

На правах рукописи

НИКОНОВ СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ИЗЫСКАНИЕ СРЕДСТВ ЛЕЧЕНИЯ ЖИВОТНЫХ
ПРИ Т-2- И АФЛАТОКСИКОЗЕ**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Казань - 2004

Работа выполнена в Федеральном государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт» (г. Казань).

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Тремасов Михаил Яковлевич

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук
Гильмутдинов Рустем Якубович

Доктор ветеринарных наук, профессор
Набиев Фанис Галинурович

Ведущее учреждение: Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (г. Москва)

Защита состоится « 28 » декабря 2004 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при ФГНУ Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте (420075, г.Казань, Научный городок -2, ВНИВИ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГНУ ВНИВИ (г.Казань)
Автореферат разослан «24» ноября 2004 г.

Учёный секретарь диссертационного совета, кандидат ветеринарных наук



В.И. Степанов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Важное значение в решении проблем животноводства придается созданию качественной кормовой базы. Однако решение этой задачи осложняется тем, что корма часто бывают небезопасными, так как могут загрязняться различными экотоксикантами как техногенного, так и природного происхождения. Среди последних все большее внимание привлекают микотоксины.

Микотоксины - вторичные, структурно различные метаболиты грибов, которые растут на разнообразных продуктах питания и корма, потребляемых животными и человеком. Заболевания, возникающие в результате потребления последними контаминированных микотоксинами продуктов и кормов, классифицируются как микотоксикозы. Первые сообщения об алиментарных токсикозах, обусловленных микроскопическими грибами и продуцируемыми ими микотоксинами, появились более 100 лет назад (Воронин Н.С., 1890).

Сейчас количество микотоксинов по разным данным составляет от 200 до 400 видов, и оно, вероятно, будет возрастать за счет установления этиологии новых микотоксикозов.

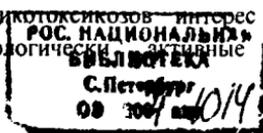
Учитывая, что микотоксины, помимо общетоксического действия, обладают мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами, а также существенно влияют на иммунный статус млекопитающих и птиц, их следует рассматривать как одну из важнейших ветеринарных и медицинских проблем (Тутельян В.А., Кравченко Л.В., 1985; Хмелевский Б.А. и соавт., 1985; Котик А.Н., 1999; Кузнецов А.Ф., 2001; Petska J. et al., 1990; Fernandes A. et al., 1990; Oswald I. et al., 1998).

Степень распространения микотоксинов очень высокая. География их охватывает страны всех континентов. Контаминации микотоксинами подвержены все основные продукты питания, корма, продовольственное сырье, а усиление торговых связей между различными странами в значительной степени способствует распространению микотоксинов и, как следствие, микотоксикозов, и есть все основания полагать, что эта проблема является глобальной.

На современном этапе, учитывая многолетние данные по микотоксикозам, наиболее значимы заболевания, вызываемые афла-, фузарио-, охратоксинами (Тремасов М.Я., 2002; Жуленко В.Н. и соавт., 2002; Pitt J.I., 2000). Они наиболее широко распространены в объектах ветнадзора и обладают сильнейшим негативным действием на организм животных.

Важной проблемой для ветеринарной микотоксикологии является терапия микотоксикозов животных. Это, прежде всего, связано, с одной стороны, с отсутствием эффективных специфических средств профилактики и лечения отравлений животных ядами микроскопических грибов, с другой стороны - со сложностью разработки антидотов, которые в настоящее время не существуют.

У исследователей при лечении микотоксикозов интерес представляют фармакологические препараты и биологически активные вещества пи.



способствующие быстрому выведению из организма токсинов, повышающие устойчивость организма, а также средства симптоматической терапии.

Учитывая вышеизложенное, поиск эффективных, технологичных препаратов и методов, обладающих способностью защитить организм животных от воздействия микотоксинов, сохранить качество продуктов питания животного происхождения, является актуальной проблемой.

Работа является частью комплексных заданий НИР по теме «Разработка мероприятий по ликвидации в очагах поражения последствий воздействия экотоксикантами» (№ гос. регистрации 01200202603).

1.2. Цель и задачи исследования: отбор средств - потенциальных антидотов микотоксинов; оценка их эффективности при раздельном и сочетанном воздействии Т-2 токсина и афлатоксина В₁; разработка и апробация схемы лечения животных при микотоксикозах. В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Провести отбор средств - потенциальных антидотов микотоксинов из веществ различных химических групп.

2. Оценить сорбционные свойства сорбентов различных групп в отношении Т-2 токсина и афлатоксина В₁.

3. Изучить эффективность применения аминазина и зоокарба при раздельном и совместном воздействии Т-2 - токсина и афлатоксина В₁, учитывая изменения клинических, некоторых гематологических и биохимических показателей, перекисного окисления липидов, симпато-адреналовой и сердечно-сосудистой систем.

4. Разработать схему лечения животных при микотоксикозах и провести ее апробацию.

1.3. Научная новизна работы. Впервые проведен скрининг потенциальных антидотов микотоксинов. Отобраны средства, оказывающие определенный защитный эффект при микотоксикозах животных. С использованием данных гематологических и электрокардиографических показателей, состояния симпато-адреналовой системы, перекисного окисления липидов показана эффективность применения углеродного энтеросорбента зоокарба и нейролептика аминазина при раздельном и сочетанном Т-2-, афлатоксикозах. С учетом результатов проведенных исследований разработана схема лечения животных при микотоксикозах, успешно апробированная в лабораторных и производственных условиях.

1.4. Практическая ценность работы. Выявленные изменения клинических, гематологических и электрокардиографических показателей, данных липидного обмена, состояния симпато-адреналовой системы при микотоксикозах на фоне применения аминазина и зоокарба позволяют использовать последние для лечения животных при отравлении микотоксинами.

