внимания лекарственной токсикологии // Ветеринария. – 1991. –№5. –С. 67-69.
7. Соколов В.Д., Андреева Н.Л., Бацанов Н.П. и соавт. Этот чудодейственный Диарин // Методические рекомендации. – СПб. –1999. –11с.
8. Соколов В.Д., Андреева Н.Л., Войтенко В.Д., Абакумова Т.В. Комбинированные лекарственные средства (сообщение 1 Диарин) // Зооиндустрия. –2004. –№9. – С. 8-10.
9. Соколов В.Д., Андреева Н.Л. Эффективность и безопасность лекарственных средств (проблемы, подходы к решению) // Международный вестник ветеринарии. –СПб. –2008. –№2. –С. 6-11.
10. Соколов В.Д., Андреева Н.Л., Войтенко В.Д., Абрамов В.Е. Диоксидин и препараты на его основе // Ветеринария. – СПб. –2010. –№ 11. –С.44-48.
11. Соколов В.Д., Андреева Н.Л. Перспективные НИР в фармакологии, токсикологии и фармации // Мат. 4-го съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов России. -М. –2013. –С.529-532.
12. Соколов В.Д., Андреева Н.Л. Повышать эффективность и безопасность лекарств // Международный вестник ветеринарии. –СПб. –2014. –№4. –С.8-13.
13. Соколов В.Д., Андреева Н.Л. Проблемы известны, по возможности их необходимо решать // Мат. 5-го съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов России. -Витебск. –2015. –С.529-532.
14. Яшин А.В., Киселенко П.С. Комплексный метод лечения диареи телят с использованием средств фитотерапии. // Международный вестник ветеринарии. – СПб. –2014. –№1. –С.12-15..
15. Lazon J., Pomeranz V.H., Corey P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. -Jama. -1998. –Vol. 279 (15). –P. 1200-1205.
16. Moore N., Lecointere D., Noblet C., Mobbille M. Frequency and cost of serious adverse drug reactions in a department of general medicine // Brit. J. Pharmacol. -1998. - Vol. 45. -P.301-308.

ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ МИРАМИСТИНОМ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ЛЕЧЕНИИ КОШЕК С РИНИТОМ

Крутяков Ю.А.¹ - к.хим.н., Климов А.И.¹ - аспирант, Коробкова Е.А.² - начальник отдела, Кузьмин В.А.³ - д.вет.н., профессор, Лунегов А.М.³ - к.вет.н., доцент,
¹МГУ имени В.Ломоносова, ²ООО «НаноБиотех»,
³Санкт-петербургская академия ветеринарной медицины



РЕФЕРАТ

Возросший в последнее десятилетие интерес к наносеребру связан с распространением патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе к антибиотикам последнего поколения. В ряде работ последних двадцати лет показано, что серебро в наноразмерной форме обладает подчас совершенно иными физико-химическими и биологическими характеристиками в отличие от металла в макросостоянии. Так, наночастицы серебра все чаще включают в состав многих лекарственных средств и лекарственных форм, повышая их антибактериальную активность, а также создают новые лекарственные средства на основе серебра. В 2011-2014 гг. на базе нескольких ветеринарных клиник г. Москвы и г. Санкт-Петербурга проводили клинические испытания лекарственной композиции на основе наночастиц серебра, химически модифицированных мирамистином. Показана высокая терапевтическая эффективность данной композиции в лечении кошек с клиническим проявлением ринита вирусной, бактериальной и смешанной этиологии. Использование композиции на основе коллоидного серебра позволяет, в среднем на 50%, сократить продолжительность терапии ринитов. Применение указанной лекарственной композиции в виде назальных капель и аппликаций позволило сократить сроки лечения и избежать возникновения осложнений при рините различной этиологии. По результатам проведенных клинических исследований можно сделать вывод о целесообразности использования ветеринарных лекарственных композиций на основе наночастиц серебра, модифицированных мирамистином, при лечении кошек с клиническими симптомами ринита различной этиологии, что обусловлено его терапевтической эффективностью, простотой использования и отсутствием побочных эффектов.

Ключевые слова: наночастицы серебра, мирамистин, коллоидное серебро, кошки, ринит.

ВВЕДЕНИЕ

У кошек нередко встречаются инфекционные болезни с симптомами ринита, конъюнктивита, гингивита, которые могут иметь инфекционную, инвазионную или смешанную природу [2,11]. Лечение инфекционных болезней кошек нередко является сложной задачей, а многие тра-

диционные антибактериальные препараты узкого спектра действия подчас недостаточно эффективны, являются токсичными [5], кроме того, лечение таких болезней обусловлено техническими сложностями проведения индивидуальной терапии и высокой стоимостью применяемых лекарственных средств.

Антибиотики, как правило, способны воздействовать лишь на узкий спектр клеточных мишеней патогена. Поэтому основные усилия при разработке новых антибактериальных препаратов следует направить на создание лекарственных средств, способных одновременно поражать множество клеточных мишеней патогена, лишая микроорганизмы возможности вырабатывать механизмы ферментативной дезактивации [8,9]. Патогенные микроорганизмы, вызывающие инфекционные и воспалительные заболевания человека и животных, практически не способны вырабатывать лекарственную устойчивость к ионам серебра и коллоидному серебру [7]. Возросший в последнее десятилетие интерес к наносеребру связан с распространением патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе к антибиотикам последнего поколения [6]. Все чаще наночастицы серебра включают в состав многих лекарственных средств и лекарственных форм, повышая их антибактериальную активность, а также создают новые лекарственные средства на основе серебра [3]. Установлено, что ионное серебро повышает эффективность многих антибиотиков и тем самым способствует предупреждению выработки устойчивости к этим препаратам [4]. Наиболее перспективными соединениями на основе коллоидного серебра являются комбинированные препараты, содержащие в качестве стабилизатора коллоидного серебра, наряду с дисперсией металла, другой антибактериальный агент, например, мирамистин – хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил]аммония [1]. Целью настоящей работы было определение эффективности новой лекарственной композиции на основе наночастиц серебра, химически модифицированных мирамистином, в лечении кошек с симптомами ринита различной этиологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2011-2014 гг. на базе нескольких ветеринарных клиник г. Москвы и г. Санкт-Петербурга проводились клинические испытания ветеринарной лекарственной композиции на основе наночастиц серебра, модифицированных мирамистином. Композиция представляла собой водную дисперсию 10 мкг/мл или 50 мкг/мл наночастиц серебра, стабилизированную 100 мкг/мл мирамистина. Полученные лекарственные композиции характеризовались невыраженной острой и хронической токсичностью при внутрижелудочном введении [1]. Полученные ветеринарные лекарственные композиции обладали широким спектром антибактериальной (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* FDA 209P, *L. mesenteroides* VKPMB-4177) и антимикотической активности (*S. cerevisiae* RIA 259 и *Asp. niger* INA 00760) [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

За время проведения испытаний в ветеринарных клиниках зафиксировано 133 обращения владельцев кошек с ринитами, из которых 43 (32,3%) кошки с ринитами вирусной этиологии (калицивироз), 28 кошек (21%) с ринитами бактериальной этиологии, 62 кошки с ринитами смешанной этиологии. Ветеринарную лекарственную композицию, содержащую 10 мкг/мл коллоидного серебра, стабилизированного 100 мкг/мл мирамистина, назначали в разведении 1:1 с дистиллированной водой в виде назальных капель по 2 капли в каждую ноздрю 3 раза в день на протяжении 10-14 дней. В опытной группе (n=28) с бактериальным ринитом первые признаки клинического улучшения на 5-6 день лечения наблюдались у 22 (80%) животных, полное клиническое излечение - на 10-11 день. У 2 (8%) кошек полное клиническое излечение наступило на 14-15 день, а у 4 (12%) животных лечение продлено до 20 дней. В группе кошек с вирусными ринитами из 43 животных у

22 (51,1%) кошек на 14-15 день уменьшились проявления ринита, 21 животному (48,8%) лечение продлено до 20-22 дней. В лечении животных с ринитами смешанной этиологии клинические улучшения наступали также быстро, как и при бактериальных, но, в отличие от первой группы, терапия была более длительной. При лечении ринитов вирусной и смешанной этиологии в 70% случаев потребовалось комплексное лечение (иммуномодуляторы и общеукрепляющие средства: витафел-глобулин, микровитам, дигитон). У животных в опытных группах не отмечалось осложнений после перенесенного заболевания и побочных эффектов. В контроле (n=10) для лечения ринита использовали 0,05% водный раствор хлоргексидина биглюконата в разведении 1:1 с дистиллированной водой и 0,01% водный раствор мирамистина. Растворы препаратов назначали в разведении 1:1 с дистиллированной водой в виде назальных капель по 2 капли в каждую ноздрю 3 раза в день. При бактериальных ринитах клиническое улучшение наступало на 10-12 день, полное клиническое излечение – на 19-20 день, а при лечении вирусных ринитов и ринитов смешанной этиологии полного клинического излечения не наступало. По-видимому, более быстрое, чем в контрольной группе, выздоровление животных с вирусными ринитами в опытной группе связано с иммуностимулирующим действием коллоидного серебра [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коллоидные частицы серебра, стабилизированные биологически активными катионными ПАВ (мирамистином), обуславливают пролонгированное антибактериальное и иммуномодулирующее действие препаратов на их основе по сравнению с кратковременным эффектом, оказываемым солями серебра и другими водорастворимыми антисептиками. По результатам проведенных клинических ис-

следований можно сделать вывод о целесообразности использования ветеринарных лекарственных композиций на основе наночастиц серебра, модифицированных мирамистином, при лечении широкого спектра инфекционных заболеваний кошек с клиническими симптомами ринита различной этиологии, что обусловлено его терапевтической эффективностью, простотой использования и отсутствием побочных эффектов.

Use of miramistin stabilized silver nanoparticles in veterinary medicine – new opportunities in treatment of rhinitis of cats.

Yu. Krutyakov, A. Klimov, E. Korobkova, A. Lunegov, V. Kuzmin.

ABSTRACT

The increased interest in nanosilver during the last 10 years is mainly explained by the appearance and spreading of pathogenic microorganisms with multiple drug resistance, including the resistance to the last-generation antibiotics. In vitro tests show that dispersions of silver nanoparticles stabilized with benzyltrimethyl[3-(miristoylamino)-propyl]ammonium chloride have high antibacterial activity. We have conducted large-scale clinical trials of new veterinary drug compositions based on silver nanoparticles modified with benzyltrimethyl[3-(miristoylamino)-propyl]ammonium chloride meant for treatment of infectious diseases of cats. This article presents main results of clinical trials of compositions based on silver nanoparticles stabilized with benzyltrimethyl [3-(miristoylamino)-propyl] ammonium chloride in treatment of rhinitis of cats. Silver based compositions were applied in diluted form as intranasal drops. We have proven high therapeutic effectiveness of nanosilver based compositions during treatment of infectious rhinitis of cats. Application of the proposed veterinary compositions gives considerable (up to 50%) reduction of treatment period and prevention of complications. The

results of the research allow one to come to the conclusion of reasonability of application of veterinary drug compositions based on silver nanoparticles stabilized with benzyldimethyl[3-(miristoylamino)-propyl] ammonium chloride for treatment of rhinitis of cats, which is explained by low costs of the preparation and easiness of its administration, as well as absence of side effects.

Key words: silver nanoparticles miramistin, colloidal silver, cats, rhinitis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боляхина С.А. Исследование острой и хронической токсичности препарата Аргумистин/С.А.Боляхина, Г.Ф. Насартинова и др. // Сибир. вестник с/х науки. -2014. -№3. -С.95–101.
2. Кудряшов А.А. Причины падежа кошек // Ветеринарная практика. -2001. -№1 (12). -С. 22-23.
3. Лунегов А.М. Материалы III международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов. СПб. -2014. -С. 165-166.
4. Соколов В.Д. Антимикробные средства в птицеводстве // -М. -1984. -147 с.
5. Baggot J. Antimicrobial selection, administration and dosage // J. South Afr. Vet. -1998. -V.69(4). -P. 174-185.
6. Smith J.D. Nanoparticles as synthetic vaccines. / Morton L.D., Ulery B.D. // Current Opinion in Biotechnology. -2015. -Vol. 34. -P. 217-224.
7. Klasen H. A Historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renew Interest for silver. -2000. -Vol.26 (2). -P. 131-138.
8. Krutyakov Yu. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects/ Yu.Krutyakov, A.Kudrinskiy, A.Olenin et al. // Russ. Chem. Rev. -2008. -Vol.77(3). -P.233-257.
9. Nadworny P.L. Does nanocrystalline silver have a transferable effect / P.L. Nadworny, B.K. Landry, J. Wang et. al. // Wound Rep. Reg. -2010. -Vol.18. -P. 254-265.
10. Persoons D. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Poultry / D. Persoons, S. Hoorebeke, K. Hermans et.al. // Emerg. Infect. Dis. -2009. -Vol.15(3). -P.452-453.
11. Samson-Himmelstjerna G. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminthes / G. Samson-Himmelstjerna. Blachall // Vet. Parasitol. -2005. -Vol.132(3-4). -P. 223-39.

УДК: 615.33

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ЦИПРОВЕТ – ПУЛЬМО

Токарева О.А.– аспирант каф. фармакологии и токсикологии
Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины



РЕФЕРАТ

Для бесперебойного выращивания и получения здорового поголовья в животноводстве и птицеводстве не обойтись без применения антибактериальных препаратов. В последнее время несколько снизилась эффективность антибактериальной терапии на фоне появления огромного количества резистентных штаммов микроорганизмов и многими другими причинами. В связи с этим применение комбинированных препаратов рассматривается как целесообразный метод для профилактики и лечения бактериальных инфекций, а также способ замедления развития резистентности у микроорганизмов [4]. В статье представле-

ны опыты по изучению аллергических свойств препарата Ципровет-пульмо. Ципрофлоксацин – антибиотик группы фторхинолонов, наиболее активен в отношении грамотрицательных бактерий, обладает выраженным влиянием на аэробных бактерий. Тиамулина гидроген фумарат – антибиотик из группы плевромугилина, активен в отношении многих грамположительных, а также – некоторых грамотрицательных микроорганизмов.

В результате проведенных исследований установлено, что Ципровет-пульмоне обладает аллергенными свойствами, это видно из опытов проведенных на морских свинках методом гистаминового шока и реакции непрямо́й дегрануляции тучных клеток на мышцах линии СВА.

Ключевые слова:аллергические свойства, Ципровет-пульмо, ципрофлоксацин, тиамулин, крысы, мыши.

ВВЕДЕНИЕ

Болезни свиней бактериальной этиологии, поражающие желудочно-кишечный тракт, наносят огромный экономический ущерб, за счет высокой смертности, снижения общего прироста живой массы уже переболевших поросят, затрат на лечение и профилактику [4].

С целью усовершенствования лечебно-профилактических мероприятий при бактериальных болезнях животных Научно-внедренческим центром «Агроветзащита» был разработан комбинированный антибиотик Ципровет-пульмо [3] в виде порошка. Один грамм препарата содержит в качестве действующих веществ 100 мг ципрофлоксацина [6] и 450 мг тиамулина [5] гидроген фумарата.

Цель исследований заключалась в изучении аллергических свойств препарата на морских свинках методом гистаминового шока и на мышцах по непрямо́й дегрануляции тучных клеток [1,2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения метода гистаминового шока были отобраны 12 клинически здоровых морских свинок массой 180-220 г. Животных разделили на 2 группы. Шести подопытным свинкам был дан препарат перорально в дозе 10 мг/кг. Контрольным животным (6 голов) препарат не вводили. Гистамин вводили подкожно в дозе 5 мг/кг как подопыт-

ным, так и контрольным морским свинкам через 6 и 12 часов после введения препарата.

На протяжении опыта тщательно велся контроль за временем наступления гистаминового шока у морских свинок.

Также была проведена реакция дегрануляции тучных клеток. Для опыта были отобраны 6 мышей СВА, которым задавали Ципровет-пульмо разведенный в крахмальном клейстере 1:10 в дозе 10 мг/кг по ДВ. Спустя 2 дня мышей убивали, после чего собирали сыворотку крови. Тучные клетки выделяли из перитонеальной жидкости 2 крыс-самцов массой 180-200 г после внутрибрюшинного введения физиологического раствора с гепарином в количестве 10 мл.

Затем на предметные стекла, покрытые 0,3% нейтральротом на абсолютном спирте наносили по 1 капле тучных клеток, сыворотки крови от подопытных мышшей и препарата в разведении 1:10. В контрольную пробу брали тучные клетки и сыворотку крови от тех же мышшей (по 1 капле) и по разнице процента дегрануляции тучных клеток в опыте и в контроле судили о сенсибилизации организма. Для контроля достоверности полученных данных подсчитывали процент дегрануляции тучных клеток в перитонеальной жидкости (10%) и с комплементом (8%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании проведенных опытов видно, Ципровет-пульмо в терапевтиче-

Таблица 1

Результаты изучения аллергических свойств Ципровета-пульмо
(метод гистаминного шока, морские свинки)

| Группа животных | Срок введения гистамина после препарата, час. | Время наступления гистаминового шока, мин. |
|-----------------|---|--|
| Подопытная | 6 | 19,2±0,1 |
| Контрольная | 6 | 19,1±0,2 |
| Подопытная | 12 | 19,0±0,2 |
| Контрольная | 12 | 19,2±0,2 |

Примечание: разница в показателях животных обеих групп была несущественной ($P \geq 0,05$).

Таблица 2

Результаты реакции дегрануляции тучных клеток на введение
Ципровета-пульмо

| № гр. | Животное | Процент дегрануляции тучных клеток в опыте | Процент дегрануляции тучных клеток в контроле | Результаты дегрануляции тучных кл., % |
|-------|----------|--|---|---------------------------------------|
| 1 | 1 | 27 | 20 | 7 |
| | 2 | 28 | 20 | 8 |
| | 3 | 27 | 18 | 9 |
| | 4 | 25 | 18 | 7 |
| | 5 | 25 | 16 | 9 |
| | 6 | 21 | 15 | 6 |
| M±m | | | | 7,6±0,18 |

ской дозе не обладает антигистаминной активностью, т.к. не предотвращает смерть животных от введенной дозы гистамина, а также и не ускоряет ее, что указывало бы на гистаминное аллергенное действие.

Результаты изучения аллергических свойств Ципровета-пульмо представлены в таблице 1.

Все животные подопытной и контрольной групп пали приблизительно в одни и те же сроки. Так, при введении гистамина морским свинкам через 6 часов после введения Ципровета-пульмо, время наступления гистаминового шока равнялось 18,9±0,12 мин., через 12 часов – 18,8±0,15 мин., а у контрольных животных, соответственно 18,8±0,15 и 19,0±0,12. Разница в показателях животных подопытных и контрольных групп оказалась несущественной ($P \geq 0,05$).

Реакция подопытных и контрольных групп животных на введение гистамина

была одинаковой. У всех морских свинок наблюдали симптомы развития шока: выраженная депрессия, сонливость, беспокорство, учащение дыхания, боковое положение, судороги, одышка и смерть.

Из опыта по проведению реакции дегрануляции тучных клеток видно, что процент дегрануляции тучных клеток составил 7,6±0,12. Известно, что при значении до 10% - препарат не обладает сенсибилизирующими свойствами. Результаты представлены в таблице 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что препарат Ципровет-пульмо в терапевтической дозе не обладает аллергенными свойствами это видно из опытов проведенных на морских свинках методом гистаминового шока. Животные двух групп пали приблизительно в одни и те же сроки, реакция на введение гистамина была одинаковой. Время наступления гистаминового шока

равнялось $18,9 \pm 0,12$ мин., через 12 часов – $18,8 \pm 0,15$ мин., а у контрольных животных, соответственно $18,8 \pm 0,15$ и $19,0 \pm 0,12$.

А при проведении реакции непрямо́й дегрануляции тучных клеток на мышах линии СВА процент дегрануляции тучных клеток составил $7,6 \pm 0,12$. Это говорит о том, что препарат не обладает сенсибилизирующими свойствами.

Allergic drug study of properties Ciprovet-pulmo.

O. Tokareva.

ABSTRACT

As a result of research conducted it was shown that the TsiprovetPulmo drug in therapeutic dose has no allergenic properties. It is evident from the experiments carried out in guinea pigs by histamine shock. Animals of the two groups died around the same time frame, a reaction to the introduction of histamine was the same. Time of the histamine shock onset equaled to 18.9 ± 0.1 min., 12 hours - 18.8 ± 0.2 min. And the control animals time of the histamine shock onset equaled 18.8 ± 0.2 and 19.0 ± 0.1 respectively. And during the indirect mast cell degranulation in CVA mice the percentage of mast cell degranulation was $7,6 \pm 0,1$. This suggests that the drug has no sensitizing properties.

Key words: allergic properties, sub-chronic toxicity, Ciprovet-pulmo, ciprofloxacin, tiamulin, rats, mice.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева О.Г. Экспериментальный аллергический контактный дерматит. -М., Медицина. –1970. - 90с.
2. Алексеева О.Г. Аллергия к промышленным химическим соединениям. -М., Медицина. –1978. –С. 207-210.
3. Енгашев С.В. Эффективность антибиотика на основе ципрофлоксацина и тиамулина при колибактериозе поросят / Енгашев С.В., Токарева О.А., Токарев А.Н. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. –2014. –№ 3. –С. 213-2014.
4. Шахов А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Междунар. науч.-пр. конф. -Воронеж. -2002. –С. 3-8.
5. Lykkeberg A.K. Susceptibility of bacteria isolated from pigs to tiamulin and enrofloxacin metabolites / A.K. Lykkeberg, B. Halting-Sorensen, L.B. Jensen // Vet. Microbiol. – 2007. – № 1-2(121). – P. 116-124.
6. O'Brien K.A. Impact of a stewardship-initiated restriction on empirical use of ciprofloxacin on nonsusceptibility of Escherichia coli urinary isolates to ciprofloxacin / K.A. O'Brien, J. Zhang, P.D. Mauldin, J. Gomez, J.M. Hurst, M. Sean Boger, J.A. Bosso // Pharmacotherapy. – 2015. – № 5. – P. 464-469.

УДК 619:616.9:636.4

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В ОРГАНИЗМЕ ЦЫПЛЯТ ПОСЛЕ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ



Заикина Е.Н. - м.н.с., Скворцов В.Н. - д.в.н., директор филиала, Юрин Д.В. – к. вет. наук, научный сотрудник, Белгородский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко»

РЕФЕРАТ

В статье сообщены данные фармакокинетических параметров цiproфлoксацина после однократного перорального введения цыплятам в дозах 5 и 10 мг/кг массы тела. Опыт проводили на 48 петушках месячного возраста кросса Хайсекс-Браун массой 350-400 граммов. Цыплята были разделены на 2 группы по 24 головы в каждой. Концентрации препарата определяли в сыворотке крови, сердце, легких, тонком и толстом кишечнике, печени, скелетных мышцах, мышечном желудке и почках микробиологическим методом диффузии в агар с использованием тест-микроба *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Для этого птиц (по 4 головы из каждой группы) убивали через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после введения цiproфлoксацина. При пероральном введении цiproфлoксацин быстро всасывается и хорошо проникает в различные органы, ткани и биологические жидкости птиц. Установлено, что при пероральном введении цiproфлoксацина в дозах 5 и 10 мг/кг массы тела он обнаруживался на протяжении 24 часов во всех исследуемых тканях и органах в концентрациях, превышающих бактериостатические для этиологически значимых микроорганизмов.

Ключевые слова: фармакокинетика, цiproфлoксацин, пероральное введение, доза, фторхинолоны, цыплята, антимикробная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует большой выбор антимикробных препаратов для лечения бактериальных болезней. Не смотря на это, основные проблемы современного лекарствоведения состоят в снижении эффективности лекарственных средств и усилении их побочного действия [9].

Повысить эффективность антимикробной терапии и снизить вероятность развития резистентных форм патогенных бактерий можно благодаря соблюдению принципов рационального их применения. Причём для лечения необходимо назначать препарат, не обладающий токсическим действием. В то же время, его незначительное содержание в органах и тканях птиц должно быть достаточным для подавления роста этиологически значимых микроорганизмов.

Большой интерес в этом плане представляют препараты фторхинолонового ряда и в частности цiproфлoксацин, который характеризуется широким антимикробным спектром, бактерицидным типом действия, с преимущественной активностью в отношении различных представителей аэробных бактерий. Он

быстро всасывается после приема внутрь, хорошо проникает в различные органы, ткани и клетки и длительно циркулирует в организме [10,11,12,13].

Результаты экспериментального и клинического изучения цiproфлoксацина при энтеральном приеме достаточно широко представлены нами в предыдущих публикациях [1,4,5,6,7]. Кроме того установлена высокая антимикробная активность препарата в отношении широкого спектра микроорганизмов, выделенных от различных видов животных [8], а также его низкая токсичность [2]. В связи с этим вызывают определенный интерес особенности распределения цiproфлoксацина в организме птиц при пероральном введении.

Целью нашего исследования явилось изучение распределения цiproфлoксацина в организме здоровых цыплят после его однократного перорального введения в дозах 5 и 10 мг/кг массы тела.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыт проводили на 48 петушках месячного возраста кросса Хайсекс-Браун массой 350-400 граммов. Цыплята были разделены на 2 группы по 24 головы в каждой. Петушкам первой группы ци-

профлорксацин вводили перорально однократно при помощи желудочного зонда в дозе 5 мг/кг массы тела, петушкам второй группы – в дозе 10 мг/кг массы тела.

Для определения концентрации препарата птиц (по 4 головы из каждой группы) убивали через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после введения ципрофлорксацина. Объектами исследования служили сыворотка крови, сердце, легкие, тонкий и толстый кишечник, печень, скелетные мышцы, мышечный желудок и почки. Содержание ципрофлорксацина определяли микробиологическим методом диффузии в агар с использованием тест-микроба *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [3].

Концентрацию ципрофлорксацина выражали в микрограммах на 1 г в тканях и микрограммах на 1 мл в сыворотке крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные о распределении ципрофлорксацина в организме цыплят при однократном пероральном введении в дозах 5 и 10 мг/кг массы тела представлены в таблице 1 и 2.

Проведенные исследования показали, что при введении ципрофлорксацина в дозе 5 мг/кг массы тела его максимальная концентрация в сыворотке крови наблю-

далась через 1 час после применения и составила 0,39 мкг/мл. В последующие часы наблюдалось постепенное уменьшение уровня препарата. Так, через 8 часов после введения, его концентрация равнялась 0,16 мкг/мл, а через 12 часов уровень препарата несколько повысился и достиг значений (0,27 мкг/мл), которые определялись через 4 часа. Спустя сутки концентрация препарата в крови составила 0,24 мкг/мл, что значительно превышает бактериостатические концентрации для этиологически значимых микроорганизмов (сальмонеллы, эшерихии, псевдомонады). При введении ципрофлорксацина в дозе 10 мг/кг массы тела его содержание в крови не имело существенных отличий, чем при введении дозы 5 мг/кг массы тела. Имеются только различия во времени наступления пика концентрации препарата. Так, после введения ципрофлорксацина в дозе 10 мг/кг массы тела его максимальная концентрация в сыворотке крови определялась через 12 часов и составляла 0,4±0,1 мкг/мл.

Из полученных данных по распределению препарата в организме цыплят видно, что при пероральном введении ципрофлорксацин хорошо проникает в иссле-

Таблица 1
Распределение ципрофлорксацина в организме цыплят после однократного перорального введения в дозе 5 мг/кг массы тела

| Объекты исследования | Концентрация ципрофлорксацина (мкг/г, мкг/мл) | | | | | |
|----------------------|---|---------|----------|---------|----------|---------|
| | 1 час | 2 часа | 4 часа | 8 часов | 12 часов | 24 часа |
| Сыворотка крови | 0,4±0,1 | 0,3±0,0 | 0,27±0,0 | 0,2±0,0 | 0,3±0,0 | 0,2±0,0 |
| Сердце | 0,4±0,1 | 0,3±0,1 | 0,5±0,0 | 0,2±0,1 | 0,4±0,1 | 0,2±0,1 |
| Легкие | 0,3±0,1 | 0,4±0,0 | 0,4±0,0 | 0,3±0,1 | 0,4±0,0 | 0,3±0,1 |
| Тонкий кишечник | 0,6±0,1 | 0,6±0,1 | 0,5±0,0 | 0,3±0,1 | 0,6±0,1 | 0,5±0,0 |
| Толстый кишечник | 0,6±0,2 | 0,6±0,1 | 0,6±0,0 | 0,4±0,1 | 0,6±0,1 | 0,5±0,1 |
| Печень | 0,5±0,0 | 0,5±0,1 | 0,5±0,0 | 0,3±0,1 | 0,4±0,0 | 0,4±0,0 |
| Мышцы | 0,4±0,0 | 0,5±0,0 | 0,4±0,0 | 0,3±0,1 | 0,4±0,0 | 0,2±0,0 |
| Желудок | 0,5±0,1 | 0,4±0,0 | 0,5±0,1 | 0,3±0,1 | 0,5±0,0 | 0,3±0,1 |
| Почки | 0,4±0,0 | 0,4±0,1 | 0,5±0,0 | 0,2±0,1 | 0,4±0,1 | 0,3±0,0 |

Таблица 2

Распределение ципрофлоксацина в организме цыплят после однократного перорального введения в дозе 10 мг/кг массы тела

| Объекты исследования | Концентрация ципрофлоксацина (мкг/г, мкг/мл) | | | | | |
|----------------------|--|---------|---------|---------|----------|---------|
| | 1 час | 2 часа | 4 часа | 8 часов | 12 часов | 24 часа |
| Сыворотка крови | 0,3±0,0 | 0,4±0,1 | 0,3±0,1 | 0,2±0,0 | 0,4±0,1 | 0,2±0,0 |
| Сердце | 0,4±0,1 | 0,5±0,1 | 0,4±0,1 | 0,3±0,1 | 0,2±0,0 | 0,4±0,0 |
| Легкие | 0,5±0,0 | 0,5±0,1 | 0,4±0,0 | 0,3±0,1 | 0,7±0,1 | 0,4±0,1 |
| Тонкий кишечник | 0,7±0,1 | 0,7±0,1 | 0,6±0,1 | 0,3±0,1 | 0,7±0,1 | 0,6±0,0 |
| Толстый кишечник | 0,9±0,1 | 0,9±0,2 | 0,7±0,0 | 0,5±0,1 | 0,6±0,0 | 0,5±0,0 |
| Печень | 0,6±0,1 | 0,7±0,0 | 0,7±0,1 | 0,3±0,1 | 1,0±0,3 | 0,5±0,0 |
| Мышцы | 0,4±0,1 | 0,5±0,1 | 0,4±0,0 | 0,3±0,1 | 0,3±0,0 | 0,4±0,1 |
| Желудок | 0,5±0,0 | 0,5±0,1 | 0,6±0,1 | 0,3±0,1 | 0,4±0,0 | 0,4±0,0 |
| Почки | 0,4±0,1 | 0,4±0,1 | 0,4±0,1 | 0,3±0,1 | 0,5±0,2 | 0,4±0,1 |

дугие органы, ткани и биологические жидкости и обнаруживается в них в течение 24 часов. При введении ципрофлоксацина в дозе 5 мг/кг массы тела он в наибольшей концентрации содержался в толстом (0,6 мкг/г) и тонком кишечнике (0,6 мкг/г). В мышцах и сердце (соответственно 0,2 и 0,2 мкг/г) препарат определялся в незначительных количествах. На протяжении периода исследования (24 часа) препарат обнаруживался во всех исследуемых органах и тканях.

