

На правах рукописи

ВОСТРИКОВ
Евгений Юрьевич



**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ
ЦИТКОРА И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ
ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Троицк-2005

Работа выполнена в институте ветеринарной медицины Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор
Герунова Людмила Карповна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,
профессор
Ермолин Александр Васильевич

кандидат биологических наук,
доцент
Валова Людмила Владимировна

Ведущая организация: **Оренбургский государственный аграрный университет**

Защита диссертации состоится «3» марта 2005г.
в «10» часов на заседании диссертационного совета Д 220.066.01
при ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной меди-
цины» (457100, г. Троицк Челябинской области, ул. Гагарина, 13, тел.
2-53-84,2-64-75).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО
«Уральская государственная академия ветеринарной медицины»

Автореферат разослан «17» января 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Прокофьева Т.В.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность **темы**. Быстрый рост народонаселения в мире, необходимость удовлетворения его потребностей в сельскохозяйственной продукции при ограниченных земельных ресурсах требуют разработки технологий, обеспечивающих соответствующий опережающий рост продуктивности каждого гектара сельскохозяйственных угодий. В связи с этим использование пестицидов рассматривается как важнейшее направление предотвращения потерь сельскохозяйственной продукции, величина которых в мировом земледелии превышает треть от общего урожая (В.В. Екимов, Н.А. Воробьева, М.Р. Флейшер, 1999).

Вряд ли в обозримом будущем защита растений станет возможной без применения пестицидов, так как пока нет эффективных и доступных альтернативных средств борьбы с вредителями, возбудителями болезней растений и сорняками.

Потенциальную опасность пиретроидов специалисты часто недооценивают. Преобладает мнение, что это малотоксичные и быстроразлагающиеся в объектах окружающей среды, организме животных и человека соединения. Между тем при современной технологии химической защиты растений лишь 10 - 30 % расходного количества пестицидных препаратов оседает на растениях, большая же часть мигрирует по цепям питания, вызывая нежелательные эффекты (Е.А. Аблова, 1981; М.И. Лунев, 1992).

В связи с этим особенно актуальной становится проблема пестицидных токсикозов, для успешного решения которой необходимы конкретные сведения о токсичности всех поступающих на рынок пестицидных препаратов, экспериментальное обоснование регламентов их применения, разработка доступных и надежных методов определения остаточных количеств всех используемых пестицидов в объектах окружающей среды, организме животных и человека (Ю.С. Каган, Л.М. Овсянникова, 1990; D.J. Humphreys, 1980; P.G.Blain, 1990 и др.).

В связи с вышеизложенным были определены цель и задачи исследований.

Цель работы - экспериментально обосновать токсичность синтетического пиретроида циткора и целесообразность применения энтеросорбентов при отравлении животных.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- Установить параметры токсичности циткора для крыс.
- Изучить клинические и патоморфологические изменения в организме животных при отравлении.
- Обосновать гематотоксические эффекты и состояние системы антиоксидантной защиты при естественном накоплении остатков циткора в орга-

низме животных и хронической интоксикации в условиях эксперимента.

- Изучить накопление остаточных количеств циткора в органах и тканях животных,
- Установить степень риска мутагенных эффектов.
- Испытать эффективность энтеросорбции при отравлении циткором.

Научная новизна. В результате экспериментальных исследований установлены клинические и патоморфологические признаки острого и хронического отравления циткором. Изучены особенности накопления остаточных количеств пестицида в органах и тканях животных.

Доказана идентичность хроматографических характеристик метаболитов циткора и других синтетических пиретроидов.

Генотоксичность для дрозофил не установлена, но доказано негативное влияние препарата на плодовитость насекомых в испытанных дозах.

Экспериментально обосновано влияние циткора на процессы свободнорадикального окисления и состояние системы антиперекисной защиты в организме. Доказана целесообразность использования энтеросорбентов при отравлении циткором.

Практическая ценность. Материалы исследований представляют определенную ценность для разработки гигиенических регламентов применения циткора. Установленные особенности клинического течения, картины вскрытия, морфологические и биохимические изменения крови могут быть использованы в дифференциальной диагностике отравлений. Материалы исследований по определению терапевтической эффективности энтеросорбции использованы при составлении заключительного отчета о результатах широких производственных испытаний зоокарба и разработке наставления по применению препарата, представленных в ВГНКИ (г. Москва) для рассмотрения. Отдельные фрагменты исследований вошли в методические рекомендации «Дифференциальная диагностика лейкоза крупного рогатого скота и хронической интоксикации пестицидами», рассмотренные и одобренные секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области (протокол №6 от 11. 11.2004 г.). Результаты исследований внедрены в учебный процесс на кафедре внутренних незаразных болезней, фармакологии и токсикологии института ветеринарной медицины ОмГАУ.

На защиту выносятся следующие положения:

- Синтетический пиретроид циткор является среднетоксичным соединением с выраженным нейротропным и гематотоксическим действием на фоне интенсификации процессов перекисного окисления липидов.
- В органах и тканях животных циткор образует до 8 метаболитов, преимущественно накапливаясь в желудочно-кишечном тракте, легких, почках, печени и волосяном покрове.