Разработана схема лечения животных при отравлении микотоксинами. Результаты исследований использованы при составлении нормативно-

технических документов, утвержденных- директором ФПГУ ВНИВИ - «Методические указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов» (19.11.2003), начальником ГУВ КМ РТ - «Методические рекомендации по борьбе с микотоксикозами животных в Республике Татарстан» (18.11.2002), руководителем управления реализации целевых программ в животноводстве МСХ и продовольствия Самарской области - «Методические рекомендации по борьбе с микотоксикозами животных в Самарской области» (1.03.2004).

1.5. Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы доложены и одобрены на научных сессиях ФГНУ ВНИВИ (г.Казань) по итогам НИР за 2001-2003 гг, ежегодных республиканских, межрегиональных, международных научно-практических конференциях по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии (Троицк, 2002; Воронеж, 2002; Ульяновск, 2003; Владимир, 2003; Казань, 2003,2004; Чебоксары, 2004; Москва, 2004).

1.6. Публикации. По результатам исследований опубликовано 12 работ.

1.7. Основные научные положения диссертации, выносимые на защиту: - результаты скрининга средств - потенциальных антидотов микотоксинов животных;

- сорбционные свойства бентонита, цеолита и зоокарба *in vitro*;
- эффективность лечения животных при остром и подостром раздельном и совместном воздействии Т-2- и афлатоксина В₁,
- схема лечения животных при микотоксикозах.

1.8. Объем и структура работы. Материалы диссертации изложены на 184 страницах компьютерного текста и включают введение, обзор литературы, материалы и методику исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 46 таблицами, 8 рисунками. Список использованной литературы содержит 243 источника, в том числе 119 иностранных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методика исследований

Работа проводилась в 2001-2004 годах в лаборатории контроля и индикации экотоксикантов растительного и природного происхождения Федерального государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт (г.Казань).

В экспериментах использовано 939 животных, в том числе 50 белых мышей, 766 белых крыс, 24 овцы, 31 теленок, 68 подсвинков. Перед постановкой опытов животные выдерживались на трехнедельном карантине. Крушгыч животных содержали в боксах по 3-5 голов, а крыс и мышей - в клетках по 4-10 голов. Кормление их осуществлялось по рационам, принятым в виварии ФПГУ

ВНИВИ, и соответствовало зоотехническим требованиям. На протяжении всего периода исследования опытные и контрольные группы животных находились в одинаковых зоогигиенических условиях содержания. Т-2 токсин и афлатоксин В₁ синтезированные с.н.с. Ссргейчевым А.И. и м.н.с. Садыковой В.Н., не отличались по физико-химическим параметрам и токсическим свойствам от существующих стандартных образцов. В качестве продуцента микотоксинов использовали грибы *Fusarium sporotrichiella*, штамм 15м, предоставленный Котиком А.Н., и *Aspergillus flavus* из коллекции ФГНУ ВНИВИ (г.Казань). Введение микотоксинов осуществляли перорально в виде 5%-ого водно-спиртового раствора. Контрольные животные получали эквивалентное количество раствора, без микотоксина. В качестве потенциальных антидотов микотоксинов рассматривались сорбенты: зоокарб, разработанный под руководством д.т.н, профессора Суровкина В.Ф. в научно-техническом учреждении «Конструкторско-технологический институт технического углерода» СО РАН, и любезно предоставленный для экспериментов к.б.н. Пьяновой Л.Г. и д.в.н., профессором Геруновой Л.К.; бентонит Биклянского месторождения Альметьевского района Республики Татарстан; предоставленный к.в.н. Ежковой А.М. (ТатНИИ агрохимии и почвоведения); цеолит Татарско-Шатрашанского месторождения Республики Татарстан, производные меркаптобензотиазола и комплексные кобальтсодержащие соединения, синтезированные под руководством д.х.н., профессора Гареева Р.Д. в лаборатории химического синтеза ФГНУ ВНИВИ (г.Казань); нейролептик аминазин (ФС-48); иммуномодулятор ксимедон, синтезированный в ИОФХ им. А.Е. Арбузова под руководством профессора Резника В.И.; а также препараты фенобарбитал, фенотиазин, кортизона ацетат, димедрол, пирогенал, бензонал. Препараты вводили перорально при помощи шприца и иглы с оливой, болюсов или внутримышечно.

Адсорбционную способность сорбентов определяли по методике, описанной Крюковым В.С. и соавт. (1992). В ряд пробирок с содержанием 5 мл физиологического раствора вносили 50 мкг Т-2 токсина или афлатоксина В₁ (ацетоновый раствор, содержащий микотоксин в концентрации 1мкг/мкл) и исследуемый сорбент от 50 до 400 мг (50, 100, 200, 300, 400мг). Условия эксперимента: экспозиция при постоянном встряхивании от 5 до 120 минут (5, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минут); рН 2,0 и 7,0; температура 20-22°С и 37-39°С. Затем раствор фильтровали, фильтрат, после добавления ацетона (1:3), 15 минут экстрагировали, неадсорбированный микотоксин переэкстрагировали в хлороформ (дважды по 20 мл). Качественное и количественное определение оставшегося афлатоксина В₁ проводили методом тонкослойной хроматографии, Т-2 токсина - методом тонкослойной хроматографии с биоавтографическим завершением, используя культуру *Candida pseudotropicalis* шт. ПК-44м, предоставленную Котиком А.Н., с подтверждением результатов с помощью

хромато-масс-спектрометрического анализа, который осуществляли на хромато-масс-спектрометре «Хитачи - 80м».