Как видно из таблицы 2, концентрация ципрофлоксацина в органах и тканях при увеличении дозы препарата до 10 мг/кг массы тела имеет незначительные отличия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При пероральном введении ципрофлоксацин быстро всасывается и хорошо распределяется в организме цыплят. Исследования свидетельствуют о хорошем проникновении ципрофлоксацина в органы, биологические жидкости и ткани птиц, установлено, что при пероральном введении ципрофлоксацина в дозах 5 и 10 мг/кг массы тела он обнаруживался на протяжении 24 часов во всех исследуемых тканях и органах в концентрациях, превышающих бактериостатические для этиологически значимых микроорганиз-

мов.

Особенности распределения ципрофлоксацина в тканях, органах и биологических жидкостях при исследованном способе его введения могут быть учтены при выборе схем применения антибактериального препарата на производстве.

Pharmacokinetics of ciprofloxacin in chickens.

E.N. Zaikina, V.N. Skvortzov, D.V. Yurin.

ABSTRACT

A pharmacokinetic study was performed to assess concentrations of ciprofloxacin in healthy chickens after a single oral dose (5 or 10 mg/kg). Forty eight 1-month-old roosters of the Highsex Brownbreed were used in the experiment. The live weight of the rooster was an average of 300-350 g. Birds were divided into two groups of 24 birds each. Ciprofloxacin's concentrations in serum, heart, lungs, small and large intestines, liver, skeletal muscle, stomach muscle and kidney were determined by using the microbiological method of diffusion in the agar with *Bacillus subtilis* ATCC 6633 test-culture. For this purpose 4 birds from each group were killed in 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours after drug administration. Absorption was rapid and ciprofloxacin was widely distributed in body fluids and tissues of chick-

ens. It was found that ciprofloxacin administered orally at 5 and 10 mg/kg was detected in all body fluids and tissues during 24 hours. Detectable concentrations were higher than bacteriostatic concentration of drug for bacterial organisms commonly isolated from chickens.

Key words: pharmacokinetics, ciprofloxacin, the oral administration, a dose, fluoroquinolones, chickens, the antimicrobial activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заикина Е.Н. Эффективность цiproфлoксaцинa при экспериментальном колибaктерioзе цыплят / Е.Н. Заикинa, В.Н. Сквoрцoв, А.А. Балбуцкaя // Мeждунaрoдный вестник ветеринарии. –2015. - №2. –С. 24-28.
2. Заикина Е.Н. Острая токсичность антимикрoбнoгo пpeпapaтa нa oснoвe цiproфлoксaцинa для цыплят / Е.Н. Заикинa, В.Н. Сквoрцoв // мaт. III мeжд. кoнгр. вeт. фaрм. и тoкс.: Эффeктивныe и бeзoпaсныe лeкapствeнныe сpeдствa в ветеринарии. – Спб. –2014. –С. 102-103.
3. Нaвaшин С.М. Рaциoнaльнaя антибиoтикoтeрaпия. Спpaвoчник. Издaниe 4-e. – М. – 1982. –С. 496.
4. Сквoрцoв В.Н. Антимикрoбнaя активнoсть и лeчeбнaя эффeктивнoсть цiproфлoксaцинa при колибaктерioзe свиней / В.Н. Сквoрцoв, Д.В. Юрин, Е.Н. Заикинa // Вестник Курскoй ГСХА. –2012. - №6. –С. 72-74.
5. Сквoрцoв В.Н. Антимикрoбнaя активнoсть, тeрaпевтичeскaя и пpoфилaктичeскaя эффeктивнoсть цiproфлoксaцинa при экспериментальном колибaктерioзe лaбoрaтoрных живoтныx / В.Н. Сквoрцoв, Д.В. Юрин, Е.Н. Заикинa // Вeтeринaрнaя пaтoлoгия. –2013. -№2. –С. 65-68.
6. Сквoрцoв В.Н. Фaрмaкoкинeтикa цiproфлoксaцинa в oргaнизмe свиней пoслe oднoкpaтнoгo пeрoрaльнoгo ввeдeния / В.Н. Сквoрцoв, Д.В. Юрин // Извeстия Oрeнбургскoгo ГAУ. –2012. -№1. –С. 98-100.
7. Сквoрцoв В.Н. Антимикрoбнaя активнoсть и лeчeбнaя эффeктивнoсть цiproфлoксaцинa при сaльмoнeллeзe свиней / В.Н. Сквoрцoв, Д.В. Юрин // Вестник Aлтaйскoгo ГAУ. –2013. -№5. –С. 102-104
8. Сквoрцoв В.Н. Антимикрoбнaя активнoсть цiproфлoксaцинa в oтнoшeнии микрooргaнизмoв, выдeлeнныx из рaзличныx видoв живoтныx / В.Н. Сквoрцoв, Д.В. Юрин, А.А. Балбуцкaя, Н.А. Сaфoнoвa // Мeждунaрoдный вестник ветеринарии. –2012. -№2. –С. 40-43
9. Сoкoлoв В.Д. Пoвышaть эффeктивнoсть и бeзoпaснoсть лeкapств / В.Д. Сoкoлoв, Н.Л. Aндрeeвa // Мeждунaрoдный вестник ветеринарии. –2014. №4. -С. 8-14.
10. Bortolaia V. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry / V. Bortolaia, M. Bisgaard, A.M. Bojesen // Veterinary Microbiology. – 2010. –Vol.142. -P. 379-386.
11. Papich M.G. Ciprofloxacin pharmacokinetics and oral absorption of generic ciprofloxacin tablets in dogs // Am. J. of Veterinary Research. –2012. -Vol. 73. -№7. –P. 1085-1091.
12. Dahshan H. Veterinary antibiotic resistance, residues, and ecological risks in environmental samples obtained from poultry farms, Egypt / H. Dahshan, A.M. Abd-El-Kader, E.E. Nabawy // Environmental Monitoring and Assessment. –2015. -Vol. 187(2). -P. 1038-1044.
13. Jamborova I. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe / I. Jamborova, M. Dolejska // Appl. Environ. Microbiol. –2014. –Vol. 81(2). –P. 648-657.

ПЕРЕНОСИМОСТЬ И СУБХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ПРЕПАРАТА ЦИПРОВЕНТОР НА ТЕЛЯТАХ

Филимонов Д.Н. - аспирант Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности, младший научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита»,

Павленко Г.И. - к. б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук.



РЕФЕРАТ

В результате проведения 2-х экспериментов установлено, что Ципровентор заданный животным в терапевтической (0,4г/10 кг) и трехкратно увеличенной (1,2г/10 кг) дозах существенно не влияет на физиологические показатели крови и мочи как при изучении переносимости, так и субхронической токсичности.

Ключевые слова: Ципровентор, телята, переносимость, субхроническая токсичность.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема инфекционных заболеваний актуальна как в животноводстве, так и в птицеводстве. Одним из перспективных направлений в борьбе с инфекционными заболеваниями являются антибактериальные препараты последних поколений, обладающих не только высоким антибактериальным эффектом широкого спектра действия, но в комплексе таких антибиотиков как фторхинолоны (ципрофлоксацин) и аминогликозиды (апрамицин), мы получили прекрасный эффект.

Известно, что широкий спектр антимикробной активности препаратов, как правило, достигается путем комбинирования нескольких лекарственных субстанций на базе одной или нескольких групп химических веществ. При этом сочетание различных химических структур в композиции позволяет достичь синергического эффекта и получить препараты с новыми полезными

свойствами. [1-6; 8]. В связи с этим перспективным является создание комплексных препаратов, обладающих широким спектром антимикробной активности и высокой эффективностью, при лечении желудочно-кишечных заболеваний бактериальной этиологии у молодняка крупного рогатого скота.

Одной из важнейших задач ветеринарной фармакологии является разработка и внедрение в практику новых препаратов, однако не изучив фармакотоксикологических свойств препарата, его нельзя рекомендовать производству.

В связи с этим нами была изучена субхроническая токсичность и переносимость на телятах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Переносимость и субхроническую токсичность препарата изучали согласно «Методических рекомендаций по экспериментальному (доклиническому) и клиническому изучению новых фармакологических веществ», 2005 [7].

Опыт №1 и №2 проведены на базе

ООО «Авангард» Рязанского района Рязанской области. Под опыт №1 по переносимости было отобрано 15 телят в возрасте 1-1,2 месяца, из которых было сформировано 3 группы по 5 голов в каждой по принципу пар-аналогов. Первая группа была контрольной, препарат не применяли. Вторая, третья – опытные группы. Опытным группам животных препарат Ципровентор вводили перорально из расчета 0,4 г/10 кг и 1,2г/10 кг живой массы в течение 5 суток. В начале и в конце эксперимента животных взвешивали.

Опыт №2 по изучению влияния препарата Ципровентор на организм телят в субхроническом эксперименте проводили на 17 телятах 2-4,5 месячного возраста, которых разделили на 3 группы по принципу аналогов. Первая группа служила контролем, и препарат не получала, второй (телята) – задавали препарат в дозе 0,4 г/10 кг массы тела, третьей – в дозе 1,2г/10 кг массы тела. Препарат давали в течение 30 дней. В течение опыта за животными вели клиническое наблюдение и брали кровь для определения гематологических и биохимических показателей, согласно методическим рекомендациям.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов проведенных исследований по изучению переносимости показал, что Ципровентор в терапевтических и трехкратно увеличенной дозах не влиял на физиологические показатели крови.

Таким образом, анализируя полученные результаты, мы пришли к выводу, что препарат Ципровентор в терапевтической и трехкратно увеличенной дозах положительно влияет на организм телят (табл. 1).

Из таблицы 1 видно, что под влиянием препарата Ципровентор введенного в трехкратно увеличенной дозе (опыт №1), содержание эритроцитов у телят опытных групп в конце эксперимента было на 2,62-3,4% выше, чем в контрольной группе. В

опытных группах количество гемоглобина также увеличилось по сравнению с контрольной группой – на 7,34-19,4%, что свидетельствует о положительном влиянии препарата на морфологические показатели крови.

Таким образом, исследование морфобиохимических показателей крови телят опытных групп после применения препарата Ципровентор свидетельствует о его хорошей переносимости и выраженном его биологическом действии на организм животных.

В результате взвешивания животных установлено, что как в контрольной группе, так и в опытных группах рост животных соответствовал нормативным показателям. Сохранность животных в опыте составила 100%.

Установлено: клинические признаки (угнетенное состояние, диарея) у животных контрольной группы и 1, 2 подопытных в опыте №2 по изучению токсичности не обнаруживали.

В гематологической картине и биохимических показателях изменений не наблюдали. Количество эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина были в пределах физиологической нормы у животных всех групп (табл. 2).

Таким образом, препарат Ципровентор заданный телятам в дозах 0,4 и 1,2 г/10 кг массы животных в течение 30 дней, не вызывает изменений в гематологических и биохимических показателях (крови животных).

Установлено, что ни одна из применяемых доз препарата, заданного в течение 30 дней, не оказывала отрицательного действия на организм животных. Клиническое состояние животных на протяжении всего опыта, а так же в конце его практически не отличалось от контрольных животных.

Колебания в количестве эритроцитов и лейкоцитов в 1 мкл крови, содержании гемоглобина и в лейкоцитарной формуле

Таблица 1

Морфо-биохимические исследования крови телят

| Показатели | Группы | | |
|---------------------------------------|----------|-------------|-------------|
| | контроль | 2 - опытная | 3 - опытная |
| Эритроциты, $10^{12}/л$ | 5,3±0,4 | 7,9±1,0 | 8,7±1,0 |
| Лейкоциты, $10^9/л$ | 6,5±0,5 | 7,1±0,3 | 7,0±0,4 |
| Гемоглобин, г/л | 87,9±5,2 | 94,8±8,9 | 97,3±6,3 |
| Фагоцитарная активность лейкоцитов, % | 60,4±6,7 | 72,2±12,4 | 76,0±10, |
| Общий белок, г/л | 64,4±5,9 | 67,7±4,3 | 68,8±3,6 |
| Билирубин, мг% | 0,6±0,0 | 0,58±0,0 | 0,6±0,0 |
| Кислая фосфатаза, ед. Боданского | 3±0,2 | 3,2±0,4 | 4,0±0,6 |
| Щелочная фосфатаза, ед. Боданского | 4,4±0,4 | 4,8±0,6 | 5,2±0,8 |
| Мочевина, мг% | 22,2±0,9 | 21,4±1,2 | 20,8±0,9 |
| Через сутки (кровь) | | | |
| Билирубин, мг% | 0,4±0,0 | 0,6±0,1 | 0,7±0,0 |
| Кислая фосфатаза, ед. Боданского | 3,4±0,0 | 3,6±0,0 | 4,4±0,0 |
| Щелочная фосфатаза, ед. Боданского | 4,2±0,7 | 4,4±0,3 | 4,8±0,6 |
| Мочевина, мг% | 26,7±1,2 | 27,9±2,1 | 28,4±1,3 |
| Через 5 суток (кровь) | | | |
| Билирубин, мг% | 0,2±0,0 | 0,4±0,0 | 0,8±0,1 |
| Кислая фосфатаза, ед. Боданского | 3±0,01 | 3,6±0,1 | 3,8±0,0 |
| Щелочная фосфатаза, ед. Боданского | 3,8±0,2 | 3,4±0,3 | 4,8±0,1 |
| Мочевина, мг% | 24±1,1 | 22,5±1,8 | 24,6±1,3 |
| До начала исследований (моча) | | | |
| Удельный вес | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 |
| Показатель рН | 6,4±0,0 | 6,8±0,1 | 7,2±0,1 |
| Через сутки (моча) | | | |
| Удельный вес | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 |
| Показатель рН | 7,2±0,0 | 7,6±0,1 | 7,4±0,1 |
| Через 5 суток (моча) | | | |
| Удельный вес | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 |
| Показатель рН | 6,6±0,0 | 6,2±0,0 | 6,8±0,0 |

Таблица 2

Биохимические показатели крови и мочи подопытных телят

| Показатели | Номера групп | | |
|---|--------------|----------|----------|
| | 1-контроль | 2 | 3 |
| Через сутки после завершения дачи препарата | | | |
| Билирубин, мг% | 0,6±0,0 | 0,6±0,0 | 0,6±0,0 |
| Кислая фосфатаза, ед. Боданского | 3,3±0,2 | 3,1±0,2 | 3,4±0,4 |
| Щелочная фосфатаза, ед. Боданского | 4,7±0,2 | 4,6±0,3 | 4,8±0,2 |
| Мочевина, мг% | 20,6±0,2 | 20,7±0,8 | 20,8±0,3 |
| Через 5 суток (кровь) | | | |
| Билирубин, мг% | 0,6±0,0 | 0,6±0,0 | 0,6±0,0 |
| Кислая фосфатаза, ед. Боданского | 3,3±0,0 | 3,4±0,0 | 3,3±0,0 |
| Щелочная фосфатаза, ед. Боданского | 4,4±0,2 | 4,3±0,3 | 4,5±0,2 |

Таблица 3

Результаты клинико-гематологического изучения влияния препарата на организм телят

| Группа | Эритроциты (x10 ¹²) | Лейкоциты (x10 ⁹) | Гемоглобин, г% | Лейкоцитарная формула, % | | | | | | Л | Мн |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------------|---------|------------|---------|----------|-----------|---------|----|
| | | | | Б | Э | Нейтрофилы | | | С | | |
| | | | | | | Ю | П | С | | | |
| конт-роль | 6,1±0,2 | 8,5±0,2 | 10,6±0,2 | 0,7±0,1 | 5,9±0,5 | - | 6,2±0,3 | 22,0±1,1 | 60,9±1,9 | 3,8±0,2 | |
| 1 | 6,0±0,3 | 8,4±0,2 | 10,7±0,2 | 0,6±0,1 | 6,0±0,3 | - | 6,3±0,2 | 21,8±2,0 | 60,4±2,11 | 4,2±0,0 | |
| 2 | 6,0±0,2 | 8,6±0,1 | 10,5±0,2 | 0,6±0,1 | 6,6±0,3 | - | 6,4±0,3 | 22,1±2,2 | 59,6±1,6 | 4,6±0,0 | |

телят первой и второй подопытных групп в течение всего периода исследований были в пределах нормы и существенно не отличались от показателей животных контрольной группы. Удельный вес мочи и показатель рН мочи подопытных животных не изменились после введения препарата Ципровентор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения 2-х экспериментов установлено, что Ципровентор заданный животным в терапевтической (0,4 г/10 кг) и трехкратно увеличенной (1,2 г/10 кг) дозах существенно не влияет на физиологические показатели крови и мочи как при изучении переносимости, так и субхронической токсичности.

Shipping and subchronic toxicity of a preparation Tsiproventor on calfs.

D.N. Filimonov, G.I. Pavlenko.

ABSTRACT

As a result of carrying out 2 experiments it is established that Tsiproventor set by an animal in therapeutic (0,4g/10 kg) and it is triple increased (1,2g/10 the kg) doses significantly doesn't influence physiological indicators of blood and urine as when studying shipping, and subchronic toxicity. Under the influence of the drug Tsiproventor entered in a threefold increase in dose (Experiment №1), erythrocyte calves experimental groups at the end of experimentation was to 2,62-3,4% higher than in the control group. In the experimental groups the amount of hemoglobin also increased compared with the control group - on 7,34-19,4%, reflecting the positive effect of the drug on the morphological parameters of blood.

It is found that none of the applied doses, given for 30 days, no adverse effects on the organism of animals. The clinical condition of the animals throughout the experiment, as well as in the end it did not differ from the control animals. Fluctuations in the quantity of erythrocytes and leucocytes in 1 ml of blood, and the hemoglobin content in leuco-

cyte calves first and second experimental groups during the study period were normal and did not differ significantly from that of control animals. Urine specific gravity and pH of urine in laboratory animals have not changed after administration Tsiproventor. Thus, the study of morphological and biochemical indices of the blood of calves experimental groups after treatment Tsiproventor evidence of its good tolerability and expressed its biological effect on the animal organism.

Key words: Tsiproventor, calfs, shipping, subchronic toxicity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пилипейко В.Г., Мындра А.Г., Татарчук О.П. Чувствительность к антибиотикам ряда патогенных бактерий птицы. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. -2008. -№3. -С. 27-28.
2. Скворцов В., Юрин Д. Фармакокинетика ципрофлоксацина в организме свиней после однократного перорального введения // Ветеринария с.-х. животных. -2013. -№1. -С. 39-41.
3. Скворцов В.Н., Юрин Д.В. Антимикробная активность и лечебная эффективность ципрофлоксацина при сальмонеллезе свиней // Вестник Алтайского госуд. Аграрного университета. -2013. -№5. - С. 102-103.
4. Скворцов В.Н., Юрин Д.В., Заикина Е.Н. Антимикробная активность ципрофлоксацина // Бюл. научн. работ// Белгородский госуд. с.-х. академия им. В.Я. Горина. -2012. -В.32. - С. 43-50.
5. Скворцов В.Н., Юрин Д.В., Заикина Е.Н. Антимикробная активность, терапевтическая и профилактическая эффективность ципрофлоксацина при экспериментальном колибактериозе лабораторных животных. // Вет. Паталогия. -2013. -№2. - С. 65-68
6. Скоробогатых Ю.И., Перунова Н.Б., Курлаев П.П., Бухарин О.В. Экспериментальное изучение комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на образование биопленок условно патогенными бактериями // Журнал Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. -2010. -№6. - С. 3-6.
7. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. -М. - 2005.
8. Яковлев В.П. Ципрофлоксацин в клинической практике / В.П. Яковлев, Е.Н. Падейская, С.В. Яковлев. - 2-е изд.. - М.: Вузовская книга. -2009. - 320 с.

УДК 546.78

СТРОЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПРЕПАРАТА АРГОВИТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ЕГО РАЗВЕДЕНИЯ



Шкиль Н.Н.¹ – к.в.н., доцент, Бурмистров В.А.²,
Шкиль Н.А.¹ – д.в.н., профессор,
¹ФГБНУ Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока, г. Новосибирск, ²ООО НПЦ
«Вектор- Вита», г. Новосибирск

РЕФЕРАТ

Изучено строение и определены размеры наночастиц серебра препарата арговит в концентрированном и в разведённой дистиллированной воде виде как обоснование для дальнейшей оценки влияния на терапевтические и токсикологиче-

ские свойства. Методом просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе JEM-100CX («Jeol», Япония) установлены полиморфные характеристики наночастиц серебра препарата арговит в виде сферической, треугольной и многогранной форм, с характерным чётким контуром, высокой электронной плотностью. Изучение 263 наночастиц серебра препарата арговит в концентрированной форме, позволило установить, что их средний размер составляет $67,7 \pm 19,4$ нм со степенью эллиптичности - $1,3 \pm 0,3$. При анализе строения 468 наночастиц препарата арговит разбавленным дистиллированной водой 1:10 установлено снижение их среднего размера до $36,0 \pm 12,7$ нм и эллиптичности до $1,19 \pm 0,14$.

Ключевые слова: полиморфность наночастиц серебра, арговит, эллиптичность.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания инфекционной природы остаются важной проблемой ветеринарной практики, лечение которых сводится к применению широкого спектра антибактериальных веществ, что привело к появлению феномена полирезистентности микроорганизмов, а так же аллергических реакций и токсических эффектов. Решением проблемы является поиск новых препаратов обладающих антибактериальной активностью, низкой токсичностью и выраженной терапевтической эффективностью при применении [1]. Таким требованиям отвечает новое направление в фармакологии с использованием лекарственных веществ нанометрового диапазона.

Терапевтические свойства препаратов серебра широко известны, однако ряд исследователей отмечают токсические явления и недостаточный терапевтический эффект [2,3]. Современные методы нанотехнологии позволяют получать наночастицы (НЧ) способные увеличить биодоступность препаратов, и как следствие повысить их терапевтическую эффективность, а так же значительно снизить их токсичность. В настоящее время разработаны технологии получения наносеребра в обратных мицеллах, газодинамическим распылением и электрохимическое получение наносеребра [4].

Многочисленные исследования показали, что терапевтические свойства НЧ, а так же механизм их биологического действия зависят от структуры, размеров,

физико-химических характеристик, стабильности, а так же способа получения лекарственного сырья [5-7].

Цель работы – провести изучение строения и определение размеров наночастиц серебра препарата арговит методом просвечивающий электронный микроскоп в концентрированном и в разведённом в дистиллированной воде виде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат арговит (ООО НПЦ «Вектор-Вита», г.Новосибирск) - жидкость темно-коричневого цвета с зеленовато-сероватым оттенком, с содержанием кластерного (коллоидного) серебра в концентрированном растворе. Для исследования использовали образец препарата в концентрированном и разбавленном дистиллированной водой в соотношении 1:10. Оценку размера и формы наночастиц серебра препарата арговит проводили с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-100CX («Jeol», Япония).

Образцы для микроскопирования готовили на медной сеточке для электронной микроскопии с формваровой плёнкой, где выкладывали их на чистую фильтровальную бумагу, затем на сеточку наносили 4 мкл образца суспензии, перенося каплю с сеточки на бумагу и высушивая образец в течение 5 минут. Пробы были исследованы на микроскопе при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты электронной микроскопии позволили установить, что все образцы

содержат частицы серебра нанометрового диапазона, которые распределялись по-разному: на электронно-микроскопических изображениях видны как одиноч-

ные частицы так и группы. Визуализируются контрастные частицы сферической, треугольной, многогранной формы, с характерным для наночастиц серебра видом

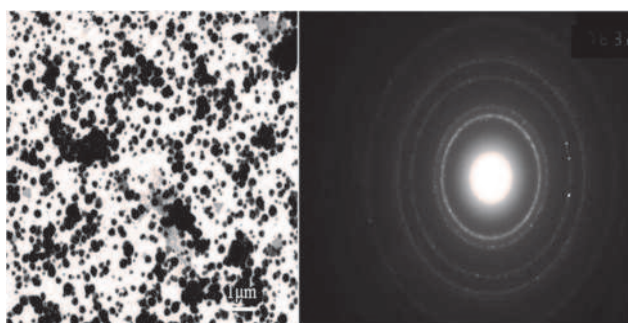


Рис.1. Строение наночастиц серебра препарата арговит

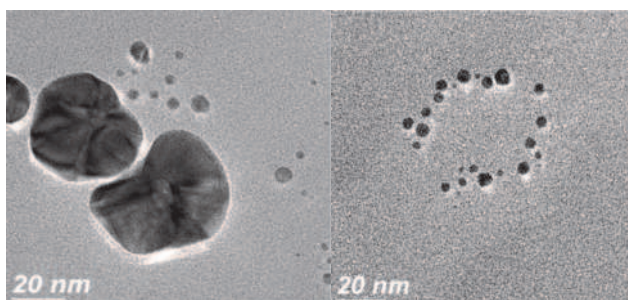


Рис.2. Строение наночастиц серебра препарата арговит: а – в концентрированной форме; б – разведённый дистиллированной водой 1:10

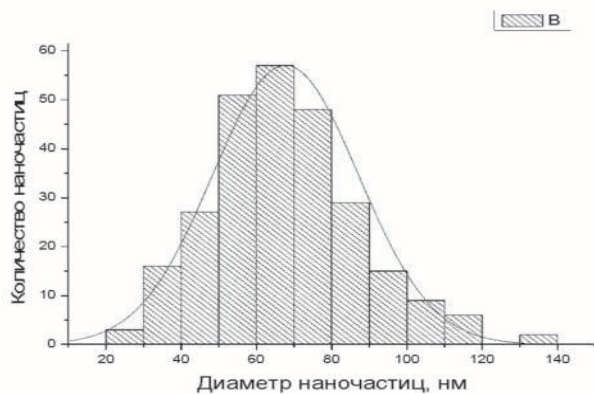


Рис.3 Гистограмма распределения по диаметру наночастиц серебра концентрированного препарата арговит

- чётким контуром, высокой электронной плотностью и характерной дифракционной картиной в виде колец и рефлекса для большого количества наночастиц (рис.1). При растворении препарата 1:10 в дистиллированной воде отмечено сохранение типичной полиморфной формы наноструктур (прямоугольное, треугольное или овальное) с уменьшением их в размере (рис.2).

Измерение 263 НЧ концентрированного препарата арговит позволило установить, что их размер варьирует от 20 до 139,3 нм, при среднем значении – $67,7 \pm 19,4$ нм. Распределение НЧ в зависимости от размера представлено на рис.3. Анализ 263 НЧ серебра позволил установить среднюю степень эллиптичности, которая составила $1,3 \pm 0,3$ (рис.4).

При растворении препарата в дистиллированной воде 1:10 установлено, что средний диаметр 468 НЧ серебра составил - $36,0 \pm 12,7$ нм, при этом диапазон значений варьировал от 2,3 до 101,3 нм (рис.5). При изучении 468 НЧ разбавленного препарата арговит 1:10, отмечается снижение степени их эллиптичности относительно концентрированного образца, при этом среднее значение составило - $1,19 \pm 0,14$ (рис.6).

Препарат арговит в концентрированной форме содержит частицы серебра нанометрового диапазона. Средний размер наночастиц, а точнее агрегатов наночастиц серебра в этих препаратах различается, и в значительной мере это

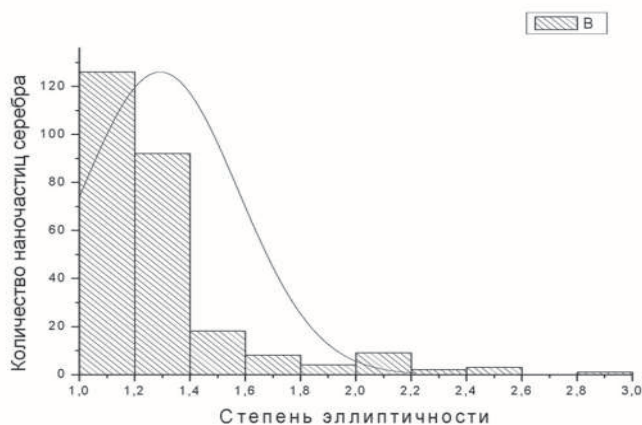


Рис. 4. Гистограмма степени эллиптичности наночастиц серебра препарата арговит

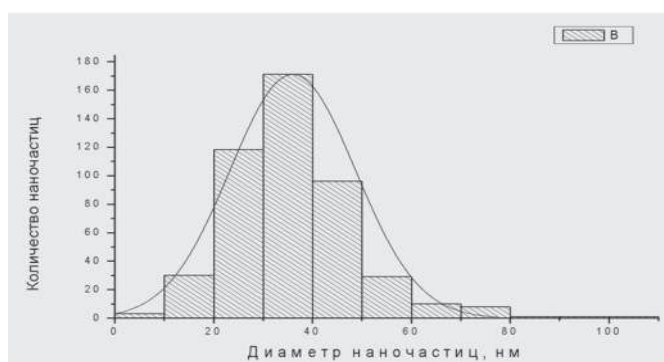


Рис. 5. Гистограмма распределения по диаметру наночастиц серебра разбавленного раствора препарата арговит

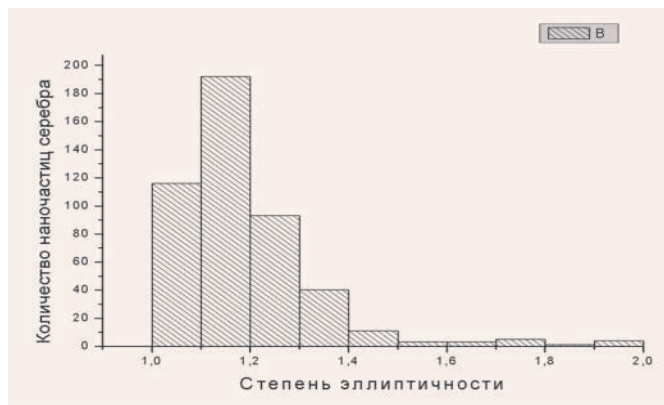


Рис. 6. Гистограмма степени эллиптичности наночастиц серебра для разбавленного раствора 1:10 препарата арговит

различие обусловлено его концентрацией. То есть, в растворе арговита существует и поддерживается определенное динамическое равновесие между наночастицами серебра и их агрегатами, зависящее от концентрации наносеребра. При разведении препарата 1:10, средний размер частиц снижается с $67,7 \pm 19,4$ до $36,0 \pm 12,7$ нм, а степень эллиптичности с $1,3 \pm 0,3$ до $1,19 \pm 0,14$, что обуславливает необходимость проводить исследования по изучению терапевтических и токсикологических свойств препарата в зависимости от степени его концентрации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования методом просвечивающий электронной микроскопии позволили установить полиморфность наночастиц серебра препарата арговит., а так же их размер - $67,7 \pm 19,4$ нм, со степенью эллиптичности - $1,3 \pm 0,3$.

Разбавление препарата арговит дистиллированной водой 1:10 вызывает снижение размера наночастиц до $36,0 \pm 12,7$ нм и их эллиптичности - $1,19 \pm 0,14$.

Structure of nanoparticles of silver of preparation argovit depending on extent of its cultivation.

N. Shkil, V. Burmistrov, N. Shkil.

ABSTRACT

The study of the structure and sizing of silver nanoparticles in drug argovit concentrated and diluted with distilled water as a study to assess the impact on the

therapeutic and toxicological properties. TEM microscope JEM-100CX («Jeol», Japan) set polymorphous characteristics argovit preparation of silver nanoparticles in the form of spherical, triangular, polyhedral shape, with a clear outline characteristic, a high electron density. A study of 263 silver nanoparticle drug argovit in concentrated form, allowed to establish their average size – $67,7 \pm 19,4$ nm with the degree of ellipticity – $1,3 \pm 0,3$. When analyzing the structure of the nanoparticles 468 drug argovit diluted 1:10 with distilled water found a decrease in their average size to $36,0 \pm 12,7$ nm and ellipticity – $1,19 \pm 0,14$.

Key words: polymorphism of nanoparticles of silver, argovit, ellipticity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шкиль Н.Н., Шкиль Н.А., Бурмистров В.А. и др. Антимикробные свойства, фармако-токсикологические характеристики и терапевтическая эффективность препарата Арговит при желудочно-кишечных

болезнях телят // Научный журнал КубГАУ). –Краснодар. -2011. – №04(68). -С. 526–536.

2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М. -1986. -С. 342-343.

3.Червяков Д.К. Лекарственные средства в ветеринарии.- М. -1977. –С.132-133.

4. Блажитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П. и др. // Серебро в медицине. -Новосибирск. -2004. -254с.

5. Гринь В.В. Механизмы действия лекарственных веществ, содержащих наночастицы серебра // Успехи современного естествознания. -2014. -№6. -С.101-102.

6. Черных В.В. Методы получения наночастиц для фармпрепаратов // Успехи современного естествознания. –2014. –№ 6. –С.112.

7. Мороз А.Н. Потенциальные риски использования нанопрепаратов // Успехи современного естествознания. –2014. –№ 6. –106с.

УДК: 619:616.9-036.2

ПРИМЕНЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТЕЛЯТ С ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ

Скриплёва Т.А.¹ - аспирант кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, Кузьмин В.А.¹ – д.в.н., профессор кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, Лунегов А.М.¹ – к.в.н., доцент кафедры фармакологии и токсикологии, Забровская А.В.² – к.в.н., с.н.с. лаборатории кишечных инфекций, Крутяков Ю.А.³ – к.хим.н., с.н.с. химического факультета.
¹Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, ²ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, ³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова



РЕФЕРАТ

Желудочно-кишечные болезни телят наносят серьезный экономический ущерб животноводству вследствие высокой заболеваемости и падежа, затрат на лечебные мероприятия, снижения продуктивных качеств и племенной ценности животных, а также ослабления резистентности и повышения восприимчивости к другим болезням. Одним из основных направлений лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта у молодняка сельскохозяйственных животных является применение антимикробных

препаратов. Однако в настоящее время наблюдается появление различных видов бактерий, обладающих устойчивостью к действию антибактериальных препаратов, особенно активно используемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве. Поэтому перспективным направлением авторы считают применение препаратов, обладающих выраженным противомикробным действием, и в тоже время не вызывающих формирование лекарственной устойчивости у микроорганизмов. В данной статье описан опыт применения противомикробного препарата на основе наночастиц серебра, химически модифицированных мирамистином, для лечения болезней желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) телят. Рассмотрено влияние препарата Аргумистин® (100 мкг/мл мирамистина, 10 мкг/мл серебра коллоидного) на состав микрофлоры ЖКТ, показатели крови, иммунологический статус телят. Авторами разработана схема применения Аргумистина® для профилактики и лечения энтеритов телят в раннем постнатальном периоде.

Ключевые слова: болезни желудочно-кишечного тракта, наночастицы серебра, мирамистин, Аргумистин.

ВВЕДЕНИЕ

Болезни желудочно-кишечного тракта многие годы занимают лидирующие позиции в структуре заболеваний молодняка крупного рогатого скота [9, 10] и наносят серьезный экономический ущерб животноводству вследствие высокой заболеваемости и падежа, низкой энергии роста переболевших животных, затрат на лечебные мероприятия, снижение продуктивных качеств и племенной ценности животных, а также ослабления резистентности и повышения восприимчивости к другим болезням [2, 6].

Одним из основных направлений лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта у молодняка сельскохозяйственных животных является применение антимикробных препаратов: антибиотиков тетрациклинового и неомицинового ряда, амоксициллина, ампициллина, гентамицина и др., а также применение сульфаниламидных и нитрофурановых препаратов. Однако в настоящее время всё большее значение набирает проблема появления патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью к антибактериальным препаратам, широко используемым в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве. В результате в этиологии инфекционных процессов стали преобладать более устойчивые формы и виды патогенных и условно-патогенных

микроорганизмов [11, 12].

Возможным решением данной проблемы нам представляется применение препаратов, обладающих выраженным противомикробным действием, и в тоже время не вызывающих развитие лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Одним из таких комбинированных средств является ветеринарный препарат Аргумистин® (номер регистрационного удостоверения 77-3-14.14-2411 №ПВР-3-14.14/03088 от 11.11.2014 г.), содержащий в качестве активных веществ мирамистин 100 мкг/мл и коллоидное серебро 10 мкг/мл [1, 3], хорошо зарекомендовавший себя в терапии инфекционных болезней ЖКТ цыплят-бройлеров [4, 5].

Практика показывает, что при соблюдении терапевтических доз, правил и длительности применения, комбинировании с синергичными антимикробными препаратами, серебросодержащие лекарственные средства и материалы весьма эффективны для профилактики и лечения широкого спектра инфекционно-воспалительных процессов и человека и животных [8].

Уникальный компонентный состав Аргумистина® обеспечивает его высокую эффективность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также грибов, дрожжей [7].

Целью наших исследований было изу-

чение возможности использования препарата Аргумистин® для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в ЗАО «Предпортовый» Красносельского района г. Санкт-Петербурга. Согласно данным ветеринарной отчетности за 2014 год, в ЗАО «Предпортовый» болезни желудочно-кишечного тракта телят регистрируются, в основном, у телят в возрасте 10-15 дней и 30-40 дней и проявляются в виде энтеритов.

Исследование проводили среди телят возраста 10-15 дней. Для опыта были выбраны 15 телят с признаками заболеваний желудочно-кишечного тракта: угнетение, вялость, диарея, повышение температуры тела. Из телят были сформированы 3 опытных группы (по 5 голов в каждой группе).

Препарат Аргумистин® (100 мкг/мл мирамистина, 10 мкг/мл коллоидного серебра) применяли перорально в разведении 8 мл препарата в 992 мл воды в дозе 100 мл раствора 3 раза в день, через 2 часа после кормления (выпаивания) телят в течение 7 дней.

Применение Аргумистина® сочетали с обычной схемой лечения энтеритов, применяемой в данном хозяйстве: «голодный» день (замена молока на раствор электролита), применение сорбентов (смектавет, карбовет), при повышенной температуре – антибиотики подкожно или внутримышечно (энроксил – 0,5%-й раствор подкожно в дозе 0,5 мл на 10 кг массы тела теленка в течение 3 дней, тетрациклин – внутримышечно, 0,5 г на 10 кг массы теля в виде 2,5%-го раствора).

В качестве контрольной группы были выбраны телята с признаками энтерита, которых лечили по обычной схеме, применяемой в хозяйстве.

Перед началом исследования у всех телят были отобраны пробы крови для проведения клинического исследования и

определения содержания иммуноглобулина А, а также пробы кала для проведения вирусологического, бактериологического и гельминтологического исследований. Вирусологическое исследование проводили в бактериологической лаборатории Роспотребнадзора (районное отделение Московского района г. Санкт-Петербурга), бактериологическое – в лаборатории кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, гельминтологическое – на кафедре паразитологии им. В.Л. Якимова ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ».

Пробы крови отбирали из яремной вены телят в стерильные пробирки (для проведения клинического анализа крови использовали пробирки со стандартным антикоагулянтом – рабочий раствор гепарина с раствором натрия хлорида 0,9% 1:10; для определения иммуноглобулина А антикоагулянты и стабилизаторы крови не использовались). Лабораторные исследования крови проводили в биохимической лаборатории ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первой опытной группе применяли только рабочий раствор Аргумистина®, во второй опытной группе – применение препарата сочетали со стандартной схемой лечения.

В первой опытной группе устойчивый лечебный эффект от применения препарата наблюдали у телят на четвертый день выпаивания. Во второй опытной группе прекращение поноса у телят наблюдали уже на второй день лечения. Поэтому начиная с четвертого дня курса, телятам данной группы выпаивали только рабочий раствор Аргумистина®.

По результатам вирусологического исследования проб кала энтеровирусов, коронавируса, ротавирусов, аденовирусов не обнаружено. По результатам гельминтологических исследований проб кала яиц гельминтов, ооцист простейших не

обнаружено. При бактериологическом исследовании фекалий у одного теленка из 15 была обнаружена гемолитическая кишечная палочка, у трех – бактерии рода *Campylobacter* (методом ПЦР).

При гематологическом исследовании у телят были обнаружены изменения, свидетельствующие о воспалительном процессе в организме, в частности: увеличение количества лейкоцитов, снижение количества эритроцитов и гемоглобина, нейтрофилия со сдвигом ядра влево.

После курса лечения наблюдали значительное улучшение показателей крови телят: нормализация лейкоцитарной формулы, некоторое увеличение количества эритроцитов, нормальный уровень СОЭ.

У всех телят наблюдалась анемия, что, возможно, было вызвано плохой усвояемостью питательных веществ, поступающих с пищей, вследствие энтеритов. Другой причиной может служить неполноценное кормление коров-матерей в период стельности. Согласно технологической схеме выращивания телят в хозяйстве предусмотрена трехкратная витаминизация телят – в первый день, на седьмой и пятнадцатый дни.

У телят контрольной группы уровень гемоглобина до лечения находился в пределах 54–83 г/л при среднем значении 65,4 г/л. После лечения уровень гемоглобина варьировался в диапазоне 68–92 г/л при среднем значении 79,7 г/л. В первой опытной группе уровень гемоглобина до лечения составлял 50–79 г/л при среднем значении 73,2 г/л. После лечения содержание гемоглобина было в пределах 51–79 г/л при среднем значении 60,3 г/л. Во второй опытной группе уровень гемоглобина до лечения варьировался в диапазоне 50–85 г/л при среднем значении 69,8 г/л. После лечения уровень гемоглобина находился в пределах 47–90 г/л при среднем значении 70 г/л.

Сходным образом изменилось и количество эритроцитов в крови телят. Так, в

контрольной группе до лечения содержание эритроцитов в среднем значении составляло $4,32 \cdot 10^{12}/л$, после лечения – $5,2 \cdot 10^{12}/л$. В первой опытной группе до лечения уровень эритроцитов в среднем значении составлял $4,94 \cdot 10^{12}/л$, после лечения – $3,8 \cdot 10^{12}/л$. Во второй опытной группе до лечения $4,74 \cdot 10^{12}/л$, после – $4,7 \cdot 10^{12}/л$.

В первой опытной группе телят (применяли Аргумистин®) показатели иммуноглобулина А до применения препарата находились в пределах 2,08–4,84 г/л при среднем значении 3,7 г/л. После лечения показатель иммуноглобулина А находился в пределах 1,32–2,95 г/л при среднем значении 2,4 г/л. Во второй опытной группе (сочетанное применение Аргумистина® и обычной терапии) показатели иммуноглобулина А до лечения варьировались в диапазоне 2,44–4,6 г/л при среднем значении 3,1 г/л. После лечения показатели лежали в пределах 1,38–2,38 г/л при среднем значении 2,0 г/л. У телят контрольной группы значение иммуноглобулина А до лечения варьировалось в пределах 1,85 – 3,8 г/л при среднем значении 2,78 г/л. После лечения показатели находились в пределах 2,38–3,2 г/л при среднем значении 2,7 г/л.

Микрофлора ЖКТ телят после лечения не претерпела существенных изменений количественного и видового состава. Гемолитическая кишечная палочка была изолирована у 6 телят, у одного выделялись бактерии *Campylobacter jejuni*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований были сделаны выводы о том, что единый для всех животных этиологический фактор диареи не выявлен. Применение Аргумистина® не оказывало существенного влияния на показатели крови телят, количественный и качественный состав микрофлоры ЖКТ. Лучшие результаты получены при сочетанном применении Аргумистина® и обычной терапии. Уста-

новлено, что оптимальная разовая терапевтическая доза раствора Аргумистина® (8 мл препарата на 992 мл воды) при применении у телят 10-20-дневного возраста составляет 100 мл. Учитывая технологическую схему выращивания телят в ЗАО «Предпортовый», предложена следующая схема применения препарата: по 100 мл рабочего раствора 3 раза в день через 2 часа после выпаивания, в течение 7 дней.

The use of miramistin stabilized silver nanoparticles for the treatment of diseases of the gastrointestinal tract of calves.

T. Skripleva, V. Kuzmin, A. Lunegov, A. Zabrovskaya, Yu. Krutyakov.

ABSTRACT

Gastrointestinal diseases of calves caused economic damage to livestock industry due to high morbidity and mortality, costs of treatment measures, the decline in the productive qualities and breeding value of animals, and weakening of resistance and increase susceptibility to other diseases. One of the main directions of treatment of diseases of the gastrointestinal tract of calves is the use of antimicrobial remedies. Currently there is the emergence of different types of bacteria resistant to antibacterial drugs, especially actively used in medicine, veterinary medicine and agriculture. The authors consider a promising use of means with pronounced antimicrobial action, and at the same time do not caused the development of resistance microorganisms. This article describes the use of a new nanosilver based antimicrobial drug Argumistin® (100 ppm of miramistin, 10 ppm of silver nanoparticles) for treating diseases of the gastrointestinal tract of calves. The effect of Argumistin® on the composition of the intestinal microbiota, blood counts, immune status of calves was evaluated. The effective protocol of Argumistin® application was suggested for prevention and treatment of enteritis of calves in early postnatal period.

Key words: intestinal disease, silver nanoparticles, Argumistin, miramistin.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боляхина С.А. Исследование острой и хронической токсичности препарата Аргумистин / С.А. Боляхина, Г.Ф. Насартдинова, Н.А. Донченко и др. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2014. – №3. – С. 95–101.
2. Иноземцев В.П. Профилактика незаразных болезней – основа сохранности животных / В.П. Иноземцев, О.В. Самсонов, Б.Г. Таллер // Ветеринария. – 2000. – №11. – С. 9-13.
3. Казаринов Н.П. Изучение хронической энтеротоксичности антибактериального препарата Аргумистин® при энтеральном введении / Н.П. Казаринов, Н.А. Донченко, М.С. Богданова, и др. // Аграрная наука. – 2015. – №2. – С. 21–25.
4. Коптев В.Ю. Оценка уровня накопления серебра в тканях и органах цыплят-бройлеров при пероральном и аэрозольном применении коллоидного серебра. / В.Ю. Коптев, М.А. Титова, Н.Ю. Балыбина, Е.А. Коробкова, А.А. Кудринский, А.Н. Денисов, Ю.А. Крутяков. // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2014. – №3. – С. 92–100.
5. Коптев В.Ю. Влияние препарата Аргумистин на приросты и уровень бактериальной контаминации организма бройлеров / В.Ю. Коптев, М.А. Леонова, Н.Ю. Балыбина, Б.В. Виолин, А.А. Кудринский, Ю.А. Крутяков. // Птицеводство. – 2015. – №5. – С. 31–38.
6. Костына М.А. Положительные и отрицательные стороны основных направлений профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / М.А. Костына // Ветеринарная патология. – 2003. – №2. – С. 81-82.
7. Крутяков Ю.А. Синтез, люминесцентные и антибактериальные свойства наночастиц серебра. / Ю.А. Крутяков. // Дисс. ... канд. хим. наук. -Москва. -2008. -144с.
8. Кузьмин В.А. Терапевтическая эффективность комплексных препаратов на основе наносеребра / В.А. Кузьмин, А.М.

Лунегов, А.В. Кудрявцева, К.С. Савенков, Ю.А. Крутяков // Иппология и ветеринария. -2014. -Т.3. -№13. -С. 61–64.

9. Мищенко В.А. Структура заболеваний пищеварительной системы новорожденных телят / В.А. Мищенко, Д.К. Павлов, В.В. Думова, Т.Б. Никешина, А.Л. Пономарев, А.В. Кононов, С.В. Левченко // Ветеринария Кубани. –2008. -№5. –С. 15-17.

10. Олейник А.Н. Расстройство ЖКТ у телят раннего возраста // Ветеринария Кубани. –2009. -№1. –С. 10-13.

11. Шабунин С.В. Фармако-токсикологическая оценка и эффективность тилоколина при колибактериозе и сальмонеллезе телят / С.В. Шабунин, Г.А. Востроилова, В.И. Беляев и др. // Ветеринария. – 2010. –№1. –С. 48-52.

12. T. Edrington Antimicrobial resistance and serotype prevalence of *Salmonella* isolated from dairy cattle in the southwestern United States /C.L. Schultz; K.M. Bischoff et al. // Microbial drug resistance. –2004. – Vol.10. -№1. –P. 51-56.



Зоогигиена, санитария, кормление

УДК 619:616-07

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОРМОВЫХ КОМПОНЕНТОВ С САЛЬМОНЕЛЛЕЗНЫМ БАКТЕРИОФАГОМ ПРОТИВ ПУЛЛОРОЗА ПТИЦ

Карамышева Н.Н. - к.б.н., научный сотрудник НИИЦМиБ, Барт Н.Г. - к.б.н., ст. преподаватель кафедры Микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»



РЕФЕРАТ

Изучено влияние сальмонеллезного бактериофага на организм с/х птицы восприимчивой к пуллорозу, наносящему значительный экономический ущерб птицефабрикам, поскольку снижает продуктивность и сохранность поголовья.

Ключевые слова: сальмонеллезный бактериофаг, пуллороз, профилактика заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Пуллороз (бациллярный белый понос) – инфекционное заболевание, протекающее в острой форме у цыплят и хронически в скрытой форме у взрослой птицы. Возбудитель – бактерии *Salmonella pullorum* и *Salmonella gallinarum*, представляющие собой две разновидности одного и того же рода, способные вызывать заболевание и падёж, как среди молодняка, так и среди взрослой птицы в зависимо-

сти от вирулентности штамма [1].

К данной инфекции восприимчивы все виды птиц, кроме этого необходимо иметь в виду, что сальмонеллы потенциально опасны для человека [3]. По птицефабрикам России количество положительно реагирующей на пуллороз птицы колеблется от 1,5 до 5 %. Заболевание продолжается 3-10 дней и сопровождается высокой летальностью: у цыплят 60-70% , кур – 30-40%, индеек – 60-70% [4].

Пуллороз встречается во всех странах с развитым птицеводством и причиняет значительный экономический ущерб, так как ухудшается сохранность поголовья, привесов, яйценоскости, оплодотворяемости яиц и выводимости цыплят. Соответственно, уменьшается выход готовой продукции [3]. При этом проведение лечебно-профилактических мероприятий достаточно затратное.

Целью наших исследований явилось создание и апробация действия лечебно-профилактической кормовой добавки на основе диатомита с бактериофагами на разновозрастную птицу с предварительным диагнозом пуллороза на основании клинических признаков, смертности и патологических изменений в органах и тканях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на кафедре МВЭ И ВСЭ ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А.Столыпина. Поступившая с ООО «Ульяновская птицефабрика» для проведения серии опытов птица находилась в угнетённом состоянии, понос белого цвета, гребень синюшный. Диагноз был поставлен непосредственно на птицефабрике на основании данных реакции агглютинации (ККРА) с цветным пуллорозным антигеном [3]. Кроме того для бактериологических исследований в лабораторию были направлены трупы цыплят и кур. Диагноз павшей птицы был подтверждён патологоанатомическими и бактериологическими исследованиями. При вскрытии павшей птицы обнаружен характерный сероватый налет и очаги некроза на паренхиматозных органах. При посеве патматериала на питательные среды: в бульоне - на дне серо-белый обильный осадок, на поверхности видна плёнка, на МПА серо-белые колонии, кажущиеся голубоватыми в тонком слое среды, на ВСА нежно зелёные колонии. Биохимические свойства проверяли по методам рекомендованных МУ 4.2.2723-10 "Лабораторная

диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды" Желатин не разжижает, молоко не свёртывает, продуцирует сероводород, индол и аммиак не образует, сбраживает глюкозу, маннит, дульцит, арабинозу, не сбраживает лактозу и сахарозу, нитраты не редуцирует. Современная идентификация сальмонелл в основном опирается на серологические свойства, так как не всегда возможно чётко дифференцировать все типы только по биохимическим тестам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения опыта были сформированы три основные группы разновозрастной заболевшей птицы в возрасте 66 дней, 95 дней и 275 дней в количестве 30 голов каждая группа. В свою очередь каждая группа из 30 голов была разбита по 15 голов на две подгруппы 1 и 2. В первой подгруппе лечение проводилось по классической схеме антибиотиками, наиболее эффективными в отношении сокращения заболеваемости и смертности птицы (хлорамфеникол, хлортетрациклин и аминогликозид апрамицина) во 2 – птице давали кормовую добавку на основе диатомита с добавлением смеси стерильных фильтратов бактериофагов, специфичных к возбудителям пуллорозных инфекций (*Salmonella pullorum*). Время проведения опыта – 5 дней.

В опытных группах (66 дней), где в пищу вносились добавки и антибиотики, выживаемость птицы составила в среднем 69,9% и 58,8% соответственно. В то время как в контрольной группе выжило всего 13,3% поголовья (рисунок 1).

В опытных группах (99 дней), где в пищу вносились добавки и антибиотики, выживаемость составила 74,4% и 68,8% соответственно. В контрольной группе, выжило всего 26,7% птицы (рисунок 2).

В опытных группах (275 дней), где в пищу вносились добавки и антибиотики, выживаемость составила 85,5% и 82,16%

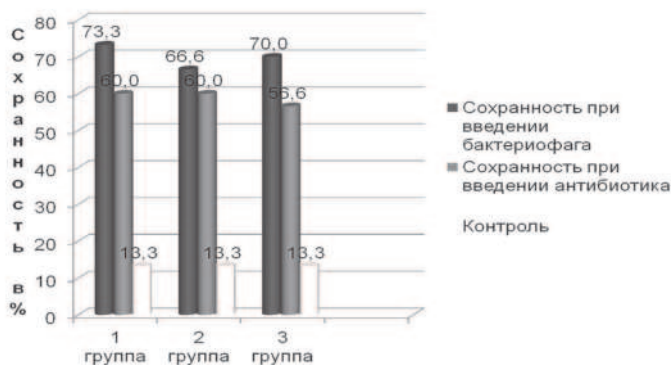


Рис. 1. Сохранность поголовья в опытных группах в возрасте 66 дней

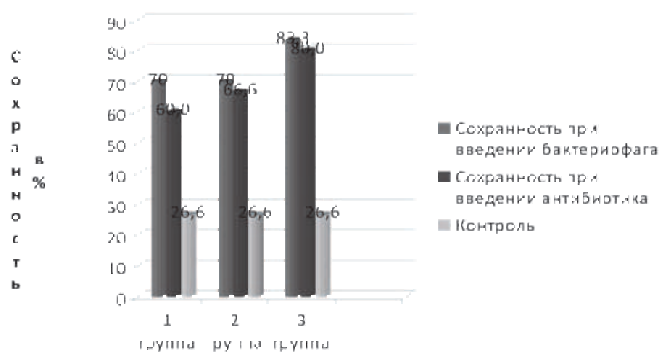


Рис. 2. Сохранность поголовья в опытных группах в возрасте 99 дней

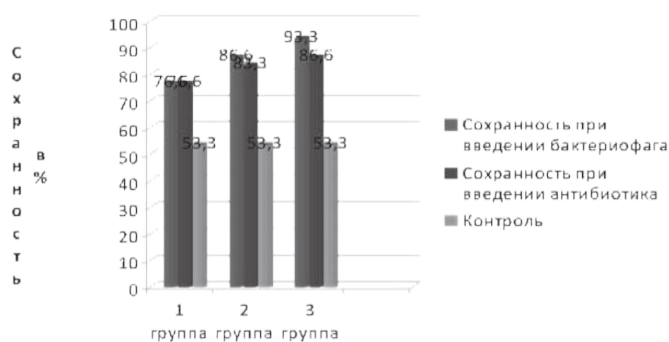


Рис. 3. Сохранность поголовья в опытных группах в возрасте 275 дней

соответственно. В контрольной группе, выжило всего 53,3% птицы (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные

позволяют утверждать, что повышенной устойчивостью к возбудителю пуллороза обладала птица в возрасте 275 дней, с заболеванием в скрытой хронической форме. При лечении антибиотиками состояние птицы стабилизировалось на пятый день лечения, а при введении в рацион добавки с бактериофагами улучшение состояния заболевшей птицы наблюдалось на 3-4 день. Сократилось количество павших голов, и непосредственно при визуальном осмотре было отмечено прекращение бациллярного поноса. Через 4 дня от начала серии опытов с использованием биодобавки птица полностью пришла в норму, состояние было хорошим.

На основании полученных данных можно утверждать, что введение в рацион птицы, в возрастной категории 66, 99 и 275 дней, биодобавки на основе диатомита с бактериофагами способствуют быстрому выздоровлению заболевшего поголовья и являются эффективным лечебным и профилактическим средством при сезонных эпизоотических вспышках. Полученную и апробированную в результате данного эксперимента биодобавку можно рекомендовать промышленным предприятиям в качестве биодобавки в дневной рацион птицы.

цион птицы.

The use of feed ingredients with salmonella bacteriophage against pullorosa birds.

N.N. Karamysheva, N.G. Bart.

ABSTRACT

The influence of the Salmonella bacteriophage on the body with fowl susceptible to pullorosa, causing considerable economic damage to poultry farms, because it reduces the productivity and safety of livestock.

Key words: Salmonella bacteriophage, pullorosis, prevention of the disease.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агиенко А. И. Перспективы использования бактериофага S-394 для профилактики и лечения сальмонеллезов птиц // Сб. науч. тр. мол. уч. Новосибирского государственного медицинского университета. -2013. -№4. -С. 6-8.
2. Зотова З.В., Пименов Н.В. Факторы риска распространения эпизоотии ортомиксвирусной и парамиксвирусной инфекций птиц в Московской области // Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии. - М. -2011. -Вып.7. -С. 145-151.
3. Пименов Н.В. Инновационный метод

профилактики сальмонеллеза и ньюкаслской болезни птиц в условиях мелких и средних хозяйств // Актуальные проблемы развития АПК в научных исследованиях молодых ученых. -М. -2011. -С. 146-149.

4. Пименов Н.В. Бивалентный сальмофаг против сальмонеллеза птиц // Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии. - 2011. -Вып.7. -С. 168-174.
5. Пименов Н.В. Новые методы и средства в борьбе с сальмонеллезом птиц // Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии. -М. -2012. -Вып.8. -С. 138-143.
6. Пименов Н.В. Совершенствование системы противозооотической борьбы с сальмонеллезом птиц // Ветеринарная медицина. -2012. -№3. -С. 38-40.
7. Садртдинова Г.Р. Совершенствование классической схемы выделения клебсиеллезных бактериофагов // SCI-ARTICLE.RU. -2015. -№19.

УДК 619:616.9:636.4

ЛЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛИБАКТЕРИОЗА ЦЫПЛЯТ

Заикина Е.Н. – младший научный сотрудник, Скворцов В.Н. – д.в.н., директор филиала, Балбуцкая А.А. – научный сотрудник, Белгородский филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко»



РЕФЕРАТ

В опыте находилось 850 цыплят суточного возраста кросса Хайсекс Браун, из которых сформировали 17 групп птиц по 50 голов в каждой. Опытным цыплятам за сутки до заражения с лечебно-профилактической целью назначали ци-

профлоксацин. Курс лечения - 1-5 суток. Цыплятам первой, второй и третьей групп ципрофлоксацин назначали перорально с питьевой водой в свободном доступе соответственно в концентрациях 200, 100 и 50 мг/л воды в течение 5 суток. Цыплятам четвертой, пятой и шестой групп ципрофлоксацин назначали по аналогичной схеме, но курс лечения равнялся 4 дням. Цыплят седьмой, восьмой и девятой групп лечили в течение 3 дней. Для цыплят десятой, одиннадцатой и двенадцатой групп курс лечения составил 2

дня. Тринадцатую, четырнадцатую и пятнадцатую группы цыплят лечили одни сутки. Цыплята шестнадцатой группы служили контролем, их лечению не подвергали. Семнадцатая группа цыплят была интактной. Генерализованную инфекцию воспроизводили на вторые сутки жизни цыплят путём их внутрибрюшинного заражения суточной культурой *Escherichia coli* в концентрации 15×10^7 КОЕ/05 мл (1 McFarland). За птицей наблюдали в течение 10 дней после окончания лечения. Проведенные исследования показали, что самый высокий терапевтический эффект (98%) был достигнут в первых двух группах цыплят, которым ципрофлоксацин применяли в концентрациях 100 и 200 мг/л воды в течение 5 дней. Назначение препарата в концентрации 50 мг/л воды, независимо от курса лечения, положительных результатов не дало в этих группах пало от 46 до 70% птиц. Применение ципрофлоксацина в концентрациях 100 и 200 мг/л воды в течение 3–4 дней способствовало выздоровлению 86 – 94% птиц. Двухдневный курс лечения был результативным только при назначении ципрофлоксацина в концентрации 200 мг/л воды (выжило 90% цыплят). Однодневное назначение ципрофлоксацина в концентрациях 100 и 200 мг/л воды приводило к сохранности всего лишь 70% цыплят. На основании полученных нами результатов можно сделать вывод, что при пероральном назначении ципрофлоксацина в свободном доступе с водой в концентрациях 100 и 200 мг/л воды в течение 3–5 дней достигается высокая терапевтическая эффективность.

Ключевые слова: фторхинолоны, ципрофлоксацин, колибактериоз, цыплята, лечение, экспериментальная инфекция, антимикробная активность, терапевтическая эффективность, антибиотики, *Escherichia coli*.

ВВЕДЕНИЕ

В промышленном птицеводстве при его интенсивном ведении повышается опасность инфицирования птицы. Концентрация большого поголовья птицы на ограниченных площадях и искусственный микроклимат ведут к увеличению микробного фона в птичнике, наряду с бесконтрольным использованием антимикробных средств это создает благоприятные условия для развития и быстрого распространения инфекционных болезней [1,3].