В ходе экспериментов изучалось клиническое состояние животных: учитывали общее состояние, реакцию на окружающую обстановку, степень потребления корма и воды, изменение массы тела, температуру, частоту пульса и дыхания, состояние кожного покрова, регистрировали продолжительность жизни. Исследовалась картина периферической крови. После проведения необходимых процедур, определяемых целью и задачами эксперимента, крыс убивали декапитацией. Для взятия проб тканей делали сагиттальный разрез или распил черепа, ткани быстро извлекали, освобождали от крови и перекладывали в чашки Петри, находящиеся на льду. Количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина определяли по общепринятым методикам (Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А., 1974), глюкозы - ортотолуидиновым методом, общий белок - рефрактометрически (Антонов Б.И. и соавт., 1991). Определение белковых фракций в сыворотке крови проводили методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы по унифицированной методике (Меньшиков В.В. и соавт., 1987). Для исследования применяли веронал-ацетатный буфер pH 9. Для окраски электрофореграммы применяли краситель амидо черный. Использовали следующий режим электрофореза: напряжение - 150 В, сила тока - 1 мА на 1 см поперечного сечения полоски, продолжительность - 40 мин. О степени интенсивности процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению вторичных продуктов ПОЛ - малонового диальдегида (МДА), реакция которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) положена в основу метода изучения ПОЛ в биологических системах (Гончаренко М.С., Латина А.М., 1985). Для определения содержания адреналина и норадреналина в тканях в своей работе использовали триоксиндоловый метод в модификации Матлиной Э.Ш., Рахмановой Т.Б. (1967), в модификации Авакяна О.М. (1977). При изучении влияния микотоксинов и эффективности применения лекарственных препаратов на сердечную деятельность, регистрацию биоэлектрических токов сердца проводили во втором стандартном отведении согласно общепринятому методу, на электрокардиографе «Малыш».

Общее внешнее однократное тотальное облучение животных осуществляли на гамма-установке «Пума», источник γ -облучения Cs^{137} , при мощности дозы $3,13 \times 10^5$ Кл/(кг.с), неравномерность поля излучения не превышала 10 %.

Проведено три серии опытов по оценке эффективности сочетания аминазина и зоокарба. На первом этапе при однократном воздействии микотоксинов в дозах ЛД₅₀ на белых крысах оценено лечебное действие в результате применения аминазина (5 мг/кг, в/м) и зоокарба (2 г/кг, перорально) через 1 и 3 ч после заправки токсинами. Во второй серии опытов на овцах, препараты использовали только через 1 ч после поступления микотоксинов в организм животных. На последнем этапе была исследована эффективность применения указанных средств при многократном воздействии микотоксинов н

дозах $1/5 LD_{50}$ и при комбинированном воздействии Т-2 токсина и ионизирующего излучения.

В выполнении отдельных этапов работы принимали участие с.н.с. к.в.п. Сергейчев А.И., с.н.с. к.б.н. Титова В.Ю., с.н.с. к.х.н. Барабанов В.И., с.н.с. Коршунов Р.Л., асп. Семенов Э.И., асп. Кораблев Е.Ю., производственные опыты в условиях хозяйств проводили совместно с с.н.с. Сергейчевым А.И., к.б.н. Нигматуллиным Л.И. и ветврачами сельскохозяйственных предприятий Кукморского района РТ. Обработку цифрового материала проводили методом вариационной статистики с применением критерия достоверности по Стьюденту на персональном компьютере с использованием программы Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Скрининг средств - потенциальных антидотов микотоксинов

При оценке испытанных средств установлено, что введение препарата ШТ-1 (калиевая соль меркаптобензотиазола) и в меньшей степени П-894 (гидрозид малеиновой кислоты) вызывало задержку развития клинических признаков интоксикации Т-2 токсином. Гибель животных была не меньше, чем в контрольной группе. Препараты П-15, П-16, П-17 и П-14 задерживали развитие клинических признаков токсикоза на 1-2 часа, по сравнению с контрольными животными. Стадии возбуждения и угнетения были выражены слабее. Препарат П-14 повышал выживаемость пораженных животных на 10% относительно контрольной группы. Указанные препараты являются комплексными соединениями, содержащими кобальт: П-14 - с N-аллилдизетаноламином, П-15 - метилэтанололамином, П-16 - бензилдизетаноламином, П-17 - с этилендиамином тетракусусной кислоты. Из других химиотерапевтических средств лучший эффект был получен от использования в течение часа после затравки аминазина и кортизона ацетата в сочетании с димедролом. Использование этих средств не только уменьшило проявление клинических признаков отравления, но и значительно повысило выживаемость животных - до 70 и 80 % соответственно. Еще более перспективным в качестве лечебных средств при микотоксикозах оказалось использование адсорбентов: бентонита, цеолита, зоокарба. Их применение значительно оттягивало нарастание клинических признаков токсикоза, выживаемость животных составила от 60 и 100 % при использовании их через час после отравления микотоксином. При более поздних сроках применения этих веществ (3ч) был также отмечен положительный эффект, выразившийся в оттягивании появления признаков отравления и увеличении продолжительности жизни животных на 6-24 ч.

Основываясь на этих данных, для дальнейших исследований мы использовали вещества-сорбенты и аминазин, как средства, показавшие хороший защитный эффект и доступные для применения.

3.2. Сорбционные свойства энтеросорбентов в условиях *in vitro* и *in vivo*

Возможность связывания микотоксинов бентонитом, цеолитом и зоокарбом выявляли *in vitro*. В экспериментах с бентонитом при низкой pH и более высокой температуре количества обнаруживаемого остаточного микотоксина были достаточно велики - 15,8 % - при 400 мг бентонита. При исследовании сорбционной способности в отношении афлатоксина В₁ выявлена схожая тенденция: оптимальные результаты установлены в нейтральной среде и температуре 37-39 °С, при снижении pH результаты ухудшались.

Повышение температуры среды до 37-39 °С способствовало небольшому повышению сорбционной активности цеолита. В экспериментах с афлатоксином В₁ сорбционная способность цеолита при разных его количествах более выражена в кислой среде при температуре близкой к температуре желудочно-кишечного тракта.