Болезни бактериальной этиологии причиняют птицеводству огромный экономический ущерб, что приводит к необходимости поиска новых средств их профилактики и лечения. Одним из основных фармакологических свойств любого лекарственного препарата является его лечебная или профилактическая эффективность [10].

В настоящее время фторхинолоны рассматриваются как серьезная альтернатива высокоактивным антибиотикам ши-

рокого спектра действия. Одним из препаратов данной группы является ципрофлоксацин – химиотерапевтический препарат широкого антимикробного спектра, бактерицидного типа действия, с преимущественной активностью в отношении различных представителей аэробных бактерий [2,5,12,14].

Эффективность использования ципрофлоксацина в птицеводстве отмечают многие специалисты. Так, например, канадские исследователи А. Agunos, D. Leger, С. Carson, изучая штаммы, выделенные от цыплят-бройлеров сообщили, что среди 261 штамма *E. coli* к энрофлоксацину оказались устойчивы всего 6%, а к ципрофлоксацину все штаммы были чувствительны [11]. Результаты исследований, проведенные В. Saidi и соавт. показали, что большинство культур кишечной палочки (n=103), изолированных от кур, были высокочувствительны к ципрофлоксацину (100%) [13].

В проведенных ранее исследованиях, нами также было установлено, что ципрофлоксацин *in vitro* обладает высокой

антимикробной активностью в отношении *Escherichia coli* [6,7], имеет низкую токсичность [4] и оказался эффективным лекарственным средством *in vivo* при экспериментальном колибактериозе лабораторных и сельскохозяйственных животных [8,9].

Целью данного исследования явилось изучение лечебно-профилактической эффективности цiproфлоксацина при экспериментальном колибактериозе цыплят в зависимости от курса лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опыте находилось 850 цыплят суточного возраста кросса Хайсекс Браун, из которых сформировали 17 групп птиц по 50 голов в каждой. Опытным цыплятам цiproфлоксацин выпаивали с лечебно-профилактической целью за сутки до воспроизведения экспериментальной инфекции, применяя различный курс лечения. Цыплятам первой, второй и третьей групп цiproфлоксацин назначали перорально с питьевой водой в свободном доступе соответственно в концентрациях 200, 100 и 50 мг/л воды в течение 5 суток. Цыплятам четвертой, пятой и шестой групп цiproфлоксацин назначали по аналогичной схеме, но курс лечения равнялся 4 дням. Цыплят седьмой, восьмой и девятой групп лечили в течение 3 дней. Для цыплят десятой, одиннадцатой и двенадцатой группы курс лечения составил 2 дня. Тринадцатую, четырнадцатую и пятнадцатую группы цыплят лечили одни сутки.

Цыплята шестнадцатой группы служили контролем, их лечению не подвергали. Семнадцатая группа цыплят была интактной.

Генерализованную инфекцию воспроизводили на вторые сутки жизни цыплят путём их внутрибрюшинного заражения суточной культурой *Escherichia coli* в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/05 мл (1 McFarland). За птицей наблюдали в течение 10 дней после окончания лечения.

Для оценки эффективности лечения учитывали сохранность цыплят и суммарную продолжительность жизни леченых птиц по сравнению с контрольными, которым препарат не давали.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенные исследования показали (табл. 1), что самый высокий терапевтический эффект был достигнут в первых двух группах цыплят, где цiproфлоксацин перорально выпаивали в свободном доступе с водой в течение 5 дней. Так, при применении препарата в концентрациях 100 и 200 мг/л воды сохранность птицы составила 98% (выжило 49 цыплят). Суммарная продолжительность жизни в данных группах составила соответственно 99,2% и 99,4% (пало по одному цыпленку). В то же время при снижении дозы препарата уменьшалась и сохранность птицы, так при выпаивании цiproфлоксацина в концентрации 50 мг/л воды выжило всего лишь 54% цыплят.

Следует отметить, что назначение препарата в концентрации 50 мг/л воды, независимо от курса лечения, положительных результатов не дало. Во всех группах эффективность лечения находилась в пределах 30 – 54%. Здесь же отмечалась и наименьшая суммарная продолжительность жизни птиц, которая равнялась 33,6-80,4%.

Пероральное применение цiproфлоксацина в концентрациях 100 и 200 мг/л воды в течение 3 – 4 дней оказалось результативным. Терапевтическая эффективность лечения составила 86 – 94%. Суммарная продолжительность жизни в опытных группах находилась в пределах 88-97%.

Двухдневный курс лечения был результативным только при пероральном назначении цiproфлоксацина в концентрации 200 мг/л воды. В данной группе после лечебно-профилактической обработки выжило 90% цыплят. При выпаивании препарата в концентрации 100 мг/л

Таблица 1

Терапевтическая эффективность ципрофлоксацина при экспериментальном колибактериозе цыплят

| № группы | Количество цыплят, голов | Концентрация ципрофлоксацина в воде (мг/л) | Курс лечения (дни) | Выжило | | Пало | |
|----------|--------------------------|--|--------------------|--------|-----|-------|-----|
| | | | | голов | % | голов | % |
| 1 | 50 | 200 | 5 | 49 | 98 | 1 | 2 |
| 2 | 50 | 100 | 5 | 49 | 98 | 1 | 2 |
| 3 | 50 | 50 | 5 | 27 | 54 | 23 | 46 |
| 4 | 50 | 200 | 4 | 43 | 86 | 7 | 14 |
| 5 | 50 | 100 | 4 | 47 | 94 | 3 | 6 |
| 6 | 50 | 50 | 4 | 25 | 50 | 25 | 50 |
| 7 | 50 | 200 | 3 | 47 | 94 | 3 | 6 |
| 8 | 50 | 100 | 3 | 44 | 88 | 6 | 12 |
| 9 | 50 | 50 | 3 | 26 | 52 | 24 | 48 |
| 10 | 50 | 200 | 2 | 45 | 90 | 5 | 10 |
| 11 | 50 | 100 | 2 | 20 | 40 | 30 | 60 |
| 12 | 50 | 50 | 2 | 15 | 30 | 35 | 70 |
| 13 | 50 | 200 | 1 | 35 | 70 | 15 | 30 |
| 14 | 50 | 100 | 1 | 35 | 70 | 15 | 30 |
| 15 | 50 | 50 | 1 | 16 | 32 | 34 | 68 |
| 16 | 50 | Контрольная | - | - | - | 50 | 100 |
| 17 | 50 | Интактная | - | 50 | 100 | - | - |

воды сохранность поголовья составила всего лишь 40%.

Однодневное назначение ципрофлоксацина в концентрациях 100 и 200 мг/л воды приводило к сохранности всего лишь 70% цыплят. Суммарная продолжительность жизни в группах составила соответственно 89,8-86,2%.

Все цыплята контрольной группы пали.

В интактной группе заболевших и павших птиц не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при пероральном назначении ципрофлоксацина в свободном доступе с питьевой водой в концентрациях 100 и 200 мг/л воды в течение 3–5 дней достигается высокая терапевтическая эффективность. В этих группах соответственно была и самая высокая

суммарная продолжительность жизни цыплят (88–99,4%).

Правильно выбранный режим дозирования ципрофлоксацина позволяет добиться высоких показателей сохранности поголовья птиц.

Treatment of experimental avian colibacteriosis.

E.N. Zaikina, V.N. Skvortzov, A.A. Balbutskaya.

ABSTRACT

850 one day old chickens breed «Highsex Brown» were included in the experiment. 17 experimental groups consisted of 50 chickens. Ciprofloxacin was administered a 24 hours before they were infected. The course of treatment lasted 1-5 days. Ciprofloxacin was administered orally in the first, second and third groups in doses 50, 100 and 200 mg/l of water during 5 days. Antibiotic was administered in the fourth,

fifth and sixth groups in the same doses during 4 days. Poultry of seventh, eighth and ninth groups were treated during 3 days. Poultry of 10th, 11th and 12th groups were treated during 2 days; birds of 13th, 14th and 15th groups - 1 day. The 16th group was the control and chickens of this group were not treated. The 17th group of chickens was intact. The generalized infection was reproduced in 2 days old chickens by the intraperitoneal introduction of the overnight culture of *Escherichia coli* in dose 15×10^7 microbial cells per 0,5 ml (1 McFarland). The birds were supervised for 10 days after treatment. The investigation has shown that the highest therapeutic efficacy (98%) was in the first and second groups where antibiotic was administered orally in doses 100 and 200 mg/l of water during 5 days. Only 46-70% chickens survived after administration of antibiotic in dose 50 mg/l of water regardless of the duration of treatment. Ciprofloxacin at concentrations of 100 and 200 mg / l of water during 3-4 days contributed survival 86 - 94% of the birds. A two-day treatment was effective after administration of ciprofloxacin in dose 200 mg/ l of water (90% survived chickens). Single assignment of ciprofloxacin at concentrations of 100 and 200 mg/ l of water resulted in the survival only 70% chickens. As a result it was determined that the oral administration of ciprofloxacin in doses 100 and 200 mg/l of water for 3-5 days caused a high therapeutic effect.

Key words: fluoroquinolones, ciprofloxacin, colibacteriosis, chickens, treatment, the experimental infection, the antimicrobial activity, a therapeutic efficacy, antibiotics, *Escherichia coli*.

ЛИТЕРАТУРА

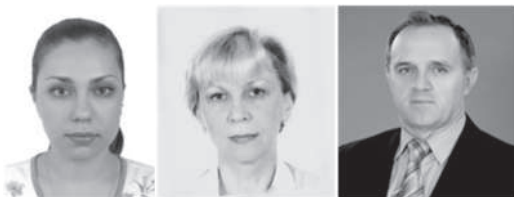
1. Андреева Н.Л. Изучение бактериальных инфекций на птицефабриках Ленинградской обл. / Н.Л. Андреева, М.Е. Дмитриева, А.А. Климов, Л.С. Фогель // Ветеринария. -2004. -№5. -С. 14 - 16.
2. Балбуцкая А.А. Чувствительность штаммов *Staphylococcus intermedius*, выделенных от собак к антимикробным препаратам / А.А. Балбуцкая, Н.А. Сафонова, В.Н. Скворцов, А.В. Войтенко // Ветеринарная патология. -2009. -№2. -С. 51-53.
3. Бессарабов Б.Ф. Профилактика колибактериоза птиц с использованием препаратов «Докси-10», «Энроколи» и «Гидротриприм» / Б.Ф. Бессарабов, И.И. Мельникова, Е.С. Кибардина // Методич. Рекомендации. - М.: ФГОУ ВПО МГАВ-МиБ. -2006. -18с.
4. Заикина Е.Н. Острая токсичность антимикробного препарата на основе ципрофлоксацина для цыплят / Е.Н. Заикина, В.Н. Скворцов // Эффективные и безопасные лек. ср-ва в ветеринарии: мат. III межд. конгр. вет. фарм. и токсикологов. - ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ». -2014. -С. 102-103.
5. Падейская Е.Н. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике / Е.Н. Падейская, В.П. Яковлев. - М. -1998. -352с.
6. Сафонова Н.А. Чувствительность и резистентность *E. coli*, выделенных от животных, к антимикробным препаратам / Н.А. Сафонова, А.А. Балбуцкая, В.Н. Скворцов, Д.В. Юрин, В.В. Маханев // Ветеринарная патология. -2010. -№ 2(33). -С. 45-47.
7. Скворцов В.Н. Антимикробная активность ципрофлоксацина в отношении микроорганизмов, выделенных от различных видов животных / В.Н. Скворцов, Д.В. Юрин, А.А. Балбуцкая, Н.А. Сафонова // Международный вестник ветеринарии. -2012. -№2. -С. 40-43.
8. Скворцов В.Н. Антимикробная активность, терапевтическая и профилактическая эффективность ципрофлоксацина при экспериментальном колибактериозе лабораторных животных / В.Н. Скворцов, Д.В. Юрин, Е.Н. Заикина // Ветеринарная патология. -2013. -№2. -С. 65-68.
9. Скворцов В.Н. Антимикробная активность и лечебная эффективность ципрофлоксацина при колибактериозе свиней /

- В.Н. Скворцов, Д.В. Юрин, Е.Н. Заикина // Вестник Курской ГСХА. -2012. - №.6. -С. 72-74.
10. Соколов В.Д. Повышать эффективность и безопасность лекарств / В.Д. Соколов, Н.Л. Андреева // Международный вестник ветеринарии. -2014. -№4. -С. 8.
11. Agunos A. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada / A. Agunos, D. Leger, C. Carson // Can. Vet. J. -2012. -Vol. 53. - pp. 1289-1300.
12. Parlak M. Identification and Determination of Antibiotic Susceptibilities of Brucella Strains Isolated from Patients in Van, Turkey by Conventional and Molecular Methods / M. Parlak, H. Guducuoglu, Y. Bayram, A. Cikman, C. Aypak, S. Kilic, M. Berktaş // International Journal of Medical Sciences. - 2013. -Vol.10. -№10. -P. 1406-1411.
13. Saidi B. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in and around Harare, Zimbabwe // Avian Dis. -2013. -Vol.4. -No.57 (1). -P. 152-154.
14. Vilaichone R. Antibiotics resistance rate of *Helicobacter pylori* in Bhutan / R. Vilaichone, Y. Yamaoka, S. Shiota, T. Ratanachu-ek, L. Tshering, T. Uchida, T. Fujioka, V. Mahachai. - World j Gastroenterol. -2013. -Vol.7. -No.19 (33). -P. 5508-5512.

УДК 619:616.9:636.4

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДОМАШНИХ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Балбуцкая А.А.¹ – научный сотрудник, Дмитренко О.А.² – д.м.н., ведущий научный сотрудник, Войтенко А.В.¹ – к.б.н., научный сотрудник, Скворцов В.Н.¹ – д.в.н., директор филиала, ¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», ²ФГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации



РЕФЕРАТ

В работе представлены данные о видовом разнообразии представителей рода *Staphylococcus*, изолированных от больных домашних и сельскохозяйственных животных, а также птиц. 248 отобранных образцов были исследованы на наличие бактерий

рода *Staphylococcus* общепринятыми методами. Видовая принадлежность 150 изолированных культур была определена фенотипическими и молекулярными методами. Спектр бактериальных изолятов рода *Staphylococcus* оказался довольно разнообразным и был представлен 19 видами. 81 (54%) изолятов были отнесены к коагулазоположительным видам, 46% - к коагулазоотрицательным. Коагулазоположительные стафилококки были представлены следующими видами: *S. pseudintermedius* (n=56), *S. aureus* (n=16), *S. schleiferi*ssp. *coagulans* (n=4), *S. intermedius*(n=1), *S. delphini*(n=1), не идентифицирован-

ные *Staphylococcus* spp. (n=3). Среди коагулазоотрицательных изолятов, 19 идентифицировали, как *S. xylosum*, 7 изолятов, как *S. epidermidis*, 7 – *S. gallinarum*, 6 – *S. schleiferi* spp. *schleiferi*, 4 – *S. sciuri*, 3 – *S. haemolyticus*, 3 – *S. caprae*, 3 – *S. simulans*, 3 – *S. felis*, 2 – *S. lentus*, 2 – *S. chromogenes*, 2 – *S. lugdunensis*, 1 – *S. piscifermentans*, 1 – *S. saprophyticus*, 1 – *S. kloosii* и 1 – *S. equorum*.

Наиболее распространёнными видами рода *Staphylococcus*, изолированные от домашних животных с различными гнойно-воспалительными заболеваниями, являлись представители группы *S. intermedius* (SIG) (58,5%). *S. aureus*, *S. xylosum* и *S. gallinarum* были доминирующими видами у сельскохозяйственных животных и птиц.

Ключевые слова: стафилококки, видовое разнообразие, гнойно-воспалительные заболевания, домашние животные, сельскохозяйственные животные, птица.

ВВЕДЕНИЕ

Средствозбудителей гнойно-воспалительных заболеваний человека и животных особое место занимают представители рода *Staphylococcus*. Развитие молекулярных методов исследования в конце XX-начале XXI веков позволило значительно расширить номенклатуру видов, образующих род, который к настоящему времени включает более 70 самостоятельных таксонов, в том числе 49 видов и 26 подвидов.

Стафилококки распространены повсеместно: в воздухе, пыли, воде, пищевых продуктах, на поверхности различных объектов внешней среды. Для многих представителей рода характерен выраженный дуализм. С одной стороны – они комменсалы и являются представителями нормальной микрофлоры наружных покровов и слизистых оболочек домашних и диких млекопитающих, птиц и человека. С другой стороны – способны вызывать огромное многообразие гнойно-воспалительных заболеваний у животных и человека [2].

На основании способности коагулировать плазму крови путем продукции плазмокоагулазы, которая активирует преобразование фибриногена в фибрин, род *Staphylococcus* делят на две группы: коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки. Группа коагулазоположительных стафилококков (КПС), которые являются наиболее патогенными представителями рода, в настоящее время

включает 7 видов: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* spp. *coagulans*, *S. lutrae* и *S. hyicus*. Таким образом, тест на свертывание кроличьей плазмы в рутинной диагностической практике теряет дифференциальную значимость, ввиду невозможности отличить *S. aureus* от остальных коагулазопозитивных видов. Коагулазоположительные виды характеризуются полигостальностью и вызывают заболевания у широкого круга хозяев. Долгое время основным возбудителем стафилококковых инфекций у мелких домашних животных (иначе: животных-компаньонов – термин, широко используемый в англо-язычной литературе) считался *S. intermedius*, но применение молекулярных методов для исследования стафилококковых изолятов привело к разделению *S. intermedius* на три отдельных вида, включая *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* и *S. delphini*, которые вместе образуют группу *S. intermedius* (SIG) [6]. Дифференциация стафилококков данной группы с помощью фенотипических и биохимических тестов не возможна из-за вариабельной экспрессии биохимической активности представителей SIG и отсутствия *S. pseudintermedius* в базе данных биохимических тест-систем, поэтому для их идентификации предложены генотипические методы [1,4].

В настоящее время доказано, что микроорганизмы, относящиеся к группе коа-

гулазоотрицательных стафилококков (КОС), также имеют клиническую значимость и являются возбудителями различных гнойно-воспалительных заболеваний. Представители данной группы, как и КПС, способны вызывать не только инфекции кожи и мягких тканей, но и тяжелые жизнеугрожающие состояния и заболевания такие, как катетер-ассоциированная бактериемия, эндокардит, воспалительные процессы мочеполовой системы человека, а также различные виды гнойно-воспалительных заболеваний у других теплокровных [5,8]. Так, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis* и *Staphylococcus xylosus*, которые обычно являются комменсалами для сельскохозяйственных животных, при определенных условиях способны вызывать у них оппортунистические инфекции [10].

Цель данного исследования оценить удельный вес различных видов стафилококка, как возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации у разных видов домашних и сельскохозяйственных животных и птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

248 образцов патологического материала (раневого отделяемое, мокрота, мазки из ротовой и носовой полостей, полости матки, ушных раковин, смывы с конъюнктивы глаз, гнойное отделяемое при инфекциях мягких тканей, синовиальная жидкость, моча, молоко) были получены от животных и птиц с различными гнойно-воспалительными заболеваниями, в том числе от коров (92), свиней (22), собак (87), кошек (29), куриц (17), голубя (1). От вынужденно убитых птиц материалом для бактериологического исследования служили ткани сердца, печени, селезенки, легких.

Образцы высевали на агаризованные среды с добавлением 5% желточной взвеси и 10% NaCl, а так же 5% эритроцитов кролика. Посевы инкубировали 24 ч при

37⁰С. Принадлежность выросших микроорганизмов к роду *Staphylococcus* оценивали на основании морфологических признаков сформировавшихся колоний (включая образование пигмента), расположения в мазке окрашенных по Граму бактериальных клеток, результатов каталазной реакции.

Видовую принадлежность чистых культур определяли с помощью теста на плазмокоагулирующую активность, проводившегося с восстановленной лиофилизированной цитратной плазмой кролика (НПО «Микроген»), и биохимической микротест-системой «STAPHYtest 24» (PLIVA-Lachema s., Чехия).

Для дифференциации изолятов, отнесенных фенотипическими методами к КПС, дополнительно исследовали их в мультиплексной ПЦР для определения структурных различий гена термонуклеазы (*nuc*). В качестве референтных использовали штаммы *S. aureus* NCTC 8325, *S. intermedius* DSM 20373^T, *S. pseudintermedius* LMG 22219^T, *S. delphini* DSM 20771^T и *S. hyicus* DSM 20249^T.

Экстракцию бактериальных ДНК проводили согласно методике, разработанной Дмитренко О.А. с соавторами (2005) [3]. Для амплификации фрагментов генов *nuc* использовали праймеры, предложенные Sasaki с соавторами [7]. При постановке ПЦР использовали: деионизированную воду, амплификационный буфер (10x), 2,5 mM dNTP, MgCl₂, *Taq*-полимеразу (5ед/мкл) фирмы «Силекс» (Россия), праймеры («Евроген»). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом гелеэлектрофореза в 1,5% агарозном геле («LE BioWhittaker», Франция) с окраской фрагментов ДНК бромистым этидием (0,5 мкг/мл) в 1x TAE буфере («Fermentas», Литва) при 100 В. ДНК-рулер (100-1500 н.п.) 100 bp DNA Ladder («Fermentas», Литва) использовали для определения размера ампликонов. Гель фотографировали в

УФ-свете с помощью геле-документирующей системы «DNAAnalyzer» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С помощью фенотипических тестов был определен видовой спектр бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных от больных животных и птиц. Было изолировано 150 культур стафилококков, отнесенных на основании биохимических тестов

к 19 видам. В том числе от собак – 77 культур 11 видов, от кошек – 17 культур 7 видов, от свиней – 11 культур 6 видов, от коров – 27 культур 8 видов, от кур – 17 культур 5 видов, от голубя – 1 изолят (Рисунки 1,2,3,4,5).

При анализе проб были идентифицированы КПС, относящиеся к видам *S. aureus*, *S. schleiferi*ssp. *coagulans*и пред-

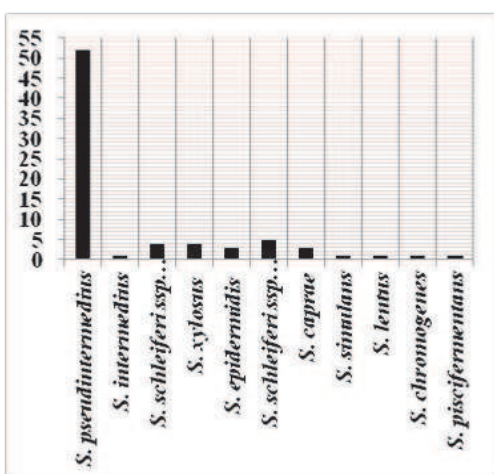


Рис. 1. Спектр бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от собак

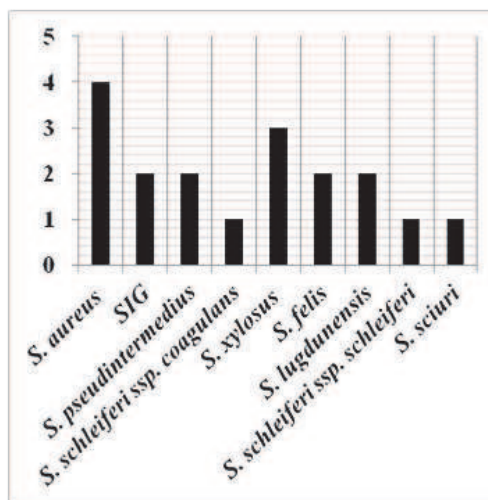


Рис. 2. Спектр бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от кошек

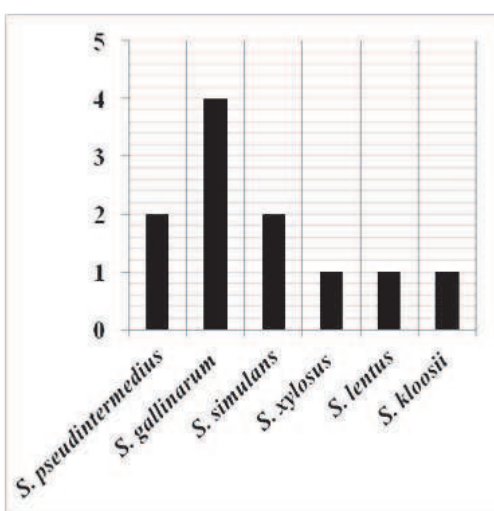


Рис. 3. Спектр бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от свиней

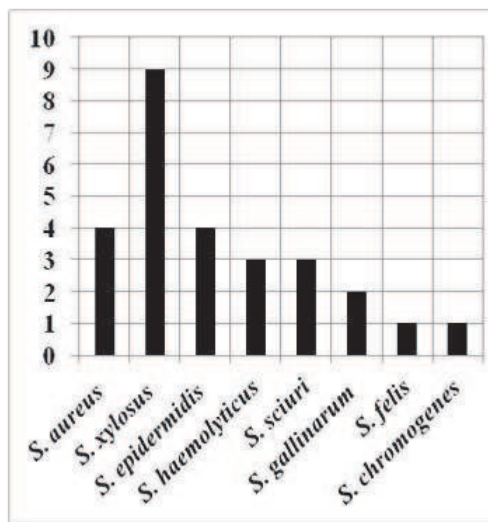


Рис. 4. Спектр бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от коров

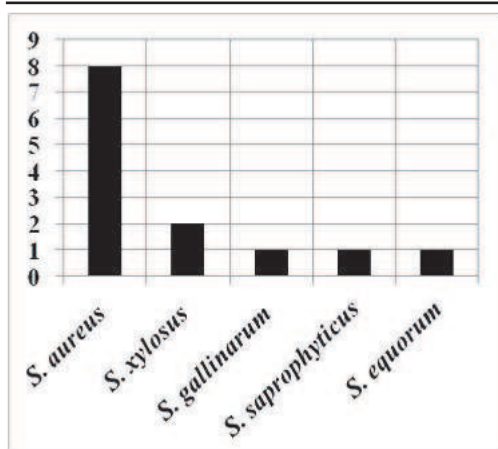


Рис. 5. Спектр бактерий рода *Staphylococcus*, изолированных от кур

ставителям группы *S. intermedius* (SIG). Причем среди коагулазоположительных видов преобладали микроорганизмы SIG (74%), их доля составила: 69% среди изолятов, выделенных от собак (n=53), 23,5% среди изолятов, выделенных от кошек (n=4), от свиней (n=2) – 18%.

Анализ источников выделения 53 изолятов SIG от больных собак показал, что 30% из них составили изоляты, выделенные при отитах, 24,5% от собак страдающих пиодермой, 17% - дерматитом, 5,7% - пиометрой, 3,8% - конъюнктивитом, 2% - ринитом и 2% - перитонитом, 15% составили изоляты, выделенные при раневой инфекции. Данные о выделении SIG от животных с различными клиническими формами заболеваний указывают на ведущую роль стафилококков вышеназванной группы в развитии различных гнойно-воспалительных заболеваний у собак.

От кошек один изолят был выделен при отите, два при цистите и один при катаральном конъюнктивите. Два изолята SIG были выделены от свиней больных экссудативным эпидермитом.

По результатам генотипирования изоляты, первоначально отнесенные к

SIG, были идентифицированы, как *S. pseudintermedius*. Исключение составили 3 изолята, которые по результатам мультипраймерной ПЦР, были отнесены к виду *S. schleiferi*ssp.*coagulans*, и 1 изолят, выделенный от голубя, который был идентифицирован, как *S. delphini*. 2 изолята, отнесенные к *S. schleiferi*ssp. *coagulans* по данным биохимической идентификации, были идентифицированы с помощью ПЦР как *S. pseudintermedius* и *S. intermedius*. Среди собак больных пиодермой наряду с *S. pseudintermedius*, были идентифицированы и другие виды. Так, один из изолятов был отнесен к виду *S. intermedius*, еще 4 изолята были идентифицированные как *S. schleiferi*ssp. *coagulans*. 3 изолята методом мультипраймерной ПЦР идентифицировать не удалось. 16 изолятов, отнесенных к виду *S. aureus* были выделены от больных артритом кур; больных маститом и/или эндометритом коров, и кошек с различными кожными заболеваниями и отитом.

69 (46%) изолятов, отнесенных к КОС, оказались весьма разнообразными по видовому составу. Следует отметить, что среди 16 представленных видов преобладали: *S. xylosus* (n=19), *S. epidermidis* (n=7), *S. gallinarum* (n=7) и *S. schleiferi*ssp. *Schleiferi* (n=6). Из них *S. xylosus* имел наиболее широкий круг хозяев, однако преобладающим (33%) данный вид стафилококка являлся у больных маститом и/или эндометритом коров. *S. gallinarum* был изолирован от больных экссудативным эпидермитом свиней, страдающих эндометритом коров и из тканей сердца курицы *S. epidermidis* выделяли от коров, больных маститом. Данный вид превалировал, как этиологический агент, вызвавший конъюнктивит, у собак. Изоляты *S. schleiferi*ssp. *Schleiferi* были выделены от больных отитом собак.

Возбудителями различных гнойно-воспалительных заболеваний у обследованных животных и птиц в единичных

случаях являлись представители видов: *S. sciuri* (4), *S. haemolyticus* (3), *S. caprae* (3), *S. simulans* (3), *S. felis* (3), *S. lentus* (2), *S. chromogenes* (2), *S. lugdunensis* (2); а также *S. piscifermentans* (1), *S. saprophyticus* (1), *kloosii* (1) и *S. equorum* (1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что спектр бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных от больных животных и птиц оказался довольно разнообразным и был представлен 19 видами. Наибольшее количество видов было выделено от собак и коров (11 и 8, соответственно), а *S. xylosus* обладал наиболее широким кругом хозяев. Ведущую роль в патологии у собак играл представитель SIG – *S. pseudintermedius*, который являлся возбудителем различных гнойно-воспалительных заболеваний. От кошек чаще всего изолировали коагулазоположительные виды SIG и *S. aureus*. Основным возбудителем септического артрита у кур был также *S. aureus*. У коров преобладал *S. xylosus*, который являлся возбудителем мастита и/или эндометрита. Полученные данные согласуются с результатами исследований других ученых, в которых *S. xylosus* является одним из доминирующих видов КОС, изолируемых от больных маститом или эндометритом коров [9,11].

Species diversity of members of the genus staphylococcus isolated from companion and farm animals with different pyoinflammatory diseases.

A.A. Balbutskaya, O.A. Dmitrenko, A.V. Voytenko, V.N. Skvortsov.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the distribution of Staphylococci from diseased companion, farm animals and poultry. For this purpose 248 samples were collected and examined for the presence of *Staphylococcus* species by conventional methods. The species identify a total of 150 strains of staphylococci was determined phenotypic

and molecular methods. The *Staphylococci* isolated were characterized by a wide diversity of species (19 species). 81 (54%) of the *Staphylococcus* spp. were coagulase-positive (CPS), while the remaining (46%) were coagulase-negative. CPS included *S. pseudintermedius* (n=56), *S. aureus* (n=16), *S. schleiferi* sp. *coagulans* (n=4), *S. intermedius* (n=1), *S. delphini* (n=1), other not determined *Staphylococcus* spp. (n=3). Among the 69 coagulase-negative isolates, 19 of them were identified as *S. xylosus*, 7 isolates as *S. epidermidis*, 7 – *S. gallinarum*, 6 – *S. schleiferi* sp. *schleiferi*, 4 – *S. sciuri*, 3 – *S. haemolyticus*, 3 – *S. caprae*, 3 – *S. simulans*, 3 – *S. felis*, 2 – *S. lentus*, 2 – *S. chromogenes*, 2 – *S. lugdunensis*, 1 – *S. piscifermentans*, 1 – *S. saprophyticus*, 1 – *S. kloosii* and 1 – *S. equorum*.

The most prevalent among *Staphylococcus* species isolated from diseased domestic animals were microorganisms of *S. intermedius* group (58,5%). *S. aureus*, *S. xylosus* and *S. gallinarum* were predominant species in farm animals and poultry.

Key words: staphylococci, the species diversity, pyoinflammatory diseases, farm animals, companion animals, poultry.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балбуцкая А.А. Выделение стафилококков *Staphylococcus intermedius* группы от различных видов животных / А.А. Балбуцкая, В.Н. Скворцов, А.В. Войтенко, О.А. Дмитренко // Ветеринарная патология. – 2012. – №4. – С. 26-30.
2. Дмитренко О.А. Род *Staphylococcus* // Руководство по медицинской микробиологии. Книга III, том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / Под редакцией А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой. – М.: Издательство БИНОМ. – 2013. – С. 31-87.
3. Дмитренко О.А. Исследование полиморфизма *tes* ДНК у метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка, выделенных в стационарах разных регионов России / О.А. Дмитренко,

- И.А.Шагинян, А.Л. Гинцбург // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. –2005. - № 3. – С. 11-17.
4. Chanchaithong P. Biochemical marker sandproteinpattern analysis for canine coagulase-positive staphylococciand their distribution on dog skin / P. Chanchaithong, N.Prapasarakul // J. Microbiol. Methods. – 2011. – V. 86. – P. 175–181.
5. D'mello D. Vancomycinhet erores instance in blood stream isolates of *Staphylococcus capitis*/ D.D'mello, A.J. Daley, M.S.Rahman, S. Garland, C. Pearce et al. // J. Clin. Microbiol. - 2008. - V.46. - № 9. - P. 3124–3126.
6. Sasaki T. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains / T.Sasaki, K.Kikuchi, Y.Tanaka et al. // J. of Cl. Microb. – 2007. – V.45. – P. 2770-2778.
7. Sasaki T. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci / T.Sasaki, S.T. Tsubakishita, Y. Tanaka, A. Sakusabe, M. Ohtsuka, S. Hirotaki, T. Kawakami, T. Fukata, K. Hiramatsu // J. of Cl. Microb. – 2010. – V. 48. - №3. – P. 765-769.
8. Shittu A. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections / A. Shittu, J. Lin, D. Morrison, D. Kola-wole // J. Med. Microbiol. - 2004. –V. 53. - № 1. - P. 51–55.
9. Supré K. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others / F. Haesebrouck, R.N. Zadoks, M. Vaneechoutte, S. Piepers, S. De Vlieghe // J. Dairy Sci. - 2011. - V. 94. - № 5. - P. 2329-2340.
10. Thorberg B. Coagulase-negative *Staphylococci* in bovine sub-clinical mastitis / B. Thorberg // Licentiate Thesis Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health Swedish University of Agricultural Sciences. – 2008.–Report № 2.
11. Wagener K. Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows / I. Prunner, H. Pothmann, M. Drillich, M. Ehling-Schulz // Vet. Microbiol. - 2015. – V. 175. - № 2-4. - P. 286-293.



БИОХИМИЯ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ

УДК:619:615.9

ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ПРИМАЛАКТА И ВЛИЯНИЕ ЕГО НА БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС КОРОВ

Брюхова И. В. -к.в.н., научный сотрудник ГНУ ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии,
Шумский Н. И. -д.в.н., зам. директора ООО «СГЦ», Масьянов Ю.Н.- д. в. н., зав. лаборатории экологического мониторинга ГНУ ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии.



РЕФЕРАТ

В статье приведены результаты исследования токсичности нового комплексного препарата прималакт и влияние его на биохимический статус коров. Было установлено, что внутриматочном и внутрицистернальном введении препарат хорошо переносится животными и не оказывает отрицательного влияния на поведение, гомеостаз и обмен веществ.

Ключевые слова: лабораторные животные, переносимость (безвредность), коровы, токсичность, антимикробный препарат, биохимический статус.

ВВЕДЕНИЕ

Ветеринарная наука и практика уделяет большое внимание вопросам профилактики и лечения акушерско-гинекологических заболеваний, которые по данным статистики регистрируют у 10-70% животных и наносят значительный экономический ущерб, проявляясь в виде бесплодия, снижения продуктивности, недополучения приплода и преждевременной выбраковки животных [4].

Для лечения послеродовых заболеваний и маститов применяются разнообразные средства и методы патогенетической, общестимулирующей, этиотропной и симптоматической терапии, и методы физиотерапевтического воздействия [1, 2, 9].

В качестве средств этиотропной терапии, применяют антибиотики, сульфаниламидные и нитрофурановые препараты в различных сочетаниях, в виде растворов, суспензий и других лекарственных форм, но не всегда они дают ожидаемые результаты, прежде всего, из-за снижения чувствительности к ним микрофлоры [6, 7, 8].

Особого внимания заслуживает разработка новых препаратов для лечения и профилактики маститов и послеродовых заболеваний у коров, в частности антибактериального препарата прималакт.

Прималакт – комплексный антибактериальный препарат, рекомендован для лечения и профилактики послеродовых заболеваний и особенно мастита у коров. В состав прималакта входят цефалоспирин третьего поколения и неомидина сульфат.

Учитывая отсутствие данных о влиянии прималакта на организм животных, нами были изучены его токсические свойства и влияние препарата на биохимический статус коров [5].

Цель исследований - изучение пара-

метров токсичности прималакта в остром опыте на лабораторных животных, переносимости (безвредности) на коровах и влияние препарата на биохимический статус животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные исследования проведены на половозрелых конвенциональных нелинейных разнополых белых мышцах с массой тела 18-20 г (194 гол.) и белых крысах с массой тела 170-200 г (136 гол.). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Содержание животных и обеспечение кормами соответствовало нормативным требованиям Международной конвенции.

Изучение параметров токсичности препарата в остром опыте проведено при однократном пероральном, подкожном и внутривенном введении с использованием двухэтапного метода, предусматривающего определение ориентировочной ЛД₅₀ на ограниченном количестве животных методом Дейхмана и ЛеБланка, с последующим определением точного показателя ЛД₅₀. Параметры LD₅₀, LD₁₆, LD₈₄, LD₁₀₀, SLD₅₀ определяли с помощью пробит-анализа с использованием прикладной программы «Статистика+2009».

Опыты выполняли в двух повторностях для каждого вида животных. Группы животных формировали по принципу аналогов, учитывая массу тела, развитие и клиническое состояние. Перед началом опытов животных выдерживали на карантине в течение 14 дней, а перед введением препарата не кормили в течение 12 часов.

Наблюдение за животными проводили непрерывно на протяжении первого дня после введения препарата. В последующем состояние животных учитывали дважды в сутки в течение 14 дней. Регистрировали общий статус и поведение животных, состояние нервно-мышечных и вегетативных функций, шерстного покрова, поедание корма, потребление воды. Особое внимание уделяли развитию призна-

ков токсикоза, оценивали их тяжесть, продолжительность, время выздоровления или гибели животных. Павших животных с признаками отравления препаратом, подвергали патологоанатомическому вскрытию.

В первой серии опытов острая токсичность препарата испытана при пероральном способе введения. Прималакт вводили внутривентрикулярно в дозах от 14000,0 до 34000,0 мг/кг массы тела (белые мыши) и от 5000,0 до 30000,0 мг/кг (белые крысы), через зонд в желудок в объеме для белых мышей - 0,6 мл, для белых крыс - 6,0 мл.

Во второй серии опытов прималакт вводили однократно подкожно в дозах от 10000,0 до 40000,0 мг/кг (мыши) и от 5000,0 до 30000,0 мг/кг (крысы) в объеме 1,0 мл на мышью и 6,0 мл на крысу.

В третьей серии опытов испытана острая токсичность прималакта при интравентрикулярном способе введения. Препарат вводили однократно в дозах от 1000,0 до 8000,0 мг/кг массы тела в объеме 1,0 мл на мышью и 6,0 мл на крысу.

Изучение безвредности (переносимости) прималакта при интравентрикулярном его введении изучали на 12 клинически здоровых коровах на 4-5 месяце лактации, которые были разделены на три группы. Коровам первой опытной группы препарат, в количестве 5 мл (терапевтическая доза), вводили интравентрикулярно однократно в левую переднюю долю вымени. Животным второй опытной группы препарат вводили интравентрикулярно однократно в количестве 20 мл (по 5 мл в каждую долю) (четырёхкратная терапевтическая доза). В каждом опыте предварительно перед введением препарат подогревали до 38 °С, производили выдаивание молока и обработку сосков 70% этиловым спиртом. Контрольным животным препарат не вводили.

Изучение безвредности (переноси-

мости) прималакта при интравентрикулярном введении проведено на 15 коровах красно-пестрой породы, 3-5 отела, массой 500-550 кг, которые были разделены на 3 группы по 5 животных в каждой. Первая группа служила контролем, и препарат животным не вводили. Во второй группе прималакт, предварительно подогрет до температуры 37-40⁰ С, вводили интравентрикулярно с помощью шприца Жане в терапевтической дозе 20 мл на животное, а в 3-й группе – в 3-кратной терапевтической дозе (60 мл на животное).

Влияние прималакта на организм здоровых коров определяли по морфологическим и биохимическим показателям крови, общему состоянию организма животных (частота пульса, количество дыхательных движений, сердечных толчков, сокращений рубца) до введения и через 7 суток после введения. Кровь для исследования брали у коров из яремной вены утром до кормления через 7 суток после однократного интравентрикулярного или интравентрикулярного введения прималакта.

Клеточный состав периферической крови определяли, используя стандартные методики подсчета клеток в камере Горяева.

Исследование крови проводили на анализаторах «АВХМісros 60» и «Hitachi-902» согласно утвержденным методическим рекомендациям по диагностике, терапии и профилактике нарушений обмена веществ продуктивных животных в соответствии с инструкциями к приборам [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первой серии опытов, где острая токсичность препарата изучалась при пероральном способе введения и во второй, где прималакт вводили подкожно однократно, гибели животных при всех дозах за весь период наблюдения за животными (на протяжении 14 дней) не было установлено. Среднелетальную дозу - LD₅₀ определить не удалось, так как при

введении внутрь препарата в максимально возможных объемах (0,6 – 1,0 мл - белым мышам и 6,0 мл - белым крысам) не отмечено признаков интоксикации и гибели животных.

Таким образом, препарат прималакт по степени токсичности относится к IV классу опасности - вещества малоопасные (ГОСТ 12.1.007-76).

В третьей серии опытов, полученные данные позволили определить параметры острой токсичности прималакта при внутрибрюшинном способе введения: LD₅₀ для белых мышей составила 3572,2 мг/кг и белых крыс - 4377,2 мг/кг.

Клинические симптомы острого отравления белых мышей и белых крыс сопровождалось непродолжительным периодом возбуждения с усилением двигательной активности. За непродолжительным периодом возбуждения развивалось резко выраженное угнетение, состояние глубокого сна переходящее затем в кому. Животные не реагировали на световой и тактильный раздражители, не принимали корм. К моменту гибели отмечалось учащенное дыхание и сердцебиение. Дыхание часто становилось поверхностным, прерывистым. Развивалась синюшность кожи и слизистых оболочек. Смерть наступала в состоянии глубокого угнетения.

Патологоанатомические изменения остро отравления лабораторных животных (крыс и мышей) характеризовались гемодинамическими расстройствами, повсеместным застоем венозной крови в подкожной клетчатке и внутренних органах. Желудок при вскрытии пуст, слизистая гиперемирована, в подслизистой дна его мелкоточечные едва заметные кровоизлияния. Слизистая оболочка тонкого отдела кишечника гиперемирована, с наличием в ней мелкоточечных кровоизлияний. В просвете тонкого отдела кишечника у отдельных крыс и мышей отмечалось скопление значительного количества слизи. Печень, почки полнокровны, незначи-

тельно увеличены, окраска неравномерная с фиолетовым оттенком. У большинства трупов легкие гиперемированы с наличием отечной жидкости. Сердце растянуто, предсердия заполнены темно-вишневого цвета кровью. Под эпикардом, особенно в области ушек, множественные кровоизлияния.

Установлено, что введение прималакта коровам интрацистернальным и внутриматочным способом, в изучаемых дозах не оказывало существенного влияния на клинический статус, поведение и аппетит коров. В период всего опыта животные контрольных и опытных групп были подвижны, аппетит выражен, рефлексы сохранены. Нарушений функций пищеварения и мочеотделения не установлено.

При однократном внутриматочном применении прималакта в дозах 20 мл и 60 мл на голову, а также при интрацистернальном введении препарата лактирующим коровам в терапевтической дозе и превышающей терапевтическую дозу в 4 раза, морфологические, биохимические показатели крови и основные виды обмена веществ животных существенно не отличались от показателей у коров контрольных групп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прималакт по степени токсичности относится к IV классу опасности - вещества малоопасные (ГОСТ 12.1.007-76). При внутриматочном и внутрицистернальном введении препарат хорошо переносится животными и не оказывает отрицательного влияния на поведение, гомеостаз и обмен веществ.

Acute toxicity of primalakt and its influence on the biochemical status of the cows.

I.V. Bryukhova, N.I. Shumsky, Y.N. Masyanov.

ABSTRACT

The article represents the results of studying a new complex drug primalakt and its impact on cows' biochemical statuses. It

has been stated that under intrauterine and intracisternal administration the drug is well tolerated by the animals and has no adverse effects on behavior, homeostasis and metabolism.

Key words: laboratory animals, tolerance (harmlessness), cows, toxicity, the antimicrobial agent, biochemical status.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Клименко А.И. Эффективность йодсодержащих препаратов при мастите коров / А. И. Клименко, Л. Г. Роман // Ветеринарная патология. –2010. –№3. –С. 73-79.
2. Нежданов А. Г. Селеносодержащие препараты для профилактики болезней половых органов коров / А. Г. Нежданов, Беляев В. И., Лысенко С. И., Сафонов В. А. // Ветеринария. –2005. –№12. –С. 32-34.
3. Смирнов А.М. Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины / А. М. Смирнов, С. В. Шабунин, М. И. Рецкий, И. М. Донник, В. Н. Скира, А. В. Суворов, Бабышова Л. В. // Часть III. Методы исследования по проблемам незаразной патологии у продуктивных животных. – М. -2007. - 418с.
4. Париков В.А. Состояние и перспективы научных исследований по борьбе с маститом у коров / В.А. Париков, В. Д. Мисай-

лов, А. Г. Нежданов // Актуальные проблемы болезней органов размножения и молочной железы у животных. Матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 35-летию организации ВНИВИПФиТ. - 2005. –С. 3-7.

5. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М. -2005. –832с.

6. Шахов А.Г. Неотложные задачи профилактики мастита у коров // Ветеринария. - 2005. -№8. -С. 3-7 .

7. Шабунин С.В. Фармакотерапия и фармакопрофилактика болезней органов размножения и молочной железы у коров и свиней // Актуальные проблемы болезней органов размножения и молочной железы у животных. Матер. междунар. науч.-пр. конф., посвящ. 35-летию организации ВНИВИПФиТ. -2005. –С. 14-16.

8. Chambers H. F. Cefoprole in vitro profile of bactericidal cephalosporin // Clin. microbial. infect. –2006. –Vol.12. –P. 17 – 22.

9. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy / Thirty-fifth edition. Ed by O. Gilbert, R. Moellering, M. Sande.- Antimicrobial Therapy Inc. – 2005.

УДК 636.4.053:612.11/12

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ДИНАМИКА ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПОРОСЯТ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ БЕТА-КАРОТИНА

Городилова Л.И.– аспирант,

ФГБОУ ВПО «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия»



РЕФЕРАТ

Изучено действие препарата «Липокар», содержащего бета-каротин в липосомальной оболочке на поросятах в группе дорастивания. По истечении 30 дней эксперимента проводили исследования крови на гематологические показатели, оценивали естественную резистентность, уровень респираторных болезней и прирост живой массы тела. Установлено объективное увеличение содержания эритроцитов в крови у опытных поросят на 11,6%, гемоглобина – на 8,3%, лейкоцитов – на 7,5% по

сравнению с контрольной группой. Статистически показано повышение уровня общего белка в опытной группе на 12,0%, альбумина – на 33,5%, ЛАСК – 7,8%, БАСК – на 21,3% по отношению к контролю. Отмечено снижение заболеваемости поросят с респираторным синдромом на 16,2%. Средняя живая масса тела у животных опытной группы была на 3,2 кг выше, чем в контрольной группе. Таким образом, изучаемый препарат, содержащий бета-каротин оказывает стимулирующее воздействие на процессы гемопоэза, показатели естественной резистентности, рост и развитие поросят.

Ключевые слова: поросята, витамин А, резистентность, бета-каротин, живая масса.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из решающих факторов в производстве мяса свиней, полной реализации генетического потенциала продуктивности, снижения затрат кормов на единицу продукции, повышения ее качества, поддержания высокой естественной резистентности организма является полноценное сбалансированное кормление. В кормлении животных стали широко использоваться кормовые добавки, в том числе на основе бета-каротина [1,2,4].

Использование кормовых добавок способствует повышению продуктивности, сохранности животных и снижения заболеваемости, тем самым уменьшаются потери от падежа и вынужденного убоя. При этом повышается специфическая и неспецифическая резистентность организма за счет укрепления клеточного и гуморального иммунитета. Регулируются процессы роста организма, активизируется деятельность желудочно-кишечного тракта, регулируются обменные процессы [3,5,6,7].

Целью наших исследований явилось изучение влияния бета-каротина на гематологические показатели и естественную резистентность поросят.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Научно-хозяйственный опыт проводили на базе СВК «Туклинский», Увинского района УР. Для этого по принципу аналогов подобрали две группы (опытная и контрольная) поросят из группы доращивания по 25 голов в каждой. Продолжительность опыта составила 30 дней. Использовали источник бета-каротина пре-

парат «Липокар», производства ООО «Каратон ЛАД» г. С.-Петербург. Препарат задавали с кормом из расчета 3г/гол.

Проводили исследования крови до и после опыта в опытной и контрольной группах на гематологические показатели, оценивали естественную резистентность, уровень заболеваемости, прироста живой массы тела.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты изменений морфологического состава крови поросят опытной и контрольной групп приведены в таблице 1. Как видно из таблицы 1, с возрастом произошли некоторые изменения в морфологическом составе крови поросят. В частности, достоверно увеличилось содержание эритроцитов в опытной группе на 11,6% по отношению к контролю. Отмечено объективное увеличение количества лейкоцитов у опытных поросят в конце эксперимента на 7,5%.

Скармливание источника бета-каротина способствовало увеличению содержания гемоглобина в крови. Так, у поросят опытной группы уровень гемоглобина повысился на 8,3% по сравнению с контрольной группой.

Установлено, что использование бета-каротина способствовало положительной динамике показателей естественной резистентности организма (табл. 2).

Так, к концу опыта увеличилось содержание сывороточного белка, притом более существенно в крови поросят, получавших препарат «ЛипоКар». Если у поросят контрольной группы уровень белка повысился с возрастом на 9,4%, то у животных опытной группы – на 16,4%, что

Таблица 1

Морфологический состав крови поросят

| Показатели | Группы животных, n=25 | | | |
|-------------------------|-----------------------|---------------|----------------|---------------|
| | контрольная | | опытная | |
| | в начале опыта | в конце опыта | в начале опыта | в конце опыта |
| Эритроциты, $10^{12}/л$ | 6,8±0,2 | 6,3±0,2 | 6,7±0,2 | 7,0±0,2* |
| Гематокрит, % | 44,1±1,5 | 45,7±1,5 | 42,4±1,4 | 46,5±1,2 |
| Лейкоциты, $10^9/л$ | 12,4±0,7 | 12,4±1,4 | 11,9±0,7 | 13,4±0,2* |
| Гемоглобин, г/л | 108,6±2,2 | 109,1±2,5 | 109,9±1,1 | 118,2±1,9* |

Примечание: * $P \leq 0,01$

Таблица 2

Динамика естественной резистентности поросят

| Показатели | Группы животных, n=25 | | | |
|-----------------------------|-----------------------|---------------|----------------|---------------|
| | контрольная | | опытная | |
| | в начале опыта | в конце опыта | в начале опыта | в конце опыта |
| Общий белок, г/л | 59,4±1,3 | 65,0±1,4 | 67,0±1,2 | 78,0±2,8* |
| Альбумин, г/л | 22,6±1,7 | 24,5±1,9 | 28,5±1,3 | 32,7±2,2* |
| Лизоцимная активность, % | 4,6±1,2 | 4,7±0,7 | 4,7±0,4 | 5,1±0,8 |
| Бактерицидная активность, % | 36,1±0,2 | 38,1±0,4 | 35,9±1,2 | 46,2±1,0* |

Примечание: * $P \leq 0,01$

больше на 7,02% от контроля. Аналогичная тенденция выявлена и по возрастной динамике альбумина.

В частности, его содержание в крови поросят, получавших бета-каротин, достоверно увеличилось на 14,74%, в то время, как в контроле возрастное повышение составило 8,41%. Установленная динамика сывороточных белков свидетельствует об усилении обменных процессов в организме поросят, получавших с кормом источник бета-каротина «ЛипоКар».

Анализ лизоцимной активности сыворотки крови (ЛАСК) показал ее повышение у опытных поросят на 7,8% по сравнению с контрольной группой. Соответствующая динамика установлена по бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК). В опытной группе животных БАСК была на 21,3% выше, чем в контроле.

В контрольной группе поросят заболевания с респираторным синдромом соста-

вили 37,6%, в опытной группе заболеваемость была 21,4%, снижение на 16,2%. В конце опыта средняя живая масса поросят в контрольной группе была 52,4 кг, в то время как, в опытной группе – 55,6кг, т.е. на 3,2 кг больше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении эффективности использования бета-каротина в составе препарата «Липокар» на поросятах в группе доразщивания установлено, положительное его влияние на гематологические показатели и уровень естественной резистентности организма.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод, что при введении в рацион бета-каротина, у поросят стимулировались процессы эритропоэза на 11,6%, увеличение содержания гемоглобина на 8,3% и лейкоцитов на 7,5%.

У поросят опытной группы отмечено усиление процессов белкового синтеза по

сравнению с контролем на 16,4%, увеличение содержания альбумина – на 33,5%.

Изучаемая кормовая добавка способствовала повышению уровня неспецифической защиты организма подопытных поросят, что подтверждается увеличением уровня ЛАСК на 7,8%, БАСК – на 21,3% в опытной группе поросят по отношению к контролю.

Таким образом, бета-каротин входящий в состав препарата «Липокар» позволил повысить неспецифическую резистентность организма поросят в группе доращивания, что отразилось снижением уровня респираторных болезней на 16,2%.

Использование кормовой добавки «ЛипоКар» стимулировало рост и развитие поросят. В результате, поросята получавшие комбикорм с указанной добавкой, по живой массе превосходили контрольных аналогов в среднем на 3,2 кг.

Hematological parameters and dynamics of natural resistance of piglets after beta-carotene supplementation.

L.I. Gorodilova.

ABSTRACT

The effect of the drug "Lipokar" containing beta-carotene in the liposome shell piglets in group rearing. After 30 days, the experiment was carried out blood tests on hematological parameters were evaluated natural resistance, the level of respiratory diseases and body weight gain. Established an objective increase in red blood cells in the experimental piglet 11.6% hemoglobin - 8.3%, leukocytes - 7.5% compared with the control group. Statistically shown to increase the level of total protein in the experimental group 12.0%, albumin - by 33.5%, weasel - 7.8%, BASK - by 21.3% relative to the control. Decreased incidence of pigs with respiratory syndrome by 16.2%. The average live weight in the animals of the experimental group was higher by 3.2 kg than in the control group. Thus, the study medication containing beta-carotene has a stimulating effect

on the processes of hematopoiesis, indicators of natural resistance, growth and development of piglets.

Key words: pigs, vitamin A, resistance, beta-carotene, live weight.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов В.А. Использование препаратов бета-каротина в животноводстве и ветеринарии / В.А. Антипов, Д.Н. Уразев, Е.В. Кузьмина. – Краснодар: Кубан. ГАУ. -2001. -118с.
2. Алексеев В. А. Оптимизация витаминного питания свиней / В.А. Алексеев // Материалы XIV международной научно-практической конференции по свиноводству / «Современные проблемы интенсификации производства свинины». Ульяновск. -2007. -Т.2. -С.29-35.
3. Бригадиров Ю.Н. Среда обитания животных и ее влияние на общую неспецифическую резистентность организма / Ю.Н. Бригадиров, А.Н. Ануфриев, В.М. Асламов // Экологические проблемы патологии, фармакологии и терапии животных. – Воронеж. -1997. -С. 54-55.
4. Дмитровский А.А. Пути превращения бета-каротина в витамин А в организме и его регуляции / А.А. Дмитровский. – М.: Докл. ВАСХНИЛ. -1987. -№9. –С. 22-25.
5. Дорожкин В.И. Метаболизм бета-каротина / В.И. Дорожкин, Л.В. Резниченко // Птицеводство. -2004. -№ 3. -С. 6-7.
6. Любин Н.А. Изменение показателей липидно-углеводного обмена у свиней при использовании бета-каротиновых препаратов / Н.А. Любин, А.С. Проворов, Н.А. Проворова, С.В. Дежаткина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. -2013. -№3 (23). -С. 80-86.
7. Olson J.A. Vitamin A. // Handbook of Vitamins, 3rd ed. -2001. -P. 1-50.



**АРХИВИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ ДОКЛИНИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
КАК ЭЛЕМЕНТ СИСТЕМЫ КАЧЕСТВА**

Зайцева М.А.¹, Белостоцкий А.В.², Пикалова Л.В.¹, Марченко С.Д.²

¹ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России,

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Реферат

Архивирование данных, полученных в ходе доклинических исследований, является важным аспектом соответствия испытательного центра Принципам надлежащей лабораторной практики (GLP) организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР). Архив испытательного центра в соответствии с положением о нем комплектуется материалами постоянного и временного хранения. На базе ФГБУН ИТ ФМБА России разработана система архивации материалов доклинических исследований. Передача записей и материалов доклинических исследований в архив осуществляется в течение 1 месяца после согласования с руководителем исследования и утверждения руководителем испытательного центра. Архивариус регистрирует информацию о материалах, передаваемых ему на хранение с указанием следующих позиций: дата передачи; код доклинического исследования; данные о спонсоре; наименование лекарственного средства; документ о назначении руководителя исследования и со-исследователей; протокол доклинического исследования; заключение биоэтической комиссии; сертификат анализа; акт приема-передачи материалов для исследования; карточка учета расходования вещества; первичные данные; финальный отчет, утвержденный руководителем испытательного центра; заключения отдела обеспечения качества; информация о лице, передаваемом документах на хранение; информация о лице, принявшем документах на хранение; присвоенный архивный номер. В помещении архивохранилища должно быть предусмотрены приточно-вытяжная вентиляция, система кондиционирования воздуха, стабильный температурно-влажностный режим, наличие стабилизатора напряжения и источник бесперебойного питания. В помещении для хранения проб и образцов обязательным является наличие холодильной и морозильной установок, а также полки с ящиками для хранения блоков с гистологическими срезами и др. образцов тестируемых объектов. Срок архивного хранения материалов доклинического исследования составляет 15 лет. Выдача материалов и записей доклинических исследований может проводиться после оформления заявки, оформленной в надлежащем порядке. Выданные материалы доклинических исследований должны быть возвращены в архив не позднее, чем через 1 месяц. Уничтожение записей и материалов доклинических исследований, хранящихся в архиве, проводится по решению экспертной комиссии. В случае прекращения существования разработчика лекарственного средства документация, находящаяся на хранении в архиве испытательного центра, подлежит хранению в течение всего срока и последующему уничтожению в соответствующем порядке. В случае прекращения деятельности испы-

тательного центра документация, находящаяся на хранении в его архиве, подлежит передаче разработчику лекарственного средства, либо уничтожению по согласованию со Спонсором. Предлагаемая процедура архивирования материалов и проб доклинических исследований может явиться основой для разработки и внедрения данного процесса в российских научно-испытательных и исследовательских центрах.

Ключевые слова: система качества, доклинические исследования, архивирование материалов.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с Федеральным законом Российской Федерации (РФ) от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», доклиническим исследованием являются биологические, токсикологические, фармакологические и другие исследования лекарственных средств с применением научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственных средств [7]. Архивирование данных, полученных в ходе доклинических исследований, является важным аспектом соответствия испытательного центра Принципам надлежащей лабораторной практики (GLP) организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР).

Первичные данные и пробы, полученные в ходе исследования, могут быть использованы для его реконструкции, что позволит проверить информацию, включенную в заключительный отчет, а также подтвердить соответствие конкретного исследования Принципам GLP.

Для хранения материалов и проб разработчик лекарственного средства вправе пользоваться услугами организаций, специализирующихся по архивированию и хранению. Однако, в РФ такое хранение данных практикуется крайне редко, поэтому все материалы и пробы хранятся в испытательном центре, проводящем доклиническое исследование.

В связи с этим администрация испытательного центра должна обеспечить должное архивирование записей и материалов, формируемых в ходе проведения

доклинических исследований, а также документации, необходимой для демонстрации инспекторам на соответствие испытательного центра Принципам GLP [1].

Принципы архивирования

Архив испытательного центра обеспечивает материально-техническое хранение записей и материалов доклинических исследований в соответствии с «Основными правилами работы ведомственных архивов» от 1986 г. и «Основными правилами работы архивов организаций» от 2002 г. [2].

Архивирование материалов доклинического исследования в испытательном центре должно сводиться к выполнению следующих основных задач:

1. Комплектование архива материалами доклинических исследований.
2. Обеспечение сохранности и режима хранения материалов.
3. Создание аппарата учета архивных материалов.
4. Создание условий, обеспечивающих оперативное использование документов архива.

Эти задачи могут подразделяться на ряд функций, которые должны быть отражены в Положении об архиве, утвержденном руководителем испытательного центра. В данном Положении также должен быть зафиксирован статус архива, его место в структуре испытательного центра, наименование должности работника, ответственного за архивирование.