Зоокарб при температуре 20-22 °С и pH 7,0 и 2,0 в количестве 50 мг сорбировал только 58,3 и 56,8 % Т-2 токсина соответственно, увеличение температуры до 37-39 °С существенно повышало сорбционную емкость препарата, соответственно до 83,3 и 82,9 % (рис.1).

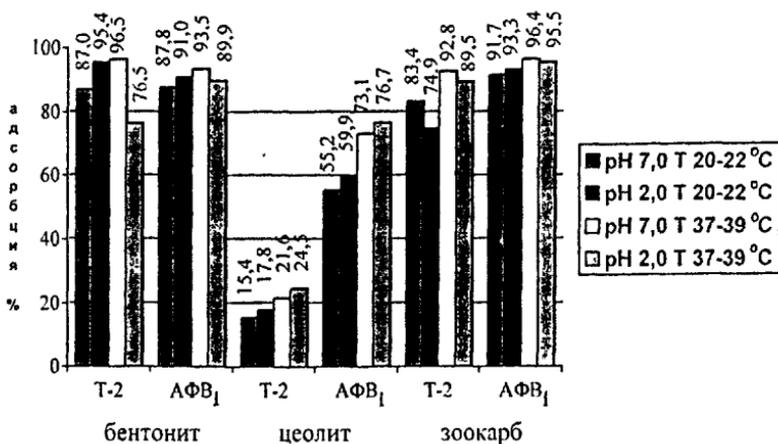


Рис. 1 – Адсорбционная способность сорбентов (200 мг)

При введении в среду афлатоксина В₁ тенденция увеличения адсорбции с возрастанием температуры сохранялась, но с увеличением количества сорбента проявлялась менее заметно. Установлено, что *in vitro* после введения сорбента зоокарб в среду с Т-2 токсином более 2/3 микотоксина адсорбируется в первые 15 мину г. Энтеросорбент углеродный зоокарб, как показавший высокую и наиболее

стабильную сорбционную способность в отношении микотоксинов в различных условиях среды, был использован для дальнейших исследований.

Результаты исследований эффективности углеродного энтеросорбента зоокарба при микотоксикозах на белых крысах представлены в табл. 1.

Таблица 1 - Эффективность применения зоокарба (2000 мг/кг) при острых Т-2- и афлатоксикозах (n=12)

Характер воз- действия	Время до введения сорбента, ч	Сроки наблюдения / Микотоксины									
		Пало								Выжило	
		1 сут		2 сут		3 сут		%		Т-2	АФВ ₁
		Т-2	АФВ ₁	Т-2	АФВ ₁	Т-2	АФВ ₁	Т-2	АФВ ₁		
Мкт+Зоок.	0	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100
Мкт+Зоок.	1	-	-	2	-	-	2	16,7	16,7	83,3	83,3
Мкт+Зоок.	2	3	2	-	-	-	1	25	25	75	75
Мкт+Зоок.	3	2	1	4	2	-	2	50	41,7	50	58,3
Мкт+Зоок.	5	7	6	2	3	-	-	75	75	25	25
Мкт	-	9	9	-	-	-	-	75	75	25	25
5% водно-спирт. р-р	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100

Наиболее характерная клиническая картина Т-2 токсикоза наблюдалась у животных, получавших только токсин или токсин и сорбент через 5 ч (выраженная диарея у всех животных, затрудненное дыхание, волосяной покров грязно-желтого цвета, носовые кровотечения, повреждение слизистой оболочки в углах рта). При вскрытии животных отмечался отек легких, катаральное и катарально-геморагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, многочисленные точечные кровоизлияния в подкожной клетчатке. Степень проявления этих признаков в других группах снижалась по мере уменьшения срока между введением токсина и сорбента. При воздействии афлатоксина В1 гибель животных наступала несколько позднее.

В опытах на свиньях установлено, что использование сорбента в той же дозе через 1 ч после затравки микотоксинами позволило добиться 100 % сохранности животных. В то время как увеличение срока между затравкой микотоксином и введением сорбента до 3 ч подавляло защитное действие последнего. Смертность в этих группах составила 75 % - при затравке Т-2 токсином и 50 % - афлатоксином В1.

3.3. Морфологические и некоторые биохимические показатели крови и тканей животных при однократном воздействии микотоксинов и на фоне применения аминазина и зоокарба

Применение лечебных средств при однократной затравке крыс и овец микотоксинами в дозе ЛД₅₀ способствовало определенной стабилизации изучаемых показателей. При воздействии афлатоксина В₁ количество сердечных сокращений и дыхательных движений у овец увеличивалось сразу после поступления яда. У нелеченных животных через 3 ч после затравки повышение составило 9,8 (P<0,05) и 33,8 % (P<0,01), соответственно. В результате использования аминазина (5 мг/кг, внутримышечно) и зоокарба (2000 мг/кг, перорально) эти изменения были в пределах 2,7 (P>0,05) и 19,3 % (P<0,05). Меньшее защитное действие препаратов на организм проявлялось при отравлении Т-2 токсином и, особенно, совместном действии Т-2 токсина и афлатоксина В₁.

У крыс при однократном введении Т-2 токсина и афлатоксина В₁ (ЛД₅₀) увеличение количества эритроцитов на 24 ч исследований по сравнению с контролем составило 16,3 % (P<0,05). Далее этот показатель уменьшался, но и через 72 ч был выше исходных данных. После использования лечебных средств максимальное увеличение количества эритроцитов в крови также наблюдалось к 24 ч - 4,8 % (P>0,05) у животных, леченных через 1 ч после затравки, и 10,3 % (P<0,05) - у леченных через 3 ч. Уровень содержания лейкоцитов через 6 ч после начала опыта у крыс в результате применения нейролептика и сорбента через 1 ч после поступления микотоксинов увеличился на 6,7 % (P>0,05), при использовании этих средств через 3 ч после интоксикации - на 14,4 % (P<0,05), без лечения - на 20,1 % (P<0,01). Содержание гемоглобина в крови при совместном действии Т-2 токсина и афлатоксина В₁ максимально увеличивалось на 24 ч исследований - на 5,8 % (P>0,05), затем снижалось до уровня ниже первоначального на 3,2 % (P>0,05). Раннее применение лечебных средств сглаживало эти колебания. У овец применение аминазина и зоокарба через 1 ч после введения микотоксинов также способствовало стабилизации гематологических показателей.