Архив испытательного центра в соответствии с положением о нем комплектуется материалами постоянного и временного хранения. В целях качественного

комплектования документами сотрудники архива контролируют и оказывают необходимую методическую и практическую помощь службе документационного обеспечения испытательного центра в составлении номенклатуры дел (систематизированного перечня наименований дел, заводимых в делопроизводстве организации, с указанием сроков их хранения, по установленной форме). Ответственность за ее составление возлагается на службу документационного обеспечения испытательного центра [2].

В номенклатуре дел закрепляются сроки хранения материалов постоянного и временного хранения. При этом сроки хранения определяются в соответствии со следующими нормативными документами:

- Приказ Министерства культуры РФ от 25 августа 2010 г. № 558 «Об утверждении «Перечня типовых управленческих архивных документов, образующихся в процессе деятельности государственных органов, органов местного самоуправления и организаций, с указанием сроков хранения» [4];

- Перечень типовых архивных документов, образующихся в научно-технической и производственной деятельности организаций, с указанием сроков хранения (в редакции Приказа Министерства культуры РФ от 28 апреля 2011 г. № 412) [3].

Персонал архива обязан обеспечивать сохранность и конфиденциальность сведений, содержащихся в документах. Он также несет ответственность за правильное заполнение соответствующих журналов и электронной картотеки. Компоненты, обеспечивающие хранение уникальных электронных записей должны быть дублированы и физически защищены от несанкционированного доступа.

В своей работе сотрудники архива должны руководствоваться должностной инструкцией, утвержденной руководите-

лем испытательного центра, в которой оговариваются основные обязанности и подчинение. Персонал архива должен выполнять все операции и процедуры по архивированию в соответствии с установленными в испытательном центре стандартными операционными процедурами (СОПами) и Принципами GLP.

К сожалению, в настоящее время в испытательных центрах РФ, как правило, отсутствуют специально выделенные архивные помещения. Зачастую материалы и пробы хранятся в стенах лабораторий, проводящих исследование, что является грубейшим нарушением и претит Принципам GLP. Также администрация испытательного центра сталкивается с задачей, когда выделить отдельное здание под архив в уже сформированном и действующем испытательном центре практически невозможно. Этот вопрос остро стоит во многих испытательных и научно-исследовательских центрах.

Решением данной проблемы может служить формирование архива в помещениях административного корпуса. При этом стоит учесть, что архивное помещение должно быть организовано в соответствии с Приказом Министерства Культуры РФ от 12 января 2009 г. №3 «Об утверждении Специальных правил пожарной безопасности государственных и муниципальных архивов Российской Федерации»[5] и защищено от несанкционированного доступа. Для этого в архивохранилище необходимо установить современные системы обнаружения дыма. Администрация может также рассмотреть возможность установки автоматизированной системы пожаротушения, минимизирующей риск повреждения. Доступ в помещения архива должен контролироваться и быть ограниченным. Для этого приказом руководителя испытательного центра определяется список лиц, имеющих доступ в архивохранилище.

Для некоторых проб и материалов

могут потребоваться особые условия хранения. К ним могут относиться материалы, требующие хранения в замороженном, охлажденном или высохшем виде или в среде, свободной от пыли и магнитных помех. Для этого необходимо выделить отдельное помещение, в котором будут поддержаны соответствующие условия хранения.

На базе ФГБУН ИТ ФМБА России разработана система архивации материалов доклинических исследований. Согласно этой процедуре, основными обязанностями персонала архива можно выделить следующие:

1. комплектование архива документами, состав которых предусмотрен положением об архиве;
2. прием от структурных подразделений испытательного центра архивных дел, сформированных согласно номенклатуре;
- 3.- учет и обеспечение сохранности документов;
4. создание и поддержание научно-справочного аппарата к документам архива;
5. организация использования хранящихся в архиве документов по запросам структурных подразделений испытательного центра, учет и анализ использования таковых;
6. участие в проведении экспертизы ценности документов, а также обеспечение комплекса организационных и методических мероприятий по передаче документов на постоянное хранение;
7. оказание методической и практической помощи структурным подразделениям испытательного центра по вопросам работы с документами;
8. участие в разработке нормативных и методических документов по архивному делу и документационному обеспечению управления внутри испытательного центра.

Передача записей и материалов доклинических исследований в архив осуществ-

ляется в течение 1 месяца после согласования с руководителем исследования и утверждения руководителем испытательного центра. При этом обязательно составляется и утверждается акт о передаче документов. Данные акты хранятся в архиве в течение всего срока хранения материалов об исследовании.

Прием материалов и записей персоналом архива ФГБУН ИТ ФМБА России осуществляется только в присутствии сотрудника испытательного центра, осуществляющего передачу. В журнале приема-передачи и электронной картотеке архивариус регистрирует информацию о материалах, передаваемых ему на хранение с указанием следующих позиций:

1. дата передачи;
2. код доклинического исследования;
3. данные о спонсоре;
4. наименование лекарственного средства;
5. документ о назначении руководителя исследования и со-исследователей;
6. протокол доклинического исследования;
7. заключение биоэтической комиссии;
8. сертификат анализа;
9. акт приема-передачи материалов для исследования;
10. карточка учета расходования вещества;
11. первичные данные;
12. финальный отчет, утвержденный руководителем испытательного центра;
13. заключения отдела обеспечения качества;
14. информация о лице, передаваемом документах на хранение;
15. информация о лице, принявшем документы на хранение;
16. присвоенный архивный номер.

После проведения процедуры передачи документов архивариус определяет их местоположение. Например, материалы можно поместить в папки или конверты с указанием присвоенного архивного номе-

ра и кода доклинического исследования, что облегчает дальнейший поиск. В каждую папку/конверт с материалами доклинического исследования вкладывается опись с указанием количества страниц по каждой позиции. Далее материалы исследования помещаются в огнеупорные шкафы, на которых для удобства поиска также отмечается учетный период (например, 2013-2014 гг. или 05.2013-12.2013 г. и т.д.).

Архив испытательного центра может осуществлять прием электронных документов (ЭД), обеспечивая их сохранность, учет, отбор и использование, а также подготовку и передачу на государственное хранение. При этом все операции, осуществляемые с ЭД при передаче на архивное хранение и в процессе хранения (перезапись, конвертирование в новые форматы, сжатие и др.), должны быть документированы для обеспечения аутентичности ЭД [6].

Выдача материалов и записей доклинических исследований может проводиться после оформления заявки, оформленной в надлежащем порядке. Заявки хранятся в архиве в течение 3 лет. Архивариус регистрирует выдачу архивных документов в соответствующем журнале с обязательным указанием реквизитов, лица, выдавшего и принявшего материалы, а также предполагаемую и фактическую даты их возврата. Выданные материалы доклинических исследований должны быть возвращены в архив не позднее, чем через 1 месяц.

В помещениях архива обеспечено наличие стабилизатора напряжения и источник бесперебойного питания для защиты электронной картотеки от возможных скачков напряжения.

Архивохранилище ФГБУН ИТ ФМБА России находится в помещении с минимальным риском проникновения грызунов и насекомых-вредителей. Принимаются меры по борьбе с вредителями

(установка ловушек, проведение дезинсекции и дератизации).

В помещении архивохранилища предусмотрена приточно-вытяжная вентиляция. Система кондиционирования воздуха должна поддерживать стабильный температурно-влажностный режим, производить очистку воздуха от пыли и агрессивных примесей, отвечать современным требованиям компактности и экономичности. Для контроля температуры и влажности в архивохранилище должны быть установлены термометр и гигрометр, параметры которых учитываются в журнале.

Так, в помещении для хранения проб и образцов предусмотрено наличие холодильной и морозильной установок, а также полок с ящиками для хранения блоков с гистологическими срезами, засушенных препаратов и др. образцов тестируемых объектов. Холодильные и морозильные установки быть оснащены термометрами, данные которых регистрируются дважды в день в специальном журнале. В таком помещении также необходимо наличие резервного электропитания на случай аварийного отключения электричества. Необходимость особых условий хранения должна быть прописана в соответствующих СОПах.

Уничтожение записей и материалов доклинических исследований, хранящихся в архиве ФГБУН ИТ ФМБА России, может осуществляться по следующим причинам:

- окончание срока хранения;
- утрата научно-практической ценности;
- прекращение существования разработчика лекарственного средства;
- прекращение существования испытательного центра.

Для обеспечения процесса уничтожения архивных документов приказом руководителя испытательного центра создается экспертная комиссия, состоящая как

минимум из трех человек. В обязательном порядке в состав комиссии входит лицо, ответственное за архив. Задачей данной комиссии является экспертиза ценности архивных документов на предмет соответствия срока хранения документов их фактическому нахождению в архиве [2]. После выделения материалов, подлежащих уничтожению, составляется акт об утилизации данных, который подписывается всеми членами экспертной комиссии и утверждается руководителем испытательного центра. Утвержденные акты об утилизации хранятся в архиве.

В случае прекращения существования разработчика лекарственного средства документация, находящаяся на хранении в архиве испытательного центра, подлежит хранению в течение всего срока и последующему уничтожению в соответствующем порядке. Однако если это предварительно согласовано в договоре, материалы и записи доклинических исследований могут быть утилизированы по требованию спонсора. В случае прекращения деятельности испытательного центра документация, находящаяся на хранении в его архиве, подлежит передаче разработчику лекарственного средства, либо уничтожению по согласованию со Спонсором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Так как архивирование данных, полученных в ходе доклинических исследований, является важным аспектом соответствия испытательного центра Принципам надлежащей лабораторной практики (GLP) организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), администрация испытательного центра должна изыскать возможность для организации архива доклинических исследований.

Предлагаемая процедура архивирования материалов и проб доклинических исследований может явиться основой для разработки и внедрения данного процесса в российских научно-испытательных и

исследовательских центрах.

Archiving of material pre-clinical studies as part of the quality system.

M.A. Zaitseva, A.V. Belostotsky, L.V. Pikalova, S.D. Marchenko.

ABSTRACT

Archiving of data from clinical trials, is an important aspect of compliance testing center with the Principles of Good Laboratory Practice (GLP) Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Archive test center in accordance with the provisions of its component materials of permanent and temporary storage. On the basis of the IT FGBUN FMBA of Russia developed a system of archiving the materials of pre-clinical studies. Transfer of records and materials to the archive preclinical studies carried out within 1 month after consultation with the leader of the study and approval of the head of the test center. Archivist records information about the materials referred to it deposited with the following items: the date of transfer; Code preclinical studies; data about the sponsor; the name of the drug; a document on the appointment of the head of research and co-researchers; Protocol preclinical studies; Finally bioethical commission; analysis certificate; an act of acceptance and transfer of materials for the study; Card spending accounting substance; primary data; the final report, approved by the head of the test center; conclusion of Quality Assurance; Information about the person who transmitted the documents for storage; Information about the person who accepted the documents for storage; assigned to the archive room. Inside the archives should be provided for input and output ventilation, air-conditioning system, a stable temperature and humidity conditions, the presence of a voltage stabilizer and UPS. The storage of samples required is the presence of refrigeration and freezer units, as well as shelves with drawers for storing blocks of histological sections and others. Samples of test objects. The term archival

storage of material pre-clinical studies is 15 years. Issuance of records of materials and pre-clinical studies can be carried out after the registration of the application, drawn up in a proper manner. Issued preclinical studies materials should be returned to the archive no later than 1 month. Destruction of records and materials of pre-clinical studies that are stored in the archives, held by a decision of the expert committee. In the case of the demise of the drug developer documentation stored at the archive of the test center, to be stored during the whole period and the subsequent destruction in an appropriate manner. In the event of termination of the test center records in storage in his archive, transferable drug developer or destruction by agreement with the sponsor. Proposed procedure for archiving materials and samples of pre-clinical studies can be the basis for the development and implementation of this process in the Russian scientific testing and research centers.

Key words: quality, pre-clinical studies, archival materials.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 31890-2012 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Организация и управление исследованиями, проводимыми на нескольких испытательных площадках. 2013 – 28 с.

2. Основные правила работы архивов организаций. М.: Росархив, ВНИИДАД, 2002. – 152 с.

3. Перечень типовых архивных документов, образующихся в научно-технической и производственной деятельности организаций, с указанием сроков хранения (в редакции Приказа Министерства культуры РФ от 28 апреля 2011 г. № 412) // Российская газета. – 2011. – 21 мая.

4. Приказ Министерства культуры РФ от 25 августа 2010 г. № 558 «Об утверждении «Перечня типовых управленческих архивных документов, образующихся в процессе деятельности государственных органов, органов местного самоуправления и организаций, с указанием сроков хранения».

5. Приказ Министерства Культуры РФ от 12 января 2009 г. №3 “Об утверждении специальных правил пожарной безопасности государственных и муниципальных архивов Российской Федерации”.

6. Федеральный закон Российской Федерации от 29 декабря 1994 г. № 77-ФЗ (ред. от 05 мая 2014 г) «Об обязательном экземпляре документов».

7. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» // Российская газета. – 2010. – 14 апр.

УДК 619:615.33:637.07

ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, МЕЧЕННЫХ ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА МЕТОДОМ ИФА

Вылегжанина Е. С. - к.б.н., вед. научный сотрудник отдела безопасности кормов и кормовых добавок, Нестеренко И.С. - к.х.н., зам. зав. отделом безопасности кормов и кормовых добавок, Филиппова К.М. - научный сотрудник отдела безопасности кормов и кормовых добавок, Добрякова Ю.В. - к.б.н., с.н.с. отдела безопасности кормов и кормовых добавок, Комаров А. А. - д.б.н., профессор, зав. отделением фармакологических лекарственных средств, безопасности пищевой продукции и кормов

Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва

РЕФЕРАТ

Тетрациклины – антибиотики, которые широко применяются, применяются в ветеринарии не только для лечения, но также для стимуляции роста животных. Неограниченное применение может приводить к накоплению остаточного содержания тетрациклинов в органах и тканях животных, молоке, яйцах, меде, что крайне нежелательно для потребителей. В настоящее время в ряде стран установлены максимально допустимые уровни остаточного содержания тетрациклинов в продукции животноводства. В Российской Федерации наличие остаточных количеств тетрациклинов в продуктах питания животного происхождения допускается на уровне 10 мкг кг^{-1} , а в странах Европейского союза 100 мкг кг^{-1} . Поэтому существует необходимость в разработке чувствительных методик определения остаточных количеств АТР в продукции животноводства. В данной была разработана методика непрямого твердофазного ИФА для определения тетрациклина и хлортетрациклина. Для получения иммуногенов были синтезированы конъюгаты хлортетрациклина, тетрациклина и окситетрациклина с бычьим сывороточным альбумином. Поликлональные специфические антисыворотки были получены путем иммунизации кроликов. Вторичные диагностические антитела против иммуноглобулинов кролика, специфичных к тетрациклину, хлортетрациклину и окситетрациклину были получены иммунизацией барана. На основе выделенных IgG барана был синтезирован конъюгат с пероксидазой хрена. Предел обнаружения методики составил $0,3 \text{ мкг л}^{-1}$.

Ключевые слова: антибиотики тетрациклинового ряда, иммуноферментный анализ, ферментный конъюгат.

Список сокращений: АТ – антитела, Тв-АГ – твердофазный антиген, Ig – иммуноглобулины, ФК – антикроличий пероксидазный конъюгат, АТР – антибиотики тетрациклинового ряда, Т – тетрациклин, ХТ – хлортетрациклин, ОТ – окситетрациклин, ИФА – иммуноферментный анализ, ОП – оптическая плотность, ИС – ингибирование связывания, ПР – перекрестная реактивность.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики тетрациклинового ряда (АТР) (тетрациклин, хлортетрациклин, окситетрациклин) (Т, ХТ и ОТ) обладают широким спектром антимикробного действия, применяются в ветеринарии не только для лечения, но также для стимуляции роста животных. АТР обладают рядом отрицательных эффектов, таких как гепатотоксичность, эмбриотропность, тяжелые расстройства желудочно-кишечного тракта, аллергические реакции, суперинфекции, угнетение иммунитета, нарушение витаминного обмена в организме и др. [4]. Постоянное попадание даже малых доз АТР в организм приводит к появлению резистентной микрофлоры, в результате чего лечение ряда инфекционных заболеваний человека и животных становится неэффективным

[11]. Неограниченное применение может приводить к накоплению остаточного содержания АТР в органах и тканях животных, молоке, яйцах, меде [6, 7], что крайне нежелательно для потребителей. Отказаться от применения АТР пока невозможно из-за их эффективного терапевтического и профилактического действия, поэтому в ряде стран законодательно установлены максимально допустимые уровни содержания АТР в продукции животноводства. В Российской Федерации и в странах ЕС наличие остаточных количеств АТР в продуктах питания животного происхождения допускается на уровне 10 и 100 мкг кг^{-1} соответственно [2, 10].

К настоящему времени разработаны разнообразные физико-химические методы определения АТР в продуктах пита-

ния, например, такие как ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС-МС, которые незаменимы для идентификационных целей, но дороги в обслуживании и поэтому непригодны для массовых анализов продуктов питания и пищевого сырья. Методы на основе ИФА являются более дешёвыми, относительно простыми и быстрыми и поэтому часто используются для этой цели в сочетании с хроматографическими методами [6, 7, 8].

Целью настоящей работы было получение диагностических антикроличьих антител барана, использование которых позволило с достаточной чувствительностью определять остаточные количества АТР методом ИФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы пероксидаза хрена (ПХ), бычий сывороточный альбумин (БСА), биохимические и химические реагенты фирм "Sigma" (США) и "Merck" (Германия), кислоты и неорганические соли марки о.с.ч. (Химмед, Россия). Использовали следующие буферные растворы: Р1 – карбонат-бикарбонатный буфер 10 мМ рН 9,5; РБ – рабочий реакционный буфер трис-НСl 5 мМ с 1% БСА рН 7,0; РБ-МеОН – рабочий реакционный буфер трис-НСl 5 мМ с добавлением 20% метанола; РБ-тв – рабочий реакционный буфер трис-НСl 5 мМ с добавлением 0,5% твина-20; ФБ – фосфатный буфер 0,2 М, рН8,0; ФСБ – фосфатно солевой буфер 0,1 М с добавлением 0,14 М NaCl рН 7,0; раствор ацетата натрия 3 М; ацетатный буфер 0,001М (рН 4,4); ТМБ – субстратный буферный раствор рН4,8, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и перекись водорода в цитратном буфере; насыщенный раствор Na₂CO₃. Все растворы готовили с использованием деионизованной воды Milli-Q (Millipore, Франция).

Стандартные растворы Т, ХТ, ОТ и эпи-Т с концентрацией 1 мг мл⁻¹ готовили в метаноле и хранили при минус 20 °С.

В работе использовали полистироло-

вые 96-луночные планшеты фирмы "Grainer" (США). Измерение оптической плотности продукта ферментативной реакции проводили на вертикальном спектрофотометре Sunrais для 96-луночных планшетов (Tescan AG, Швейцария).

Синтез конъюгатов АТР с белком. Конъюгаты Т, ХТ и ОТ с БСА (БСА-Т, БСА-ХТ и БСА-ОТ) синтезировали по методу, описанному в литературе [2, 3, 9]. Смешивали раствор БСА с растворами ОТ, Т, или ХТ в воде в разных молярных соотношениях (от 1:47 до 1:127, М/М). Добавляли 3 мл 3М ацетата натрия и 2 мл 7,5% раствора формальдегида. рН смеси доводили до 7,0-8,0 насыщенным раствором Na₂CO₃. Полученную смесь инкубировали 1-2 ч на магнитной мешалке при комнатной температуре, после чего диализовали против 0,2% раствора NaCl в течение 3 суток с 6 сменами раствора NaCl. В конъюгатах определяли белок СФ-методом. Хранили в 50% глицерине при минус 20 °С.

Получение кроличьих поликлональных антисывороток. Специфические поликлональные сыворотки получали внутривенной иммунизацией кроликов породы «Шиншилла» с массой тела 2 кг растворами БСА-Т, БСА-ХТ и БСА-ОТ. Первую иммунизацию проводили смесью АГ с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ). Повторные иммунизации АГ проводились с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ) с интервалами в 4 недели, снижая дозу вводимого АГ от 100 до 20 мкг на кролика. Сыворотки отбирали через 7–10 дней после каждой иммунизации. Хранили при минус 20 °С.

Выделение иммуноглобулиновой фракции из специфической кроличьей антисыворотки. Иммуноглобулиновые фракции из кроличьих сывороток крови, полученных на введение БСА-Т, БСА-ХТ и БСА-ОТ, выделяли 3-х стадийным высаливанием сульфатом аммония по методу, описанному в литературе [5]. Осадок,

полученный после 3-х кратного добавления насыщенного раствора сульфата аммония, растворяли в ФБ. Раствор иммуноглобулинов (Σ Ig) диализовали ночь против ФСБ.

Получение антивидовых антител барана против IgG кролика. Иммуноглобулиновые фракции (Σ Ig) сывороток крови кроликов, полученных на введение БСА-Т, БСА-ХТ и БСА-ОТ, объединяли. Объединенную фракцию или цельные сыворотки вводили барану с интервалами в 4-6 недель. Первую иммунизацию проводили с ПАФ, повторные – с НАФ. Сыворотки отбирали через 14 дней после каждой иммунизации. Схема иммунизации представлена в таблице 1.

Получение фракции IgG из сыворотки крови барана. Гипериммунную сыворотку крови барана обрабатывали, как описано выше. Осадок, содержащий иммуноглобулины (Σ Ig), растворяли в ФБ. Раствор диализовали ночь против ФСБ.

К диализованному раствору Σ Ig добавляли ПЭГ-6000 до 6% (вес объем⁻¹) при перемешивании до полного растворения. Инкубировали 20 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин⁻¹. Осадок (IgM) отбрасывали. К надосадочной жидкости добавляли ПЭГ-6000 до 12% (вес объем⁻¹). Перемешивали, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и центрифугировали выпавший осадок 15 мин при 6000 об/мин⁻¹. Супернатант удаляли. Осадок IgG отбирали и растворяли в 1,0 мл Р1. В растворе IgG определяли содержание белка спектрофотометрическим методом.

Определение содержания белка спектрофотометрическим методом [5]. Раствор IgG разводили буфером Р1 в 10 раз. Поглощение (ОП) измеряли на спектрофотометре Cary (Varian, США) при λ 280 нм против раствора Р1. Содержание белка в пробе (X , мг мл⁻¹) рассчитывали

по формуле 1:

$$X = \text{ОП}_{\text{ср}} * 10 / 1,35 \quad (1)$$

где: ОП_{ср} – средняя оптическая плотность раствора, рассчитанная по трем определениям; 10 – коэффициент разведения; 1,35 – множитель, соответствующий отношению оптических плотностей ОП₂₈₀/ОП₂₆₀

Получение IgG барана, меченных пероксидазой хрена (ФК). Готовили следующие растворы. Раствор 1: раствор ПХ с концентрацией 4 мг мл⁻¹. Раствор 2: раствор периодата натрия с молярной концентрацией 100 мМ. Раствор 3: смешали 200 мкл раствора 2 и 1 мл раствора 1, оставили на 20 мин при комнатной температуре и диализовали ночь при 4 °С против ацетатного буфера. Раствор 4: 1 мл диализованного раствора 3 смешали с 0,4 мл раствора IgG и 0,2 мл насыщенного раствора Na₂CO₃. Перемешивали 2 ч при комнатной температуре на магнитной мешалке. 0,3 мл раствора NaBH₄ с концентрацией 4 мг мл⁻¹ добавили к раствору 4. Перемешивали 2 ч во льду на магнитной мешалке, после чего смесь диализовали ночь при 4 °С против ФСБ. Полученный ФК смешивали с глицерином в соотношении 1:1 (об об⁻¹) и хранили при минус 20°С.

Проведение ИФА

Активность ФК и титры специфических сывороток устанавливали в непрямом твердофазном конкурентном ИФА (НТК ИФА). Иммунологический планшет сенсibilизировали Тв-АГ (БСА-ХТ). Для этого в каждую лунку добавляли 0,15 мл раствора Тв-АГ с содержанием белка 0,5 мкг мл⁻¹ в трис-НСI буфере. Инкубировали 2,5 ч при 37 °С. Затем раствор из лунок удаляли, лунки промывали ФСБ 4 раза. Для определения рабочего разведения сывороток их титровали с двойным шагом разведения в РБ-тв в лунках планшета. Добавляли по 0,075 мл РБ-Ме и инкубировали 1 ч при 37 °С. Содержимое лунок удаляли стряхиванием. Отмывали 4

р. ФСБ. Вносили по 0,15 мл двойных разведений раствора ФК в РБ-Ме и инкубировали 1 ч при 37 °С. Содержимое лунок удаляли стряхиванием. Отмывали 4 р. ФСБ. Вносили в лунки по 0,1 мл ТМБ, инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре, останавливали реакцию раствором 0,5 М H₂SO₄ и измеряли ОП при λ 450 нм. За рабочее принимали то разведение сыворотки и ФК, при котором ОП₄₅₀ конечного продукта реакции была ≥0,8.

В случае определения специфичности сывороток сравнивали интенсивность окраски (ОП₄₅₀) контрольных (К) и опытных (О) лунок в дублях. В опытные лунки вносили 0,075 мл растворов АТР с известным содержанием Т, ХТ, ОТ или эпи-Т в РБ-МеОН, в контрольные – 0,075 мл РБ-МеОН и во все лунки добавляли 0,075 мл рабочего разведения специфических АТ в РБ-тв. Инкубировали 1 ч при 37 °С и отмывали 4 раза ФСБ. После чего добавляли 0,15 мл ФК в рабочем разведении в РБ-тв. Инкубировали 1 ч при 37 °С и отмывали. Вносили 0,1 мл раствора ТМБ, инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 0,5 М серной кислоты. Значения ОП измеряли при длине волны 450 нм. Рассчитывали процент ингибирования связывания (ИС) специфических АТ с АГ как отношение средних значений ОП₄₅₀ опытных и контрольных лунок по формуле 1:

$$\text{ИС} (\%) = (\text{ОП}_0 / \text{ОП}_К) \times 100, \text{ где}$$

ОП₀ – средняя оптическая плотность в лунках дублях с раствором АГ; ОП_К – средняя оптическая плотность в лунках дублях с раствором буфера.

Строили градуировочные графики зависимости ИС от концентрации АТР. Для этого на ось абсцисс наносили значения десятичных логарифмов концентрации антибиотика (Т, ХТ, ОТ или эпи-Т) в калибровочных растворах, а по оси ординат откладывали значения ИС, получен-

ные для этих концентраций в ИФА.

Специфичность и чувствительность сывороток характеризовали, сравнивая концентрации АГ (мкг мл⁻¹) в растворе, обеспечивающие 50% ингибирование связывания АТ.

Перекрестную реактивность (ПР) выражали как процент перекрестного связывания специфических АТ с гетерологичными растворенными АГ относительно гомологичного, определенные в НТК ИФА. Для этого по градуировочным кривым определяли количество каждого вещества в точке 50 % связывания ([C_{50%}]). Количество гомологичного АГ в этой точке принимали за 100% и вычисляли процент для перекрестно реагирующих соединений по формуле 2:

$\text{ПР} (\%) = (\text{C}_{50\% \text{Т, ОТ, эпи-Т}} / \text{C}_{50\% \text{ХТ}}) \times 100$, где: C_{50%ХТ} – концентрация гомологичного АГ и C_{50%Т, ОТ, эпи-Т} – концентрации перекрестно реагирующих веществ (мкг л⁻¹), обеспечивающие 50% связывание АТ.

Предел обнаружения метода рассчитывали как среднее значение оптической плотности раствора, не содержащего АТР, минус 3 стандартных отклонения (n=20). После чего определяли ИС по формуле 1 и находили соответствие этого показателя содержанию АТР по калибровочным графикам (рис.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе была выбрана непрямая схема твердофазного конкурентного ИФА. Ранее для определения АТР в молоке нами была предложена тест-система «ТЕТРАЦИКЛИНЫ – ИФА М» (производитель ЗАО «НВО Иммуно-тех», г. Москва), в которой применялись полученные нами иммунореагенты: Тв-АГ (конъюгаты АТР с БСА) и специфические кроличьи АТ, а также АТ диагностические барана против IgG кролика, меченные пероксидазой хрена (производства МедГамал г. Москва) (ФК). Чувствительность определения Т и ХТ в растворе с помощью предложенной тест-системы

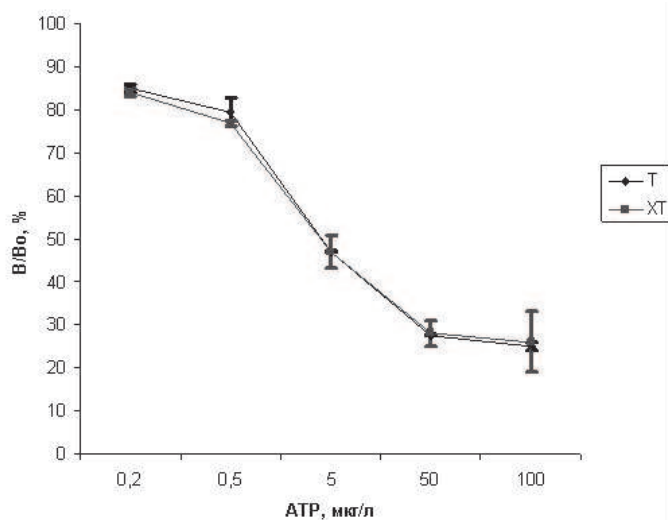


Рис. 1. Градуировочные графики Т и ХТ, полученные в ИФА с использованием ФК 08

лежала в диапазоне от 0,5 до 100 мкг л⁻¹.

В настоящее время фирма МедГамал прекратила производство ФК, а чувствительность определения ХТ с использованием диагностических антител другого производителя (Absam, Великобритания) резко снизилась. Нами были получены антитела диагностические барана против Ig кролика, меченые ПХ, обеспечивающие чувствительное определение остаточных количеств Т и ХТ методом ИФА.

Ранее было описано получение поликлональных кроличьих антисывороток, специфичных к АТР, с использованием конъюгатов ХТ, Т и ОТ с БСА (1). В настоящей работе эти сыворотки и фракции Ig, выделенные из них, были использованы в качестве иммуногенов для получения IgG барана, меченных пероксидазой хрена (ФК). Кроличьи антисыворотки или выделенные из них иммуноглобулиновые фракции вводили барану с ПАФ и НАФ в течение 8 циклов иммунизаций, с интервалом между иммунизациями в 4-6 недель (табл.1). Сыворотки отбирали через 2 недели после каждой иммунизации. Из сывороток выделяли фракцию IgG и конъюгировали с ПХ. Полученные ФК использовали в ИФА

В ходе работы были подобраны оптимальные соотношения концентраций иммобилизованного на твердой фазе антигена (БСА-ХТ), рабочие разведения АТ и ФК.

Чувствительность определения Т и ХТ в РБ-МеОН в ИФА менялась в зависимо-

Таблица 1

Схема получения гипериммунных сывороток барана

| Иммунизация, № п/п | Иммуноген | Адьювант | АТ барана, сер. |
|--------------------|---|----------|-----------------|
| 1 | ΣIg из сывороток крови кроликов, иммунизированных БСА-ХТ | ПАФ | 01 |
| 2 | | НАФ | 02 |
| 3 | | НАФ | 03 |
| 4 | | НАФ | 04 |
| 5 | | НАФ | 05 |
| 6 | | НАФ | 06 |
| 7 | сыворотка крови кролика, иммунизированного БСА-ХТ | НАФ | 07 |
| 8 | объединенная фракция иммуноглобулинов из сывороток крови кроликов, иммунизированных БСА-ХТ, БСА-Т, БСА-ОТ | НАФ | 08 |

Таблица 2

Характеристика синтезированных ФК

| ФК | разведение | АТ, разведение | IC ₅₀ , мкг/л | |
|----|------------|----------------|--------------------------|-----|
| | | | Т | ХТ |
| 06 | 400 | 100 | 200 | 20 |
| 07 | 1600 | 300 | 20 | 5 |
| 08 | 200 | 300 | 3,9 | 3,7 |

Таблица 3

Сравнение перекрестной реактивности ИФА при использовании разных ФК

| ФК | Перекрестная реактивность, % | | | |
|----|------------------------------|-----|------------|-------|
| | ХТ | Т | ОТ | эпи-Т |
| 08 | 105 | 100 | 0,3 | 20 |
| ав | 22,7 | 100 | менее 0,01 | 15,5 |

сти от сроков иммунизации барана и специфичности иммуногена. ФК О1 – О6 были получены путем введения Ig кролика, выделенных из сывороток, специфичных к БСА-ХТ. С помощью этих ФК в ИФА определялся ХТ на уровне 100-1000 мкг/мл. После того, как очередную (седьмую) иммунизацию барана провели суммарной сывороткой крови, полученной от трех кроликов, иммунизированных БСА-ХТ, БСА-Т и БСА-ОТ, был синтезирован ФК О7, с помощью которого чувствительность определения Т и ХТ повысилась (диапазон определения Т и ХТ снизился до 10-100 мкг л⁻¹). Следующую, 8-ю иммунизацию барана, провели смесью кроличьих иммуноглобулинов, выделенных из сывороток крови кроликов, иммунизированных БСА-ХТ, БСА-Т и БСА-ОТ. Использование ФК О8 в ИФА позволило повысить чувствительность определения Т и ХТ до 0,2 мкг л⁻¹.

Таким образом, были получены диагностические антитела барана против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой хрена, с помощью которых с достаточной чувствительностью определяли остаточные содержания АТР в растворе. Наибольшей чувствительностью обладал ФК, полученный после 8-ми циклов иммунизации барана (табл.2).

Типичные градуировочные графики Т

и ХТ, полученные в ИФА с помощью ФК О8, представлены на рис. 1 (кривые 1 и 2). Пределы обнаружения Т и ХТ в буферном растворе составили 0,3 мкг л⁻¹. Линейные диапазоны концентраций Т и ХТ, определенные как область 20-80% связывания АТ, практически совпали и колебались в промежутке от 0,5 до 12,0 мкг л⁻¹. Разработанный метод характеризовался хорошей точностью и воспроизводимостью результатов анализа. Коэффициенты вариации для буферных растворов, содержащих 0,5, 5 и 15,0 мкг л⁻¹ Т и ХТ, составили от 2,0 до 5,0% в течение одного дня (N=8, P=0,95) и от 12 до 18% между днями (N=3, P=0,95), соответственно.

Перекрестную реактивность ФК О8 сравнили в ИФА с реактивностью ФК ав (Abscam, Великобритания). Полученные результаты представлены в таблице 3. Было показано, что хотя активность ФК ав (Abscam, Великобритания) была выше (титр ФК ав составил 15 000), но чувствительность определения ХТ, по сравнению с ФК О8, снижалась более чем в 5 раз.

Таким образом, получен антивидовой антикроличий пероксидазный конъюгат, обеспечивающий чувствительное определение тетрациклина и хлортетрациклина методом ИФА. Предел определения для обоих антибиотиков составил 0,3 мкг л⁻¹.

Production of peroxidase conjugate for

the determination of tetracyclines by enzyme-linked immunosorbent assay.

E.S. Vylegzhanina, I.S. Nesterenko, K.M. Filippova, J.V. Dobryakova, A.A. Komarov.

The All-Russian State Centre for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, 123022 Moscow, Russia, Zvenigorodskoe shosse, 5

Tetracyclines are the most commonly used antibiotics for the treatment of bacterial infection. The use of these antibiotics in animal healthcare has raised concerns as the presence of residues in food may lead to increase microbial resistance. To protect consumers, many countries have set acceptable tolerance levels for these drugs. The maximum residue level (MRL) established by European Union for tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC) is 100 µg kg⁻¹. In Russia the MRL for these compounds is 10 µg kg⁻¹. Therefore, it is necessary to develop a suitable analytical technique with specificity, sensitivity and simplicity.

In this study, indirect ELISA technique was developed for the detection of TC and CTC. To get immunogens there have been synthesized conjugates of TC, CTC and OTC with bovine serum albumin (BSA). Polyclonal specific rabbit sera have been received by immunization of rabbits. Secondary diagnostic antibodies was obtained by immunization of sheep with anti-CTC, anti-OTC and anti-TC antibodies. The new enzyme conjugate with secondary diagnostic antibodies was obtained. The limit of detection of TC and CTC was 0,3 µg kg⁻¹.

Key words: tetracyclines, ELISA, enzyme conjugate

ЛИТЕРАТУРА

1. Вылегжанина Е.С., Пономарева Е.А., Комаров А.А., Панин А.Н. Получение иммунореагентов для определения антибиотиков тетрациклиновой группы методом ИФА // Ветеринарная практика. - 2007. -С. 46 - 49.

2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078-01. -2002.- М.: Минздрав России.

3. Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Панин А.Н. Конъюгат окситетрациклина с бычьим сывороточным альбумином для иммунохимического способа определения окситетрациклина. Патент РФ 2243235, приоритет от 06.07.2003. Бюл. №36, 27.12.2004.

4. Харкевич Д.А. Фармакология. - М.: ГЭОТАР-МЕД. -2003. -726с.

5. Справочник биохимика: Пер. с англ./ Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. - М. Мир. -1991. -544 с.

6. AOAC Official Methods of Analysis. Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in Edible Animal Tissues. Liquid Chromatographic Method, Drugs and Feed Additives in Animal Tissues. -2000. -Ch.2. - P. 20.

7. Croubels S., Van Peteghem C. Sensitive spectrofluorimetric determination of tetracycline residues in bovine milk // Analyst. - 1994. -№119. -P. 2713.

8. Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Ross G.T. A Method for producing specific antisera with small doses of immunogen // J. Clin. Endocr. -1971. -№33. -P. 988-991.

9. Tsui P.T., Kelly K.A., Ponpipom M.M., Strahilevitz M, Schon A. Δ⁹-Tetrahydrocannabinol-Protein Conjugates // Can. J. Biochem. -1974. -№52. -P. 252-258.

10. 2003/181/EC: Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regard the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin, Official J. Eur. Commun. -2003.- L71(17).

11. <http://www.antibiotic.ru/books/pd/10/shtml#66>

МОДЕЛИРОВАНИЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ У ЖИВОТНЫХ

Шекунова Е.В.^{1,2}, Кашкин В.А.^{1,2}, Макарова М.Н.¹, Макаров В.Г.¹
¹ - Санкт-Петербургский институт фармации; ² – Институт фармакологии им.
А.В.Вальдмана ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова



РЕЗЮМЕ

Моделирование на животных является важным инструментом в изучении злоупотребление алкоголя, и его зависимости, что позволяет использовать методы, которые не могут быть воспроизведены на людях. Экспериментальные модели на животных были разработаны для изучения различных аспектов потребления алкоголя и зависимости, включая, специфическое поведение по поиску и потреблению алкоголя, моделирование повреждения органов, вызванное злоупотреблением алкоголем, изучение толерантности к алкоголю, и физической зависимости от алкоголя. Генетические манипуляции также могут быть использованы при моделировании патологического состояния у животных, и являться особо ценным инструментом в области определения генетических детерминант алкоголизма. В зависимости от целей эксперимента модель развития алкоголизма на животных может обладать внешней или предиктивной валидностью, что в первом случае подразумевает наличие феноменологических свойств между моделью и моделируемым состояние, а во втором, отражает вероятность того, что результаты, полученные при ее использовании, могут быть получены в клинических условиях у человека.

Ключевые слова: алкоголь, этанол, модели зависимости, крысы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Опыты по изучению влияния алкоголя на организм лабораторных животных проводятся с 40-х годов прошлого века. Хорошо известно, что некоторые виды грызунов добровольно употребляют алкоголь в лабораторных условиях, хотя этанол и обладает аверсивным вкусом [1]. Так же известно, что добровольное потребление алкоголя у грызунов и других млекопитающих встречается в дикой природе, когда, употребляя в пищу большое количество гнилых фруктов, они демонстрируют аномальное поведение, которое возникает в результате интоксикации. Эти наблюдения делают возможным использование крыс и мышей в качестве модельных объектов для изучения различных аспектов потребления алкоголя

человеком, в том числе и для изучения подкрепляющего свойства алкоголя. Исследования по изучению злоупотребления этанолом проходят, как правило, в течение нескольких дней или недель. В большинстве этих исследований зависимые показатели получают путем прямой оценки объема потребляемого этанола.

В начале 70-х годов, Дэвид Лестер (*David Lester*) и Эрл Фрид (*Earl Freed*) сформулировали несколько критериев моделирования алкоголизма у животных. Основным критерием является оральное потребление алкоголя без пищевой или водной депривации. Также алкогольная интоксикация должна присутствовать на протяжении длительного периода, сопровождаться формированием синдрома отмены и развитием физической зависимо-

сти. После отмены алкоголя и угасания реакции, связанной с его потреблением (фаза угасания, *extinction*), повторный эпизод интоксикации должен приводить к увеличению потребления алкоголя, так называемому рецидиву (фаза восстановления, "*reinstatement*") [2].

Позже, Heilig и Koob (2007) [3] предложили основные экспериментальные модели на животных, направленные на оценку потребления и поиска алкоголя. Все модели были разделены на 3 основные группы. Первая группа направлена на оценку добровольного или свободного выбора потребления этанола. Вторая состоит из методики выработки оперантной реакции по самовведению этанола (использование оперантных камер). А третья группа оценивает восстановление реакции при предъявлении стимулов, ассоциированных с потреблением алкоголя после угасания (так называемая модель восстановления). Поведение животных в этих моделях может варьироваться от относительно низких до чрезмерно высоких уровней, основанных на генетических особенностях и различных экспериментальных параметрах (например, продолжительности или циркадной синхронизации доступа к алкоголю, концентрация этанола). Было показано, что повышение потребления этанола наблюдается при использовании методик оперантного самовведения [4-7], в моделях алкогольного рецидива [8,9], и при свободном потреблении алкоголя животными [10-12].

Экспериментальные модели свободного потребления алкоголя у животных

Одной из самых известных и простых в воспроизведении методик является модель добровольного потребления алкоголя в двухбутылочном тесте. При выработке данной парадигмы, животным предоставляется свободный доступ к двум бутылкам, одна из которых содержит раствор этанола (обычно 9-10%), а другая содержит воду. Доступ к алкоголю может

быть свободным, т.е. животное имеет свободный доступ к алкоголю в любое время, или ограниченным, например, доступ осуществляется только в определенное время суток. Выработка парадигмы свободного выбора используется в качестве средства оценки общей аддиктивности алкоголя [13]. К недостаткам данного метода можно отнести недостаточную точность измерения потребления [3] и отсутствие каких-либо измерений мотивационного компонента поведения [13].

Также стоит учитывать специфический запах и вкус алкоголя, которые являются аверсивными для грызунов. Поэтому в некоторых случаях необходимо проводить алкогольную акклиматизацию (постепенно увеличивая концентрацию алкоголя), замену вкуса (добавление подсластителей в спиртовой раствор), и/или использование приема пищевой модели, когда после еды увеличивается потребление воды, наблюдаемое у крыс.

Эта модель и ее модификации обладает предиктивной валидностью и может быть полезной для изучения нейрохимических и молекулярных базовых механизмов, которые вовлечены в формирование алкогольной зависимости.

Экспериментальные модели оперантного самовведения алкоголя у животных

При постановке оперантных моделей [14], животное должно выполнить определенную «работу», чтобы получить этанол, например, нажимать на педаль или выглядывать в отверстие оперантной камеры. Такой подход позволяет наблюдать, как много усилий животное будет прилагать для получения этанола и, соответственно, до какой степени этанол действует в качестве подкрепления для животного. Одним из главных преимуществ этого подхода является то, что он дает возможность самостоятельно оценить мотивационный компонент, в отличие от консумматорного (завершающего) компонента поведения при самовведении [13].

Получение алкоголя может быть опосредовано различными путями введения. Помимо орального питья из кюветы или из предоставляемой бутылки, в некоторых случаях этанол вводится в ответ на оперантную реакцию животного с помощью инъекции непосредственно в желудок через имплантируемую трубку (например, внутривенное самовведение), чтобы избежать влияния на вкусовые рецепторы. Таким образом можно гарантировать, что алкоголь, вводимый животным, будет проявлять свои фармакологические свойства. Этанол также может самовводиться животным непосредственно в мозг. Используя эту процедуру, можно определить области мозга, вовлеченные в подкрепляющее действие алкоголя и минимизировать искажающие факторы, такие как обмен веществ [15].

В данной модели: (1) потребление алкоголя поддерживается фармакологической мотивацией, а не факторами, связанными с аппетитом или жаждой, и (2) алкоголь изменяет и поддерживает оперантную реакцию, которая приводит к предоставлению алкоголя животному.

Однако постановка моделей данной группы требует довольно длительного времени, необходимого для обучения животных. Обязательным является наличие специально оборудованных оперантных камер [13].

Экспериментальные модели повторной инициации потребления алкоголя, модель рецидива потребления ("relapse")

Известно, что алкогольная зависимость является хроническим заболеванием с повторяющимися эпизодами неконтролируемого потребления алкоголя с ярко выраженным компульсивным поведением, нацеленным на поиск и потребление алкоголя, которое характеризуется неспособностью остаться в фазе ремиссии [16;17]. И, как следствие, воздержание от употребления алкоголя является важной задачей терапии алкоголизма, но, к сожа-

лению, еще недостаточное понимание всего комплекса факторов, влияющих на риск рецидива, не всегда делает это лечение успешным [18]. В этом плане создание адекватных экспериментальных моделей приближает нас к выявлению базовых нейрофизиологических механизмов, лежащих в основе формирования зависимости.

Согласно исследованиям Le и Shaham (2002) [19], основными моделями изучения алкогольного рецидивирования у крыс являются модель, основанная на депривационном эффекте алкоголя при свободном потреблении, и модель восстановления ранее угашенной реакции на фоне предоставления стимулов, ассоциированных с потреблением этанола ("reinstatement").

При оценке алкогольного депривационного эффекта период свободного доступа к алкоголю сменяется периодами его лишения. Когда доступ к этанолу предоставляется повторно, то наблюдается временное увеличение потребления этанола по сравнению с исходным уровнем [20]. Этот транзиторный всплеск потребления называется алкогольным депривационным эффектом [1;21]. Данный всплеск наблюдается как при свободном потреблении этанола, так и при восстановлении оперантной реакции по потреблению этанола на фоне предоставления стимулов, ассоциированных с этим потреблением [19]. Как показали недавние исследования, у потребляющих высокое количество этанола крыс (ежесуточное потребление этанола около 7 г/кг/день) после 4-х циклов депривации потребление этанола (в первый день после 4-ой депривации) возрастает до 16-18 г/кг/день [22].

Для изучения рецидивов алкогольной зависимости наиболее информативным методом является моделирование угашения с последующим восстановлением специфического поведения животных по поиску алкоголя, которое применяется

для исследования значимости внешних стимулов, ассоциированных с подкрепляющим действием алкоголя. Также для моделирования рецидивирования алкоголизма широко используются модели индуцированного стрессом или индуцированного предьявлением этанола (прайминг) восстановления ранее угасшей оперантной реакции по потреблению алкоголя [23]. Существует много публикаций, в которых утверждается, что стимулы, ассоциированные с приемом алкоголя, являются решающими факторами, запускающими рецидивирование употребления алкоголя [24-28]. Восстановление реакции по употреблению алкоголя в оперантных камерах при помощи ассоциированных с употреблением алкоголя стимулов, показывает, что даже крысы, потребляющие в ходе эксперимента незначительные количества этанола, после предоставления ассоциированных с потреблением алкоголя стимулов показывают увеличение потребления алкоголя [29;30].

При моделировании восстановления ранее угасшей реакции сначала у животного формируется ассоциация между оперантной реакцией, направленной на получение алкоголя (выглядывание в отверстие или нажатие на педаль), и условными стимулами (свет, звук). Выработанное оперантное поведение подавляют, например, заменой этанола на воду. После достижения угасания оперантной реакции животному предоставляются или стимулы, которые ранее были ассоциированы с предьявлением безусловного раздражителя (этанола), или делается инъекция этанола (модель прайминга). Основным оцениваемым показателем является число выполненных оперантных реакций за сессию. Для контроля неспецифического влияния этанола на поведение учитываются моторные реакции, такие как нажатие на «неактивную» педаль или выглядывание в «неактивное» не связанное с

потреблением этанола отверстие. Восстановление ранее угасшей реакции представляет собой принятие решения о самом факте употребления алкоголя, но фактического потребления алкоголя не происходит. Было показано, что реакция восстановления, индуцированная этанолом, может быть ослаблена введением налтрексона - антагониста опиатных рецепторов [31]. Уменьшение или отсутствие реакции восстановления, вызванной этанолом, может рассматриваться как проявление воздержания животным от рецидива. Кроме того, латентный период первой попытки потребления [32] у животных аналогичен задержке «первого» глотка в клинических исследованиях у человека.

Для постановки данной модели также необходимо достаточно длительное время и наличие оперантных камер.

Измерение потребления этанола

Наиболее типичным способом измерения потребления этанола животными является измерение количества этанола, потребленного за день, в граммах на килограмм массы тела животного [33]. Различия между низким и умеренным уровнями, по сравнению с избыточным уровнем потребления этанола, является важным аспектом, который следует учитывать при оценке полученных результатов, так как от уровня потребления может зависеть эффективность терапии [3; 34]. Например, FDA в 2004 году одобрило препарат акампрозат (Campral) для лечения алкоголизма, купирования алкогольной абстиненции и профилактики рецидивирования алкоголизма. Однако было показано, что акампрозат избирательно подавляет только чрезмерное, но не низкое потребление этанола у крыс [35].

Не будучи генетически выведенными, или селективно отобранными на основании большего предпочтения этанола, лабораторные грызуны показывают различные показатели потребления, на основа-

нии которых животных условно можно разделить на мало и много пьющих. Относительно низкие уровни потребления (приблизительно до 2-2,5 г/кг/день у крыс, и 5-6 г/кг/день у мышей) не обязательно связаны с подкрепляющими свойствами этанола и, вероятно, не актуальны для моделирования расстройств, вызванных злоупотреблением алкоголя [3]. Такие животные, по всей видимости, употребляют этанол из-за его калорийности и/или его вкуса. Высокие уровни потребления (5-10 г/кг/день у крыс и 12-20 г/кг/день у мышей) помимо животных селективно отобранных на основании предпочтения к алкоголю, могут демонстрировать и аутбредные животные. Однако процент таких грызунов обычно не больше половины от выборки. Увеличение уровня потребления этанола может наблюдаться у животных, фенотипически отобранных на основании предпочтения к этанолу [33; 36; 37], после хронического воздействия этанола (например, паров этанола) [3], или при помощи других манипуляций [22;38].

При анализе моделей потребления этанола животными много внимания уделяется изучению условий, при которых животные демонстрируют специфическое поведение по поиску или потреблению этанола. Меньше внимания уделяется условиям, которые лежат в основе низкого уровня потребления этанола, или внешним факторам, которые уменьшают потребление или приводят к воздержанию от алкоголя животными, которые когда-то демонстрировали предпочтение к этанолу. В связи с этим использование существующих генетических моделей животных, таких как инбредные линии грызунов, которые демонстрируют высокое или низкое потребление этанола и генномодифицированных мышей [39], возможно, сможет помочь в улучшении понимания влияния этих условий.

Например, лучшее понимание генети-

ческих механизмов, лежащих в основе низкого потребления этанола у не предпочитающих этанол лабораторных грызунов (например, NP и LAD крысы, DBA/2 мыши) может помочь в разработке новых методов фармакотерапии уменьшения потребления этанола. То же можно сказать и о разработке новых поведенческих процедур, направленных на снижение потребления или выработку воздержания от алкоголя, у генотипов, которые обычно потребляют большие количества этанола (например, P и HAD крысы, мышей C57BL/6).

Некоторые линии инбредных мышей в обычных условиях потребляют алкоголь в гораздо больших количествах, по сравнению с другими линиями, и поэтому могли бы быть объектами для исследований коррекции патологических механизмов, лежащих в основе подкрепляющего действия алкоголя. В качестве примера можно отметить мышей линии C57BL/6, которые в стандартных тестах по свободному выбору этанола демонстрировали уровень потребления выше 10 г/кг/день [40; 41]. Среди крыс лучше всего изучены линии, выведенные в Финляндии, США и на Сардинии. Финская линия носит название «Алкоголь предпочитающие» (AA) и «Алкоголь не предпочитающие» (ANA) крысы. Данные линии формировались путем отбора, начиная с 1963 года, животных среди аутбредных крыс, предпочитающих или нет 10% раствор алкоголя [42]. Алкоголь-предпочитающие крысы (P) были выведены в штате Индиана, и потребляют этанол на уровне 5-8 г/кг/день, с уровнем алкоголя в крови 50-200 мг/100мл, в то время как алкоголь - не предпочитающие крысы (NP) употребляют этанол в количестве менее 0,5 г/кг в день [43]. Алкоголь - предпочитающие крысы, выведенные на Сардинии (sP) также были выведены из аутбредных крыс на основании их предпочтения к алкоголю [44]. Однако основным недостатком этих

линий грызунов является то, что предпочтение алкоголю само по себе не обязательно означает аддиктивное поведение, но часто отражает контролируемое потребление алкоголя. Так упомянутые выше мыши линии C57BL/6, имеющие высокий уровень потребления этанола, не демонстрируют такого аддитивного поведения, как неконтролируемое употребление алкоголя.

Очевидно, что на сегодняшний день не существует модели потребления алкоголя животными, которая бы идеально отражала симптоматику формирования и развития алкоголизма у человека. Важным направлением является оценка индивидуальных особенностей, которые влияют на потребление этанола у животных. Данный подход ведет к выделению биомаркеров, которых на настоящий момент существует около 377, которые в большей или меньшей степени определяют предрасположенность индивидуума к злоупотреблению алкоголем, однако практического применения в моделировании алкоголизма у животных они пока не получили [45].

При всём разнообразии современной терапии алкоголизма существенных результатов добиться очень сложно, поэтому поиск новых путей фармакотерапии злоупотреблением алкоголем является перспективным и важным направлением, что в свою очередь стимулирует разработку новых или модернизацию уже известных моделей на животных.

Modeling of alcohol dependence in animals.

V. Kashkin, E. Shekunova, M. Makarova, V. Makarov.

ABSTRACT

Animal models are important tools in the study of alcohol consumption and abuse, because they allow researchers to use methods that cannot be used with human subjects. Animal models have been developed to study various aspects of alcohol intake and

dependence, including alcohol-seeking behavior, alcohol-related organ damage, tolerance to alcohol, and physical dependence on alcohol. Because animal models can be genetically manipulated, they are also valuable for research into the genetic determinants of alcoholism. The questions surrounding the use of animal models in alcohol research include the species of animal used, the pathway and duration of alcohol administration, and the model's face and predictive validity, that the first, implies phenomenological properties between the simulated model and state, and the second, it reflects the probability that the results obtained by its use, can be obtained in a clinical trials.

Key words: alcohol, ethanol, model of addiction, rats.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spanagel R., Holter S.M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism // *J. Neural. Transm.* -2000. -№107(6). - P. 669-680.
2. Lester D., Freed E.X. Criteria for an animal model of alcoholism // *Pharmacol Biochem Behav.* -1973. -№1103. -P.107.
3. Heilig M., Koob G.F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence // *Trends Neurosci.* -2007. -№30. - P.399-406.
4. Chu K., Koob G.F.. Dependence-induced increases in ethanol self-administration in mice are blocked by the CRF1 receptor antagonist antalarmin and by CRF1 receptor knockout // *Pharmacol. Biochem. Behav.* -2007. -№86. -P. 813-821.
5. O'Dell L.E., Roberts A.J., Smith R.T., Koob G.F. Enhanced alcohol self-administration after intermittent versus continuous alcohol vapor exposure // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* -2004. -№28. -P. 1676-1682.
6. Roberts A.J., Heyser C.J., Cole M.. Excessive ethanol drinking following a history of dependence: animal model of allostasis // *Neuropsychopharmacology.* -2000. -№22. - P. 581-594.
7. Chu K., Koob G.F., Cole M.. Depend-

- ence-induced increases in ethanol self-administration in mice are blocked by the CRF1 receptor antagonist antalarmin and by CRF1 receptor knockout // *Pharmacol. Biochem. Behav.* -2007. -№86. -P. 813-821.
8. Ciccocioppo R., Lin D.. Reinstatement of ethanol-seeking behavior by drug cues following single versus multiple ethanol intoxication in the rat: effects of naltrexone // *Psychopharmacology (Berl)*. -2003. -№160. -P.208-215.
9. Liu X., Weiss F. Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms // *J. Neurosci.* -2002. -№15. -P. 7856-7861.
10. Becker H.C., Lopez M.F.. Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in C57BL/6 mice // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* -2004. -№28. -P. 1829-1838.
11. Finn D.A., Snelling C.. et al. Increased drinking during withdrawal from intermittent ethanol exposure is blocked by the CRF receptor antagonist D-Phe-CRF(12-41) // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* -2007. -№31. -P. 939-949.
12. Rimondini R., Sommer W.. A temporal threshold for induction of persistent alcohol preference: behavioral evidence in a rat model of intermittent intoxication // *J. Stud. Alcohol.* -2003. -№64. -P. 445-449.
13. Tabakoff B., Hoffman P.L.. Animal models in alcohol research // *Alcohol. Res. Health.* -2000. -№24. -P. 77-84.
14. Files F.J., Samson H.H., Denning C.E., Marvin S.. Comparison of alcohol-preferring and nonpreferring selectively bred rat lines. II. Operant self-administration in a continuous-access situation // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* -1998. -№22. -P. 2147-2158.
15. Beardsley P.M., Lemaire G.A., Meisch R.A.. Persistence of ethanol self-administration as a function of interreinforcer interval and concentration // *Drug Alcohol Depend.* -1993. -№34. -P. 71-81.
16. Leshner A.I.. Addiction is a brain disease, and it matters // *Science.* -1997. -№3. -P. 45-47.
17. McLellan A.T., Lewis D.C., O'Brien C.P., Kleber H.D.. Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation // *JAMA.* -2000. -№4. -P. 1689-1695.
18. Olive M.F.. Pharmacotherapies for alcoholism: the old and the new // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* -2010. -№9. -P. 2-4.
19. Le A., Shaham Y.. Neurobiology of relapse to alcohol in rats // *Pharmacol. Ther.* -2002. -№94. -P. 137-156.
20. Khisti R.T., Wolstenholme J., Shelton K.L., Miles M.F.. Characterization of the ethanol-deprivation effect in substrains of C57BL/6 mice // *Alcohol.* -2006. -№40. -P. 119-126.
21. Sinclair J.D., Senter R.J.. Development of an alcohol-deprivation effect in rats // *Q. J. Stud. Alcohol.* -1968. -№29. -P. 863-867.
22. Rodd Z.A., Bell R.L., Kuc K.A.. Effects of concurrent access to multiple ethanol concentrations and repeated deprivations on alcohol intake of high-alcohol-drinking (HAD) rats // *Addict. Biol.* -2009. -№14-P. 152-164.
23. Weiss F.. Advances in Animal Models of Relapse for Addiction Research. -2010.
24. Everitt B.J., Dickinson A., Robbins T.W.. The neuropsychological basis of addictive behaviour // *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* -2001. -№36. -P. 129-138.
25. Littleton J.. Can craving be modeled in animals? The relapse prevention perspective // *Addiction.* -2000. -№95. -P. S83-S90.
26. O'Brien C.P., Childress A.R., Ehrman R., Robbins S.J.. Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? // *J. Psychopharmacol.* -1998. -№12. -P. 15-22.
27. See R.E.. Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior // *Pharmacol. Biochem. Behav.* -2002. -№71. -P. 517-529.
28. Van de Laar M.C.. Event-related poten-

- tials indicate motivational relevance of cocaine cues in abstinent cocaine addicts // *Psychopharmacology (Berl)*. -2004. -№177. -P. 121-129.
29. Greeley J.D., Swift W.. Reactivity to alcohol-related cues in heavy and light drinkers // *J. Stud. Alcohol*. -1993. -№54. -P. 359-368.
30. Streeter C.C. et al. Videotaped cue for urge to drink alcohol // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* -2002. -№26. -P. 627-634.
31. Le A.D., Poulos C.X., Harding S. Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress // *Neuropsychopharmacology*. -1999. -№21. -P. 435-444.
32. Ford M.M., Fretwell A.M.. Influence of reinforcement schedule on ethanol consumption patterns in non-food restricted male C57BL/6J mice // *Alcohol*. -2007. -№41. -P. 21-29.
33. Bell R.L., Rodd Z.A. The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking // *Addict. Biol.* -2006. -№11. -P. 270-288.
34. Egli M.. Can experimental paradigms and animal models be used to discover clinically effective medications for alcoholism? // *Addict. Biol.* -2005. -№10. -P. 309-319.
35. Rimondini R., Arlinde C., Sommer W, Heilig M.. Long-lasting increase in voluntary ethanol consumption and transcriptional regulation in the rat brain after intermittent exposure to alcohol // *FASEB J.* -2002 -№16. -P. 27-35.
36. Ciccocioppo R., Economidou D. et al. Genetically selected Marchigian Sardinian alcohol-preferring (msP) rats: an animal model to study the neurobiology of // *Addict. Biol.* -2006. -№11. -P. 339-355.
37. Sommer W., Hyytia P.. The alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats: neurobiology of the regulation of alcohol drinking // *Addict. Biol.* -2006. -№11. -P. 289-309.
38. Rhodes J.S. et al. Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication // *Genes. Brain. Behav.* -2007. -№6. -P. 1-18.
39. Crabbe J.C. Genetic contributions to addiction // *Annu. Rev. Psychol.* -2002. -№53. -P. 435-462.
40. Yoneyama N.. Voluntary ethanol consumption in 22 inbred mouse strains // *Alcohol*. -2008. -№42. -P. 149-160.
41. Dole V.P., Ho A., Gentry R.T.. Toward an analogue of alcoholism in mice: criteria for recognition of pharmacologically motivated drinking // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* -1985. -№82. -P. 3469-3471.
42. Eriksson K.. Ethyl alcohol consumption: valid measurement in albino rats // *Science*. 1968. -№5. -P. 76-77.
43. McBride W.J., Li T.K.. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents // *Crit. Rev. Neurobiol.* -1998. -№12. -P. 339-369.
44. Colombo G.. ESBRA-Nordmann 1996 Award Lecture: ethanol drinking behaviour in Sardinian alcohol-preferring rats // *Alcohol*. -1997. -№32. -P. 443-453.
45. Manzardo A.M., McGuire A.. Clinically relevant genetic biomarkers from the brain in alcoholism with representation on high resolution chromosome ideograms // *Gene*. -2015. -№15. -P. 184-194.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Гущина С.В. – м.н.с., Макарова М.Н. - д.м.н., Пожарицкая О.Н. - к.ф.н.
Санкт-Петербургский институт фармации, Санкт-Петербург, Россия



РЕФЕРАТ

В работе проведены исследования, направленные на выбор носителя для твердых дозированных лекарственных форм. В ходе исследования была оценена фармакологическая безопасность носителей, а также комплексная оценка влияния носителей на биохимические, гематологические показатели крови животных, а также гистологическая оценка местно-раздражающего действия.