Изменения содержания общего белка, глюкозы и белковых фракций у овец и крыс имели схожий характер. Через 3 ч после затравки Т-2 токсином у овец отмечали максимальное увеличение количества общего белка, глюкозы и альбуминов - на 9,2 (P>0,05), 18,9 (P<0,01) и 17,4 % (P<0,01) соответственно. У животных, для лечения которых через 1 ч после затравки использовали аминазин и зоокарб, возрастание этих показателей было в пределах 4,3 (P>0,05), 6,4 (P>0,05) и 2,5 % (P>0,05) соответственно. На 10 сутки эксперимента все эти показатели были ниже исходных; более значительно в группе нелеченных животных. Изменения показателей были более значимыми при совместном отравлении Т-2 токсином и афлатоксином В₁ и менее - при отравлении

афлатоксином В]. Но и в этих случаях, применение лечебных средств способствовало нормализации данных показателей.

О лечебном действии аминазина и зоокарба при микотоксикозах свидетельствуют и данные характера изменения процессов ПОЛ. Содержание МДЛ у крыс при сочетании воздействия Т-2 токсина и афлатоксина В] в дозах ЛД₅₀ наиболее существенно изменялось через 1 и 3 ч наблюдения в плазме крови, когда его количество было в 5,7 и 7,6 раза ($P < 0,001$) больше исходных значений. У леченных животных превышение составило 1,3 и 1,4 раза ($P < 0,01$). Несколько меньше изменилось содержание МДА в эритроцитах. При сочетанном введении микотоксинов в эти же сроки его количество увеличилось в 2,1 и 1,6 ($P < 0,001$) раза по сравнению с первоначальной величиной. У животных после лечения содержание МДА достоверно не отличалось от исходных данных. Действие препаратов, проявляющееся в изменении процесса ПОЛ, на овцах было выражено несколько слабее.

Не менее четко об эффекте от использования лечебных средств свидетельствуют результаты изменения содержания катехоламинов в тканях, по которым судили о состоянии симпат-адреналовой системы организма. При воздействии афлитоксина В] эти вариации были наименее значимыми. Динамика изменения содержания адреналина и норадреналина при сочетанном микотоксикозе была более близка к Т-2 токсикозу, нежели к афлатоксикозу. Через 3 ч после одновременного поступления в организм крыс двух микотоксинов количество норадреналина в тканях среднего мозга и легких снижалось до следовых количеств, а в тканях сердца и надпочечников - в 41,7 и 14,9 раза ($P < 0,001$). В это же время у леченных животных это уменьшение было менее выраженным. У крыс, которых лечили через 3 ч после введения микотоксинов, содержание норадреналина в сердце было в 13,4 ($P < 0,001$) раза ниже исходного уровня; у леченных через 1 ч - только в 1,3 раза ($P < 0,01$). Через 6 ч после интоксикации количество биогенных аминов в тканях резко увеличивалось, особенно адреналина в среднем мозге и легких, где его концентрация превышала фоновые в 6,9 и 0,4 раза соответственно ($P < 0,001$). У животных леченных через 1 ч после затравки содержание адреналина в тканях этих органов отличалось от фоновых на 8,5-25 % ($P < 0,05$ - $P < 0,01$).

3.4. Морфологические и некоторые биохимические показатели крови и тканей животных при многократном воздействии микотоксинов и на фоне применения аминазина и зоокарба

У овец при многократном введении токсинов в дозе 1/5 ЛД₅₀ максимальные изменения исследованных параметров установили к 4-5 введению микотоксинов - к моменту нарастания клинических признаков более специфичных для микотоксикозов. Признаки отравления у животных после совместного введения Т-2 токсина и афлатоксина В] были более характерными для Т-2 токсикоза

Наблюдалось снижение аппетита, угнетение. К 5 сушам за фанки отмечали нарушение функций желудочно-кишечного тракта в форме диареи, тремор отдельных мышц конечностей, некоторое понижение тактильной и болевой чувствительности. У животных этих групп установили наибольшее снижение частоты пульса и дыхания. У животных, получавших афлауксин В], Эти показатели снижались менее заметно. Частота пульса и дыхания после 5-кратного введения микотоксина уменьшалась на 4,3 и 3,8 % ($P>0,05$) соответственно. Клинически заболевание проявлялось вялостью, отсутствием аппетита, нарушением функций желудочно-кишечного тракта. После 4-5 введения микотоксина у двух овец регистрировали нарушения координации движений, у одной из них отмечали судорожные движения задних конечностей.

Через 24 ч после применения лечебных средств количество сердечных сокращений и дыхательных движений восстанавливалось. Но лишь к 5 суткам их величина приближалась к исходной.

Количества эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов у животных также претерпевали наибольшие изменения в результате совместного воздействия обоих микотоксинов. Снижение этих показателей после 5-кратного воздействия микотоксинов относительно исходных величин составило 10,3; 8,5 и 8,5 % ($P<0,05$) соответственно. У этих животных отмечали самое длительное восстановление показателей.

После 5-кратного введения микотоксинов снижение уровня общего белка) овец, получавших Т-2 токсин, составило 14,0 % ($P<0,05$), а у получавших афлатоксин Вi — 9,0 % ($P<0,05$), соответственно. Через 24 ч после использования лечебных средств содержание общего белка у этих же животных повышалось на 7,6 и 6,1 % относительно предыдущих суток, но по-прежнему было ниже исходного значения. Из белковых фракций после затравок микотоксинами резко снижалось количество альбуминов. Проведение лечебных мероприятий повышало их уровень и через 5 суток он приближался к фоновому). Использование лечебных средств практически остановило снижение \уровня у-глобулинов особенно у животных, получавших микотоксин Т-2 отдельно, ил» совместно с афлатоксином В]. Через 24 часа после лечения у животных, получавших оба микотоксина, уровень у-глобулинов был ниже фонового на 19,0 % ($P<0,01$).

Снижение количества глюкозы после введения Т-2 токсина, афлатоксина В] и двух микотоксинов совместно составило у нелеченных овец, соответственно, 8,9 ($P<0,05$); 7,0 и 10,8 % ($P<0,05$). К окончанию опыта содержание ее отличалось от исходного на 1,1-1,7 % ($P>0,05$).

О лечебном действии препаратов после многократной интоксикации микотоксинами свидетельствуют изменения уровня МДА. Содержание МДА \ овец после 5-кратного введения Т-2 токсина увеличивалось в плазме на 65,8 ($P<0,01$), в эритроцитах на 11,8 % ($P<0,05$). Спустя 24 ч после лечения

концентрация отличалась от фонового в плазме на 27,9 ($P < 0,01$), в эритроцитах - на 8,8% ($P > 0,05$).

3.5. ЭКГ овец при воздействии микотоксинов и на фоне применения аминазина и зоокарба

При однократном воздействии Т-2 токсина и афлатоксина В₁ в дозах ЛД₅₀ отмечена тенденция к увеличению зубцов ЭКГ. У животных, леченных через 1 ч после затравки микотоксинами, эти изменения выражены несколько слабее. В ходе экспериментов у животных после введения афлатоксина В₁ установлено максимальное возрастание вольтажа зубцов Р, R, S и Т на 6 ч и зубца Q на 3 ч исследований на 11,9-37,3 % ($P < 0,05$ - $P < 0,001$) выше исходных значений. У леченных животных наибольший подъем вольтажа этих зубцов зарегистрирован на 6 ч исследований соответственно на 10,1-26,3 % ($P < 0,05$ - $P < 0,01$). В ЭКГ этих животных реже регистрировались качественные изменения зубцов и интервалов: смещение сегмента ST на 3 ч эксперимента у леченных и нелеченных овец составило 10 и 2 % сердечных циклов.

Ежедневная 5-кратная интоксикация овец микотоксинами в дозах 1/5 ЛД₅₀ значительно отразилась на деятельности сердечной мышцы, что отобразилось в данных ЭКГ этих животных. В результате воздействия Т-2 токсина вольтаж всех зубцов уменьшился на 18,9-30,0 % ($P < 0,01$), в 10 % сердечных циклов регистрировали расщепление и зазубренность зубца Р, в 15 % - инверсию зубца Т. Продолжительность интервалов, наоборот, увеличилась - на 5,7-31,6 % ($P > 0,05$ - $P < 0,01$). Смещение сегмента ST от изоэлектрической линии наблюдалось после 5-кратной затравки Т-2 токсином в 20 % сердечных циклов, через сутки после лечения - уже в 15 %, через 5 суток - в 10 % циклов.

Использование лечебных средств способствовало некоторому восстановлению и других показателей в сторону исходных величин. Через 24 ч после лечения вольтаж зубца Р был ниже фоновых - на 14,2 % ($P < 0,05$), Q - на 10,2 % ($P < 0,05$), R - на 5,5 % ($P > 0,05$), S - на 11,2 % ($P < 0,05$). Зазубренность и расщепление зубца Р встречались в 2 и 5 % сердечных циклов. А через 5 суток после лечения не фиксировались вовсе. Инверсию зубца Т через 1 и 5 суток после лечения регистрировали в 5 и 2 % сердечных циклов, соответственно. Продолжительность интервалов PQ, QRS и QRST за 24 ч нормализовалась на 4,5; 12,3 и 8,4 % соответственно, но и через 5 суток после начала лечения длительность их была больше исходных на 11,8; 8,5 и 9,4 % ($P < 0,05$) соответственно.

Изменения элементов ЭКГ при совместной интоксикации Т-2 токсином и афлатоксином В₁ и использовании лечебных средств были близки к таковым при затравке только Т-2 токсином в леченных группах, часто более существенны.

Данные электрокардиографических и других исследований указывают, что использование энтеросорбента зоокарба и нейролептика аминазина в течение

часа после затравки микотоксинами способствует меньшему на космическому влиянию последних и более быстрому восстановлению организма животных после их воздействия. Однако защитно-лечебное действие в результате применения этих лечебных средств как при однократном, так и многократном совместном воздействии Т-2 токсина и афлатоксина В] было меньшим, чем при воздействии этих микотоксинов раздельно.

3.6. Разработка схемы лечения животных при микотоксикозах животных и ее апробация

Основываясь на результатах проведенных исследований по оценке эффективности лечебных средств при микотоксикозах, учитывая литературные данные по этому вопросу и патогенезу отравлений микотоксинами, а также используя результаты работы коллектива лаборатории, нами разработана схема лечения животных при микотоксикозах, которая выглядит следующим образом

Проводя исследования по уточнению диагноза, всех больных и подозреваемых в отравлении животных отделяют от остального поголовья, исключают из рациона пораженные микотоксинами корма, животных ставят на голодную диету. Далее, с учетом клинических признаков, степени отравления и механизма действия соответствующего микотоксина приступают к лечению, используя мероприятия из следующей схемы:

- 1) Промывание желудка 3 % раствором натрия гидрокарбоната и использование солевых слабительных: магния и натрия сульфат внутрь: лошадям в дозе 300-500 г, крупному рогатому скоту - 400-800 г, овцам - 50-100 г, свиньям - 25-50 г.
- 2) Обильное кровопускание с последующим внутривенным введением 40 %-ого раствора глюкозы. Крупному рогатому скоту - 400-1000 мл, мелкому рогатому скоту и свиньям - 200-500 мл.
- 3) Внутривенное введение 10% раствора кальция хлорида из расчета 20-40 мл для крупного рогатого скота, 5-10 мл овцам и свиньям.
- 4) Подкожное введение кофеина бензоата натрия - 2-5 крупному рогатому скоту и 1-2 мл овцам и свиньям.
- 5) Пероральное введение белой глины в виде взвеси в трехкратном объеме воды, активированного угля или зоокарба. Дозы белой глины - от 50 до 100 г крупному рогатому скоту, 2-10 г овцам, 5-15 г свиньям. Белую глину предварительно в течение 1,5 ч прогревают при температуре 160 °С, затем охлаждают до температуры тела. Дозы угля и зоокарба - до 2 г/кг.
- 6) Внутримышечное введение нейролептика аминазина - 5 мг/кг массы животного.
- 7) Внутримышечное применение кортизона ацетата (125 мг/кг) и димедрола (10-15 мг/кг).
- 8) Внутривенное вливание гемодеза в течение 1-10 сут. - до 800 мл/сут на голову.
- 9) Пероральное использование витамина К (викасол) - в дозе 0,1-0,3 г лошадям и крупному рогатому скоту, мелкому рогатому скоту - 0,05-0,07 г, свиньям - 0,02-0,05 г.
- 10) Перорально - пробиотик энтероспорин — в дозе для молодняка - 3-15 мл/сут на голову.

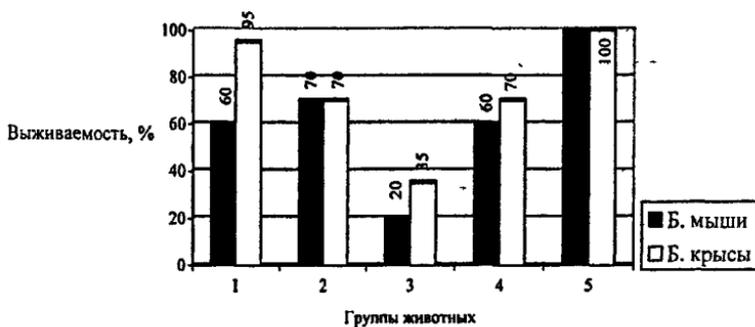
Выбор элементов схемы, используемых **в каждом конкретном случае** отравления микотоксинами, определяется **этиологией интоксикации**,

клиническими признаками и тяжестью отравления, видом животных, возможностью использования того или иного препарата. Допускается замена препаратов на более доступные или эффективные, в соответствии с показаниями по их применению.

Предлагаемая нами схема, выбор составных элементов которой был определен этиологическим фактором и клиническими признаками заболевания, нашла свое положительное подтверждение в производственных условиях (в СХП «Игенче» и агрофирме «НУР» Кукморского района РТ.).

3.7. Возможность использования элементов схемы для лечения животных при комбинированном поражении ионизирующим излучением и микотоксинами

Результаты экспериментов по использованию аминазина и зоокарба при комбинированном поражении ионизирующим излучением и микотоксинами представлена на рис. 2.



1 - облучение (6,0 Гр)

2- 5-кратно Т-2 токсин (1/5 Д&о)

3 - 5-кратно Т-2 токсин (1/5 ЛД50) + облучение (6,0 Гр)

4 - 5-кратно Т-2 токсин (1/5 ЛД50) + облучение (6,0 Гр) + аминазин (5 мг/кг, через 1 ч) + зоокарб (1000мг/кг, через 1 ч)

5 - Биологический контроль

Рис. 2. Выживаемость лабораторных животных при комбинированном поражении Т-2 токсином и гамма-излучением на фоне применения лечебных средств

Установлено, что гибель животных в третьей группе наступает раньше, чем \ леченных животных и составляет, соответственно, при облучении и затравке Г-

2 юксином у мышей - 6,75 суток, при 8,2 суток у леченных, у крыс - 10,6 суток, у леченных - 13,1сутки.

ВЫВОДЫ

1. В результате целенаправленного скрининга потенциальных антидотов микотоксина Т-2 отобраны сорбенты зоокарб, цеолит, бентонит, нейрелептик аминазин и сочетание антигистаминного препарата димедрол с кортизон ацетатом, которые обеспечили 60-100 % сохранность животных, уменьшили признаки интоксикации при использовании их через 1-3 ч после экспериментальной затравки

2. Экспериментально *in vitro* и *in vivo* обосновано использование сорбентов при микотоксикозах. Установлено, что в условиях кислой и нейтральной pH и температуры близкой к температуре желудочно-кишечного тракта углеродный энтеросорбент зоокарб обладает выраженными сорбционными свойствами в отношении Т-2 токсина и афлатоксина В|

3. Раздельное и совместное однократное и многократное воздействия Т-2 токсина и афлатоксина В| сопровождаются изменениями клинических, гематологических и некоторых биохимических показателей крови и деятельности сердечной мышцы. Наиболее выражено при острой совместной интоксикации у овец возрастает уровень глюкозы и альбуминов в крови - на 24,7 и 24,1 % ($P < 0,01$) соответственно, меньше - количество эритроцитов и лейкоцитов - на 15,0 и 16,4 % ($P < 0,05$). Многократное поступление микотоксинов в дозе 1/5 ЛД₅₀ у животных характеризуется лейкопенией, на ЭКГ - уменьшением вольтажа зубцов на 20,7-25 % ($P < 0,05$ - $P < 0,01$), изменениями формы зубцов и сегментов.