Ключевые слова: носитель, *in vivo* токсикология, методы, доклинические исследования, крысы, токсичность.

ВВЕДЕНИЕ

Доклинические исследования являются одним из важнейших этапов в изучении лекарственного средства. Эти исследования проводят на биологических тест-системах. Наиболее распространенными тест-системами, используемыми для изучения безопасности новых лекарственных средств, являются мелкие грызуны: мыши, крысы, морские свинки, хомяки. При использовании данных тест-систем возникают трудности при введении препаратов в готовой лекарственной форме, в особенности твердых дозированных лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. Такие лекарственные формы слишком велики для внутрижелудочного введения мелким грызунам. И необходимо учитывать, что дозы препарата в готовой лекарственной форме, рассчитанные на человека, не подходят для введения животному. В связи с этим, для адекватной оценки действия лекарственного препарата необходимо перевести его в форму, удобную для введения лабораторным животным – раствор или суспензию.

На сегодняшний день таблетки и капсулы составляют около 80% от общего объема готовых лекарственных средств, а их производство во всем мире ежегодно возрастает на 10-15% [1]. В связи с широким распространением таблетированных и капсулированных лекарственных форм, их доля в объеме доклинических исследований весьма значительна. Таблетки и капсулы, помимо действующих веществ, содержат вспомогательные вещества, большая часть которых плохо или практически нерастворимы ни в гидрофильных, ни в гидрофобных растворителях. Из-за этого оптимальным способом введения препаратов является введение в виде суспензии.

Суспензия, является предпочтительной формой для внутрижелудочного введения большинства тестируемых и стандартных объектов, представленных в твердой лекарственной форме.

В доклинических исследованиях дисперсную фазу, используемую для приготовления готовых доз для введения животным, называют носителем. В некото-

Используемые наполнители и их классификация

| Группа вспомогательных веществ | Протестированный наполнитель |
|--------------------------------|--|
| ПАВ | полисорбат 80 (твин 80) |
| Суспензирующий агент | карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), метилцеллюлоза (МЦ), крахмал |
| Масла | кукурузное масло, оливковое масло |
| Разбавитель | вода |

рых случаях носителем может выступать корм и вода [2,4]. Носители в жидких суспензиях выступают и как жидкая фаза суспензии, и как стабилизатор. Стабилизирующее действие носителя заключается в образовании сольватных слоев на поверхности частиц суспензии, а также в охватывании этих частиц длинными цепными макромолекулами [1].

В качестве наполнителей используют различные группы вспомогательных веществ. Они включают соразтворители, липиды, циклодекстрины, поверхностно активные вещества (ПАВ) и суспензирующие агенты. Примеры изученных наполнителей приведены в таблице 1.

Выбор необходимого носителя может представлять значительную проблему для доклинических исследований. Носитель должен сохранять стабильность, однородность и возможность точного дозирования лекарственного препарата при проведении доклинических исследований. Кроме того, сами носители способны оказывать воздействие на тест систему, что может повлиять на токсические и фармакологические эффекты исследуемых веществ. В настоящее время выбор носителей для исследования выполняет спонсор исследования или лаборатория, выполняющая исследование [3].

Возможные последствия неправильного выбора носителя:

Ненужный стресс для животного;

Неправильная интерпретация фармакологических эффектов, в том числе и токсичности препаратов;

Неправильное и/или неодинаковое

дозирование исследуемым животным.

В работах фармакологов отмечается, что способ приготовления дозы для введения может иметь столь же заметный эффект на животное как само исследуемое вещество [3].

Целью нашего исследования было определить безопасность некоторых носителей для внутрижелудочного введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы следующие носители: вода очищенная, 1% раствор крахмала, 0,05 и 1% растворы метилцеллюлозы (МЦ), 0,05 и 0,5% растворы карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), 0,05 и 0,2% растворы твина 80, кукурузное и оливковое масла.

В исследовании использовали аутобредных белых крыс-самцов массой 180-220 г (Питомник лабораторных животных РАМН «Рапполово»), которые содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009), согласованном с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» и одобрены на заседании биоэтической ко-

миссии СПб института фармации.

Животные были разделены на 10 групп по 7 голов в каждой.

Носители вводили внутривенно ежедневно в течение 14 дней в первой половине дня после 8 часового голодания. Объем введения для каждого животного массой 200 г. составлял 5 мл. Ежедневно осуществляли клинический осмотр и клинические наблюдения, оценивали общее состояние животных. До введения, на 7 и 15 дни исследования проводили взвешивание животных. На 15 день осуществляли эвтаназию животных в CO₂-камере с забором крови для определения биохимических и гематологических показателей.

Гематологические показатели: количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов, лейкоформула (гранулоциты, средние клетки, лимфоциты) – определяли в цельной крови с антикоагулянтом на гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet (Diatron MI PLC, Венгрия) с использованием реагентов той же фирмы.

Биохимические показатели крови определяли на биохимическом анализаторе «А-25» (BioSystems, Испания) с использованием реагентов той же фирмы в плазме крови без следов гемолиза. Определяемые параметры: аминотрансферазы (АЛТ и АСТ), билирубин, щелочную фосфатазу (ЩФ), креатинин, мочевины, общий белок, альбумин (А), глобулин (G), отношение А/G, холестерин, триглицериды и глюкозу.

Патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование внутренних органов. После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет внешних патологических признаков. Осмотр желудочно-кишечного тракта позволил оценить местно-раздражающее действие тестируемого объекта. Было проведено

исследование состояния брюшной полости, макро- и микроскопическое исследование внутренних органов.

У животных, подвергнутых эвтаназии и плановой некропии после введения исследуемых препаратов, был выполнен гистологический анализ следующих органов и тканей: желудок, тонкая и толстая кишка, печень.

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими методами (t-критерий Стьюдента). Для оценки данных был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. (StatSoft, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе эксперимента не было отмечено случаев гибели животных, связанных с введением носителей. При оценке динамики массы тела были получены данные, свидетельствующие, что ни один из носителей не оказал значимого влияния на изменение массы тела. При межгрупповом сравнении динамики массы тела экспериментальных животных, получавших исследуемые препараты, обнаружены статистически значимые отличия (ANOVA с повторными измерениями, F18.118=15.895, p=0,000). При проведении апостериорного анализа с использованием критерия Тьюки HSD не было выявлено статистически значимых отличий между группами.

При клиническом осмотре патологических изменений и нарушений поведения отмечено не было.

Влияние на гематологические показатели крови

Результаты анализа гематологических показателей представлены в таблице 2.

Таблица 2
Влияние 14-дневного внутрижелудочного введения носителей на гематологические показатели крови крыс-самцов, (M±m, n=7)

| Показатели | Вода очищенная | | Твин 80 | | КМЦ | | МЦ | | Крахмал | | Масло | |
|----------------------------------|----------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|----------|---------|-----------|------------|--|
| | 0,05% | 0,2 % | 0,05% | 0,5% | 0,05% | 0,5% | 0,05% | 1% | Крахмал | оливковое | кукурузное | |
| Лейкоциты *10 ⁹ /л | 8,4±0,7 | 8,6±0,8 | 10,7±0,6 | 8,2±0,9 | 10,7±0,6 | 8,2±0,9 | 11,2±0,4 | 10,1±1,2 | 8,2±0,6 | 9,8±1,2 | 8,3±0,6 | |
| Лимфоциты, % | 72±5 | 70±1 | 77±3 | 77±2 | 77±3 | 77±2 | 75±3 | 77±3 | 73±1 | 73±6 | 56±8* | |
| Моноциты/эозинофилы, % | 7,5±0,8 | 5,0±1,2 | 3,8±1,0 | 3,9±0,6 | 3,8±1,0 | 3,9±0,6 | 2,6±0,6* | 4,0±0,9 | 4,4±0,4 | 3,9±0,5 | 5,4±1,1 | |
| Гранулоциты, % | 24±5 | 23±2 | 19±2 | 19±2 | 19±2 | 19±2 | 22±3 | 19±2 | 22±1 | 23±6 | 39±8* | |
| Эритроциты, *10 ¹² /л | 7,8±0,3 | 7,8±0,3 | 8,6±0,3 | 8,5±0,1 | 8,6±0,3 | 8,5±0,1 | 8,1±0,3 | 7,7±0,3 | 8,3±0,3 | 6,9±0,4 | 7,1±0,2 | |
| Гемоглобин, г/л | 139±7 | 137±4 | 152±3 | 146±2 | 152±3 | 146±2 | 136±4 | 132±3 | 145±3 | 125±4* | 123±3* | |
| Гематокрит, % | 42±2 | 42±1 | 47±1 | 44±1 | 47±1 | 44±1 | 42±1 | 40±1 | 43±1 | 38±1* | 38±1* | |
| Тромбоциты, 10 ⁹ /л | 508±58 | 551±43 | 579±28 | 575±52 | 579±28 | 575±52 | 496±35 | 490±31 | 641±58* | 510±80 | 438±41 | |

Примечание: * – различия статистически значимые по сравнению с группой, получающей воду, t-тест для независимых переменных при $p < 0,05$.

Дисперсионный анализ данных показал наличие межгрупповых статистически достоверных различий гематологических показателей эритроциты, гемоглобин и гематокрит.

Для других показателей не обнаружено статистически значимых отличий во всех экспериментальных группах (ANOVA, $p > 0,05$).

Таким образом, многократное внутрижелудочное введение носителей на протяжении 14-ти дней не оказало значимого влияния на гематологические показатели крови экспериментальных животных.

Влияние на биохимические показатели крови

В таблице 3 представлены данные по оценке биохимических показателей крови экспериментальных животных после 14-дневного внутрижелудочного введения носителей.

Дисперсионный анализ данных показал наличие межгрупповых статистически достоверных различий по показателям мочевины, АСТ, АЛТ и белок.

Внутрижелудочное 14-дневное введение растворов ПАВ не оказало влияния на биохимические показатели крови по сравнению с введением воды. Введение растворов диспергирующих веществ приводило к незначительному повышению АСТ и АЛТ в плазме крови. При этом влияние на белок и глобулин оказывало только введение более концентрированных растворов диспергирующих веществ (0,5% КМЦ и 1% МЦ). Введение же растительных масел оказывало значимое влияние на уровень АСТ,

Таблица 3
Влияние 14-дневного внутрижелудочного введения носителей на биохимические показатели крови крыс-самцов, (M±m, n=7)

| Показатели | Вода очищенная | Твин 80 | | КМЦ | | МЦ | | Крахмал 1% | Масло | |
|--------------|----------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 0,05% | 0,2 % | 0,05% | 0,5% | 0,05% | 1% | | оливковое | кукурузное |
| Креатинин | 0,9±0,0 | 0,9±0,1 | 0,9±0,0 | 1,0±0,1 | 0,8±0,1 | 0,9±0,10 | 0,9±0,1 | 0,9±0,1 | 0,9±0,1 | 1,0±0,1 |
| Мочевина | 40,0±1,0 | 37,0±2,0 | 31,0±2,0* | 32,0±2,0 | 37,0±3,0 | 48,0±10,0 | 53,0±5,0* | 32,0±2,0* | 36,0±2,0* | 36,0±2,0* |
| АСТ | 152,0±11,0 | 159,0±13,0 | 160,0±10,0 | 181,0±15,0* | 214,0±11,0* | 216,0±13,0* | 196,0±12,0* | 186,0±16,0* | 174,0±9,0* | 174,0±9,0* |
| АЛТ | 53,0±3,0 | 54,0±3,0 | 51,0±4,0 | 67,0±4,0* | 65,0±7,0* | 67,0±9,0* | 66,0±4,0* | 67,0±9,0* | 65,0±6,0* | 65,0±6,0* |
| ЩФ | 258,0±25,0 | 235,0±25,0 | 252,0±19,0 | 292,0±14,0 | 304,0±46,0 | 237,0±23,0 | 250,0±24,0 | 308,0±42,0 | 332,0±47,0* | 332,0±47,0* |
| Билирубин | 1,0±0,5 | 1,4±0,2 | 1,2±0,2 | 1,5±0,2 | 1,6±0,5 | 1,7±0,3 | 1,0±0,2 | 1,6±0,3 | 1,6±0,4 | 1,6±0,4 |
| Холестерин | 1,8±0,1 | 1,6±0,1* | 1,6±0,1* | 1,8±0,1 | 1,9±0,1 | 1,6±0,2 | 1,8±0,1 | 1,7±0,1 | 1,9±0,1 | 1,9±0,1 |
| Триглицериды | 0,7±0,8 | 0,8±0,6 | 0,7±0,4 | 0,8±0,4 | 0,8±0,7 | 0,7±0,7 | 0,8±0,7 | 0,7±0,6 | 0,9±0,6 | 0,9±0,6 |
| Белок | 65,0±1,0 | 66,0±1,0 | 65,0±1,0 | 65,0±2,0 | 71,0±2,0* | 65,0±1,0 | 73,0±1,0* | 70,0±2,0* | 71,0±1,0* | 71,0±1,0* |
| A | 29,0±1,0 | 29,0±1,0 | 27,0±1,0 | 27,0±1,0 | 28,0±1,0 | 27,0±1,0 | 29,0±1,0 | 27,0±1,0 | 29,0±1,0 | 29,0±1,0 |
| G | 39,0±1,0 | 37,0±1,0 | 37,0±1,0 | 39,0±1,0 | 41,0±1,0 | 38,0±1,0 | 42,0±0,0 | 42,0±1,0 | 42,0±1,0 | 42,0±1,0 |
| F/G | 0,8±0,3 | 0,8±0,5 | 0,7±0,4 | 0,7±0,3 | 0,7±0,2 | 0,7±0,3 | 0,7±0,3 | 0,6±0,2 | 0,700,5 | 0,700,5 |
| Глюкоза | 103,0±4,0 | 99,0±4,0 | 111,0±7,0 | 103,0±3,0 | 110,0±6,0 | 119,0±9,0 | 120,0±5,0* | 118,0±9,0 | 112,0±8,0 | 112,0±8,0 |

Примечание: * – различия статистически значимые по сравнению с группой, получившей воду, t-тест для независимых переменных при $p < 0,05$

мочевины, белка и глобулина по сравнению с группой животных, получавших воду, в плазме крови экспериментальных животных. Апостериорный анализ показал отличие групп получавших МЦ во всех концентрациях от группы, получавшей воду, очищенную по показателю АСТ, что может свидетельствовать о функциональном напряжении печени, связанное с приемом метилцеллюлозы. Введение крахмала оказывало незначительное влияние на уровень глюкозы в крови. Для других показателей не обнаружено статистически значимых отличий во всех экспериментальных группах (ANOVA, $p > 0,05$).

Результаты патоморфологического исследования

При макроскопическом исследовании отклонений в состоянии внутренних органов во всех исследуемых группах не обнаружено. При вскрытии животных, подвергшихся плановой эвтаназии патологических макроскопических изменений, за исключением признаков быстро наступившей смерти, обнаружено не было. Отмечалось умеренное полнокровие кровеносных сосудов желудка, одинаково выраженное во всех исследованных группах.

При микроскопическом анализе также не было выявлено патологических изменений в изученных органах и тканях.

По результатам вышеизложенного можно сделать вывод, что все носители, использованные в исследовании фармакологически безопасны. Их использование не влияет на состояние экспериментальных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутрижелудочное введение различных групп носителей: суспендирующих веществ (карбоксиметилцеллюлозы, метилцеллюлозы, крахмала), поверхностно активных веществ (твина 80) и растительных масел (оливкового и кукурузного) в

сравнении с водой не оказало значимого влияния на физиологические параметры испытуемых животных. Исследуемые носители не вызывали раздражение слизистой желудочно-кишечного тракта и повреждающего действия на органы ЖКТ и печени.

A comparative toxicological study of the excipients for drugs used in preclinical studies.

S.V. Guschina, M.N. Makarova, O.N. Pozharitskaya.

ABSTRACT

Toxicology and pharmacology studies conducted in the early stages of drug discovery often require formulation strategies involving the use of excipients with limited knowledge regarding their pre-clinical safety liabilities. The use of excipients is vital to efforts to solubilize and deliver small molecules in drug discovery. Whilst excipients can have a significant impact on pharmacology and toxicology studies by enabling solubility to maximize systemic exposure, they also have the potential to obscure clinical pathology endpoints. In this article, we report on the in vivo safety in rats for 7 excipients commonly employed in formulations for preclinical pharmacology and toxicology studies.

The test articles were administered once daily for fourteen days, by oral gavage to male albino rats in dose 5 mL/rat, and the animals monitored for visible clinical signs. At the end of the study, routine necropsy and clinical pathology, endpoints were investigated.

None of the 7 excipients tested was acutely toxic, and animals survived and remained generally normal for the duration of the study. There were, however, nonsignificant effects on parameters commonly evaluated as indicators of health, well-being, and/or toxicologic response to administration of test article(s) in regulated preclinical safety studies. Such effects could conceivably mask or confound the interpretation of compound

mediated adverse effects. These effects should be considered and evaluated against the anticipated pharmacotoxic endpoints when selecting formulations for early pharmacology and toxicology screening in drug discovery.

Key words: excipient, in vivo toxicology, methods, preclinical studies, rats, toxicity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чуешов В.И., Гладух Е.В., Ляпунова О.А. и др. Промышленная технология лекарств [Электронный ресурс]. - Харьков.-2010. URL (дата обращения: 08.10.2013).

2. Gad S.C., Cassidy C. D., Aubert N. Et al. Nonclinical vehicle use in studies by multi-

ple routes in multiple species // Int. J. toxicol. – 2006. – Т. 25(6). – С. 499-521.

3. Thackaberry E.A., Kopytek S., Sherratt P. et al. Comprehensive investigation of hydroxypropyl methylcellulose, propylene glycol, polysorbate 80, and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for use in general toxicology studies // Toxicol. Sci. - 2010.- Vol. 117(2).- P. 485-492.

4. Turner P.V., Pekow C., Vasbinder M.A., Brabb T. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation // J. Am. As. Laboratory Animal Sci.: JAALAS. – 2011. – Т. 50 (5). – С. 614.

УДК 615.033

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА, СОВРЕМЕННЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, ИССЛЕДОВАНИЯ IN VITRO

Карлина М.В. - к.б.н., Пожарицкая О.Н. - к.ф.н., Шиков А.Н. - д.ф.н.
Санкт-Петербургский институт фармации, Санкт-Петербург, Россия



РЕФЕРАТ

В статье изложены основные требования к необходимому объему фармакокинетических исследований новых и воспроизведенных лекарственных препаратов на животных, рассмотрены альтернативные модели изучения отдельных элементов фармакокинетики in vitro.

Ключевые слова: фармакокинетика, биодоступность, животные, тест кинетики растворения, in vitro.

ВВЕДЕНИЕ

Фармакокинетика (от древнегреческого *φάρμακον* — лекарство и *κίνησις* — движение) — раздел медицины, который изучает кинетические закономерности химических и биологических процессов, происходящих с лекарственным веществом в организме человека или животного. Фармакокинетика не анализи-

рует механизм взаимодействия между химическим веществом и чувствительным к нему субстратом, но позволяет изучать условия для наилучшего обеспечения подобного взаимодействия или, напротив, для его предотвращения [2].

В жизненном цикле препарата фармакокинетика должна быть изучена как на этапе доклинических исследований, так и в ходе клинических исследований. На

доклиническом этапе, если говорить об изучении оригинального средства, должна быть изучена фармакокинетика новой субстанции (молекулы) и созданного на его основе лекарственного препарата. В клинике уже, как правило, изучается готовый препарат в определенной лекарственной форме.

Экспериментальное изучение фармакокинетических свойств лекарственных препаратов на животных является обязательным этапом для внедрения в медицинскую практику [5, 6, 8]. Основанием изучения фармакокинетики на животных служит генетическое сходство млекопитающих и вытекающее отсюда схожая физиологическая реакция человеческого организма на введение препарата.

Процессы всасывания, распределения, метаболизма и элиминации лекарственных веществ, которые являются предметом изучения фармакокинетики, напрямую определяют терапевтическую эффективность препаратов, выбор оптимальной лекарственной формы, пути и схемы введения. Фармакокинетические данные необходимы для установления зависимости «концентрация-эффект», которая характеризуется меньшими видовыми различиями, чем зависимость «доза-эффект» и поэтому может быть использована для прогнозирования действия фармакологического средства у человека [5].

Целью исследования фармакокинетики фармакологического средства является количественная характеристика процессов всасывания, распределения, метаболизма и элиминации [2]. Наиболее важными для понимания судьбы лекарственного вещества в организме являются следующие параметры: площадь под фармакокинетической кривой ($AUC - \text{area under curve}$), максимальная концентрация (C_{\max}), время достижения максимальной концентрации (T_{\max}), объем распределения (V_d), клиренс (Cl), константа абсорбции (k_{ab}), константа элиминации (k_{el}), пе-

риод полувыведения ($T_{1/2}$), биодоступность (f).

Необходимый объем и регламент фармакокинетических исследований

Фармакокинетические свойства фармакологических средств в доклинической практике изучают на здоровых животных одного пола (крысы, кролики, собаки, обезьяны, в особых случаях – мыши, морские свинки), масса которых не должна отличаться от нормального значения для соответствующего возраста более чем на 10%.

Число животных на одну временную точку должно быть не менее 5, если у каждого животного из выборки отбирается только одна проба (одно животное – одна точка), в тех случаях, когда у каждого животного отбирается пробы в каждой временной точке, число животных должно быть не менее 6.

Путь введения определяется формой лекарственного средства, рекомендованного на основании фармакокинетических исследований для дальнейшего фармакологического изучения. Методы введения могут быть различные: внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, пероральное и др. Внутрь лекарственное средство вводят животным с помощью глоточного или дуоденального зонда натошак во избежание взаимодействия лекарственного вещества с пищей [3].

Длительность эксперимента должна соответствовать времени в 5 раз продолжительнее периода полувыведения, при этом схема отбора проб должна обеспечивать не менее трех точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой.

Для анализа концентрации фармакологических средств в биоматериале могут быть использованы различные методы (высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детекцией, флуоресцентной и масс-спектрометрической детекцией, иммуноферментные методы, газовая

хроматография) [4], разработанные методики количественного определения должны быть валидированы в соответствии с современными требованиями [1].

Объем фармакокинетических исследований, проводимых на животных, дифференцируется следующим образом [5]:

для оригинальных фармакологически активных веществ, а также известных веществ, ранее не применявшихся в качестве фармакологических средств, проводится полный объем исследований;

для новых лекарственных форм, содержащих известное фармакологическое средство, для воспроизведенных лекарственных средств (дженериков), а также для обоснования расширения показаний к применению ранее зарегистрированных препаратов проводится ограниченный объем исследований.

При изучении фармакокинетики препарата при новом показании к применению исследования проводятся на одном виде животных при однократном и многократном введении с использованием двух уровней доз, а также проводится оценка тканевой доступности (выбор тканей в зависимости от новых показаний к применению).

Изучение фармакокинетики новой лекарственной формы предполагает проведение исследований в сравнении с уже существующим препаратом на 1 виде животных при однократном введении в одной дозе с оценкой относительной биодоступности.

Таким образом, фармакокинетические исследования являются крайне важными для понимания судьбы препарата в организме, однако они дорогостоящи и продолжительны, т.к. для достижения статистической достоверности необходимо использовать достаточно большое количество особей в эксперименте, кроме того, в ряде случаев, ввиду межвидовых различий необходимо использовать несколько видов животных.

Менее затратными и трудоемкими являются исследования фармакокинетики и биодоступности *in vitro*.

Фармакокинетические исследования in vitro

На этапе создания нового лекарственного препарата, при выборе лекарственной формы и оптимального состава вспомогательных веществ, прежде чем приступать непосредственно к экспериментам *in vivo*, зачастую оказывается полезным провести серию экспериментов *in vitro*. К тестам *in vitro*, характеризующим фармакокинетику, относятся такие исследования как:

Изучение степени связывания веществ с белками плазмы крови (является обязательным этапом при изучении фармакокинетики новых лекарственных веществ [6]. Соединения с высокими значениями связывания в меньшей степени депонируются в органах, не подвержены интенсивному метаболизму, однако в этом случае необходимо вводить большие дозы лекарственного средства для создания необходимой терапевтической концентрации действующего вещества и, как следствие, возрастает вероятность токсических эффектов.

Изучение биотрансформации и межлекарственных взаимодействий в настоящее время должно проводиться для новых лекарственных средств с целью выявления возможных клинических последствий в виде снижения эффективности или развития нежелательных лекарственных реакций при межлекарственном взаимодействии, дизайн и методология данных исследований подробно изложены в руководстве [7].

Изучение кишечной проницаемости веществ *in vitro*: проводится на монокультурах различных линий клеток, наиболее широко применяется для данной цели культура клеток колоректальной аденокарциномы Caco-2 cell [9]. Данный тест косвенно, но с достаточной степенью дос-

товерности и надежности позволяет оценить кишечную проницаемость, он крайне важен для пероральных лекарственных средств, т.к. прежде чем попасть к органу или клетке-мишени вещество должно абсорбироваться через кишечную мембрану.

Тест растворение *in vitro* успешно применяется для пероральных лекарственных форм, он в первом приближении позволяет оценить биологическую доступность веществ, успешно используется при разработке препаратов с целью оптимизации состава лекарственной формы. В ряде случаев, при выявлении достоверной *in vivo/in vitro* корреляции, данный тест позволяет отказаться от затратных и продолжительных сравнительных фармакокинетических исследований в опытах *in vivo*. Сравнительный тест кинетики растворения используется как дополнение к исследованию биоэквивалентности для основной дозировки воспроизведенного лекарственного препарата, для замены исследований биоэквивалентности дополнительных дозировок воспроизведенного лекарственного препарата, при смене состава вспомогательных веществ, производственной площадки и/или технологического процесса производства препарата [7].

Тесты *in vitro* благодаря своей простоте и дешевизне являются удобным инструментом для изучения элементов фармакокинетики на этапе разработки лекарственного препарата, при выборе оптимального состава вспомогательных веществ, позволяют сократить объем дорогостоящих и, в ряде случаев, этически небезупречных фармакокинетических исследований на животных.

Experimental pharmacokinetics, modern requirements, *in vitro* studies.

M.V. Karlina, O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov.

ABSTRACT

Basic requirements for the necessary

volume of pharmacokinetic studies of new drugs and generics on animals presented, discussed alternative models study the pharmacokinetics of the individual components *in vitro*. Experimental study of the pharmacokinetic properties of drugs in animals is an obligatory stage of the introduction into medical practice. A study of the pharmacokinetics in animals is a genetic similarity of mammals and the consequent similar physiological response of the human body in the administration of the drug. The purpose of pharmacokinetic studies of the pharmacological means is a quantitative characteristic of the processes of absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME). Pharmacokinetic studies are essential for understanding the location of the drug in the body, but they are costly and prolonged, as to achieve statistical significance necessary to use a sufficiently large number of animals in the experiment, moreover, in some cases, due to interspecies differences necessary to use several kinds of animals. Pharmacokinetics and bioavailability studies *in vitro* are less costly and time-consuming.

Key words: pharmacokinetics, bioavailability, animals, dissolution test, *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP). -2011.
2. Белолипецкая В.Г., Суханов Я.В. Фармакокинетические исследования и практическая медицина // Рациональная фармакотерапия в фармакологии. –2005. – №2. –С. 43-47.
3. Иванникова Е.В., Жердев В.П., Бойко С.С., Блынская Е.В., Турчинская К.Г., Алексеев К.В. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм // Фармакокинетика и фармакодинамика. –2013. – №2. –С. 1-17.

4. Рейхарт Д.В. Чистяков В.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях // Казанский медицинский журнал. –2010. –Т.91. -№4. – С. 532-536.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К. - 2012. -944с.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств, том 1/под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. -2013. -328с.
7. Руководство по экспертизе лекарственных средств, том III/под ред. А.Н. Миронова. – М.: ПОЛИГРАФ ПЛЮС. -2014. - 344с.
8. Федеральный закон 361-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010
9. Шохин И.Е., Кулинич Ю.И., Раменская Г.В., Кукес В.Г. Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости *in vitro* – монослоя эпителиальных клеток Caco-2 // Биомедицина. – 2012. -№3. –С. 90-97.



КАРЕНКОЛ

энрофлоксацин + колистина сульфат

комбинированный антибиотик в виде раствора для орального применения

Лечение респираторных, кишечных и смешанных бактериальных и микоплазменных инфекций птицы и свиней.

Сочетание энрофлоксацина (100мг/мл) с колистина сульфатом (10^6 МЕ/мл) оказывает мощный синергидный эффект. Это особенно эффективно при наличии штаммов с приобретенной устойчивостью к энрофлоксацину, а наличие колистина сульфата может снизить вероятность возникновения резистентности к фторхинолонам, даже при очень низких концентрациях.



На производстве Laboratorios Karizoo, S.A. осуществляется эффективный фармацевтический контроль качества лекарственных средств в соответствии со стандартами GMP, установленными на территории Европейского Союза.

Номер регистрационного свидетельства в РБ: 4965-10-15 3А от 10.07.2015 г.

laboratorios
Karizoo **K**

Производитель: Laboratorios Karizoo, S.A. (Испания)
Официальный дистрибьютор в странах Евразийского экономического союза:
ООО «ФармаВорд Русь», тел./факс: +7 (812) 596-37-75, sale@vetapteka.ru
www.karizoo.com



МВВ

Редакция журнала
«Международный вестник
ветеринарии»
196084, Санкт-Петербург,
Черниговская 5, СПбГАВМ.
Телефон/факс (812) 387-11-58
Mail to: farm07@mail.ru