4. Экспериментально доказана эффективность применения энтеросорбента углеродного зоокарба и нейрелептика аминазина при раздельном и совместном воздействии Т-2 токсина и афлатоксина В| в остром и подостром эксперименте на лабораторных (белые крысы) и сельскохозяйственных (овцы) животных. Положительные тенденции при использовании аминазина (5 мг/кг, в/м) и зоокарба (1-2 г/кг, перорально) выявлены в динамике изменений показателей морфологического состава крови, состояния симпато-адреналовой системы, процесса перекисного окисления липидов и электрокардиографических показателей.

5. Разработана схема лечения животных при микотоксикозах, включающая использование мероприятий и средств, направленных на ускорение деградации, выведение токсинов, на поддержание жизнедеятельности организма, усиление и активацию его защитных сил, обеспечивающая сохранность большинства животных. Выбор конкретных элементов схемы зависит от характера и тяжести отравления, вида животных.

6. Использование аминазина и зоокарба при комбинированном поражении лабораторных животных (белые мыши и белые, крысы) ионизирующим

излучением и Т-2 токсином способствует повышению их выживаемости (на 50-67 %), увеличению продолжительности жизни павших животных (на 1,5-2,5 сут) и уменьшению тяжести клинических признаков у пораженных животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Сочетание нейролептика аминазина и углеродного энтеросорбента зоокарб может быть использовано для лечения животных как при раздельном, так и при совместном поступлении в организм Т-2 токсина и афлатоксина В].

2. Мероприятия, составляющие схему лечения животных при микотоксикозах, рекомендуется применять с учетом этиологии заболевания, клинических признаков, сроков и степени тяжести отравления.

3. Результаты исследований использованы при составлении нормативно-технических документов, утвержденных директором ФГНУ ВНИВИ - «Методические указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов» (19.11.2003), начальником ГУВ КМ РТ - «Методические рекомендации по борьбе с микотоксикозами животных в Республике Татарстан» (18.11.2002), руководителем управления реализации целевых программ в животноводстве МСХ и продовольствия Самарской области - «Методические рекомендации по борьбе с микотоксикозами животных в Самарской области» (1.03.2004).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ахметов Ф.Г., Никонов С.В., Петрова Н.В. и др. Применение БВМД и цеолитов для профилактики микотоксикозов животных // Материалы международной научно-практической конференции «Новые энтеросорбенты и фармакологически активные вещества и их применение в ветеринарии и животноводстве», посвященной 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ, д-ра вет. наук, профессора М.И. Рабиновича 26-27 июня, 2002 г. - Троицк, 2002. - С.11-13.

2. Зинатуллин Р.Р., Воробьева А.Н., Никонов С.В. и др. Влияние сочетанного Т-2 и афлатоксикоза на состояние симпато-адреналовой системы // Материалы международной научно-практической конференции «Новые энтеросорбенты и фармакологически активные вещества и их применение в ветеринарии и животноводстве», посвященной 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ, д-ра вет. наук, профессора М.И. Рабиновича 26-27 июня, 2002 г. - Троицк, 2002.-С.37-38.

3. Тремасов М.Я., Равилов А.З., Титова В.Ю., Сергейчев А.И., Нигматуллин А.И., Петрова Н.В., Никонов С.В., Воробьева А.Н. Пробиотик для профилактики и лечения диареи молодняка животных незаразной этиологии // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы

болезней молодняка в современных условиях» 23-25 сентября 2002 г. - Воронеж, 2002. - С.597-599.

4. Петрова Н.В., Сергейчев А.И., Никонов С.В. Результаты производственного испытания пробиотика энтероспорина // Материалы международной научно-производственной конференции по актуальным проблемам Агропромышленного комплекса. - Казань, 2003. - Ч. 1. - С. 100-101.

5. Петрова Н.В., Никонов С.В., Нигматуллин А.И. и др. О результатах апробации пробиотика «ЭНТЕРОСПОРИН» // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной с.х. академии 25-26 сентября 2003 г. - Ульяновск, 2003. - Т.2. - С.140-141.

6. Никонов С.В., Сергейчев А.И., Петрова Н.В. и др. О повышении устойчивости животных к микотоксинам // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной с.х. академии 25-26 сентября 2003 г. - Ульяновск, 2003. - Т.1. - С.116-117.

7. Петрова Н.В., Сергейчев А.И., Титова В.Ю., Никонов С.В. и др. Пробиотик для профилактики и лечения диареи поросят // Материалы международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» 30-31 октября 2003 г. Актуальные проблемы инфекционной патологии животных. - Владимир, 2003. С97-100.

8. Тремасов М.Л., Никонов С.В., Павлов В.П. и др. Проблемы ветеринарной микотоксикологии // Материалы международной научно-практической конференции «Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». - Чебоксары. - 2004. - С.380-383.

9. Семенов Э.И., Никонов С.В., Ежкова А.М. Фармако-токсикологическая характеристика бентонитов Альметьевского месторождения // Материалы Всероссийской научно-практической конференции по актуальным проблемам Агропромышленного комплекса. - Казань. - 2004. - С. 157-159.

Ю.Никонов С.В., Семенов Э.И., Пьянова Л.Г., Герунова Л.К. Сорбционная активность сорбента Н-1 и бентонита в отношении Т-2 токсина // Материалы международной научно-производственной конференции по актуальным проблемам Агропромышленного комплекса. - Казань. - 2004. - С. 149-151.

П.Никонов С.В. Лечение животных при микотоксикозах // Ученые записки КГАВМ-Т.178.-2004.-С99-103.

12. Никонов С.В., Сергейчев А.И., Тремасов М.Я. Поиск лечебных препаратов при микотоксикозах животных // Сборник научных трудов «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии» - Т.116. - М., 2004. - С.301-304.

~~№ 25014~~

№ 25338

Подписано в печать 22.11.04. Заказ №.49. Формат 60x84 1/16. Усл.п.л. 1,25.
Тираж 100 экз. Отпечатано на офсетном участке ФГНУ ВНИВИ (г.Казань).
Адрес: 420075, г.Казань, Научный городок-2.