- При введении циткора в корм трансгетерозиготных личинок *Drosophila melanogaster* генотоксичность не установлена.
- При отравлении животных циткором показана эфферентная терапия с применением энтеросорбентов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на научно-практических конференциях Омского государственного аграрного университета в 2002 и 2004 г.г., научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины домашних животных» (Екатеринбург, 2001), VI научно-практической конференции «Перспективные направления научных исследований молодых ученых и специалистов Урала и Сибири» (Троицк, 2002), Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора С.Н. Никольского «Актуальные проблемы инвазионной, инфекционной и незаразной патологии животных» (Ставрополь, 2003), II Международной межвузовской конференции аспирантов и соискателей «Предпосылки и эксперимент в науке» (Санкт-Петербург, 2004), Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных» (Воронеж, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 134 страницах компьютерного набора и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации. Диссертация иллюстрирована 17 таблицами, 27 рисунками, в том числе 15 фотографиями. Список литературы включает 174 работы, в том числе 100 отечественных и 74 зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследований

Тема диссертации является разделом плановой научно-исследовательской работы кафедры фармакологии и токсикологии института ветеринарной медицины Омского государственного аграрного университета «Фармакотоксикологическая оценка новых лекарственных средств и пестицидов», имеющей номер государственной регистрации №01.2.00103080.

Экспериментальная работа выполнена в лаборатории кафедры фармакологии и токсикологии ИВМ ОмГАУ и учхозе № 1 ОмГАУ. Исследование генотоксичности циткора проведено в институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) при консультативной помощи кандидата биологических наук Людмилы Павловны Захаренко. Экспериментальные исследова-

ния проведены в период с ноября 2001 по март 2004 года.

В опытах использовали 25 % - ный эмульгирующий концентрат циперметрина, торговое название - «Циткор» (производитель - ЗАО фирма «Август», ОАО «Вурнарский завод смесевых препаратов», Россия).

Исследования проведены на мухах *Drosophila melanogaster*, 124 лабораторных беспородных крысах, 22 беспородных щенках и 20 коровах черно-пестрой породы.

Крыс содержали в специальном помещении кафедры, кормление осуществляли согласно нормам рациона для лабораторных животных (Г.Е. Батрак, А.М. Кудрин, 1979). Собак содержали на пищевых отходах. Коровы получали стандартный рацион в условиях хозяйства.

За подопытными животными вели постоянное наблюдение, а за 2 недели до начала каждого опыта проводили клиническое обследование по общепринятой схеме: отмечали общее состояние (аппетит, подвижность, цвет видимых слизистых оболочек), определяли массу тела. В опыт брали только клинически здоровых животных.

Для оценки мутагенности циткора использовали метод соматических мозаиков на клетках крыла *Drosophila melanogaster*.

В ходе эксперимента по установлению токсических и летальных доз циткора отмечали степень проявления клинических признаков интоксикации в зависимости от дозы, а также время наступления гибели или исчезновения симптомов отравления. LD₅₀ определяли методом наименьших квадратов (Л.К. Герунова, Л.З. Шрайбер, 1999).

Исследование крови проводили до начала и по окончании опытов. Количество эритроцитов, лейкоцитов и лейкограмму устанавливали общепринятыми методами. Определение глутатиона в эритроцитарной массе крови проводили в реакции с динитробензолом (J. Sedlar, R.M. Lindsey, 1968), малонового диальдегида - по методу И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили (1977). Измерение иницированной перекисью водорода хемилюминесценции сыворотки крови проводили при помощи биохемилуминометра БХЛ - 06М.

Определение остаточных количеств циткора в органах и тканях животных проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок «Силуфол - УФ 254».

Изучение патоморфологической картины у павших и убитых в ходе опытов животных проводили при консультативной помощи профессора кафедры патологической анатомии, вскрытия и судебной экспертизы института ветеринарной медицины ОмГАУ В.И. Герунова.

Статистическую обработку материала проводили на персональном компьютере с использованием табличного процессора Microsoft Excel (М. Додж и др., 1997).

2.2. Клиническая картина и патоморфологические изменения у животных при отравлении циткором

Опыты по определению LD_{50} циткора для крыс были проведены по классической методике. Расчетное значение LD_{50} циткора $291,16 \pm 8,02$ мг/кг. Следовательно, циткор является веществом средней токсичности.

Клиническая картина острого отравления характеризовалась признаками поражения центральной нервной системы. При введении циткора в дозах, равных 100 и 200 мг/кг, состояние животных было угнетенным. Через 30 - 40 минут после введения препарата угнетение сменялось возбуждением. При этом отмечали блуждание крыс по клетке, беспокойство, почесывание мордочки. Передвигаясь по клетке, крысы натывались на различные предметы.

При увеличении дозы отмечали запрокидывание головы и обильное слюнотечение. Передвигаясь, крысы высоко поднимали передние конечности. Приступы возбуждения сменялись угнетением, в последующем развивались судорожные явления. По истечении 2 - 3-х суток у животных появился аппетит, крысы начали принимать небольшое количество корма и воды.

Животные неестественно реагировали на внешние раздражители, вздрагивали, у некоторых начинались приступы судорог, которые через несколько секунд проходили. В последующие дни клинические признаки интоксикации исчезли и видимых различий между опытными и контрольными животными не отмечали. Гибель животных наступала при интоксикации циткором в дозах 250 - 350 мг/кг в первые двое суток после отравления.

При вскрытии павших животных отмечали резкий специфический запах, исходящий от внутренних органов. Кишечник и желудок были вздуты. В толстом и тонком кишечнике кровоизлияния. Желудок наполнен пенным содержимым. Легкие гиперемированы, с поверхности разреза стекает пенная жидкость. Печень увеличена, темно-вишневого цвета, с точечными кровоизлияниями. Почки темно-коричневого цвета, дряблые. Головной мозг отекает и гиперемирован. Сосуды брюшины, оболочек головного мозга, органов брюшной и грудной полостей кровенаполнены. Селезенка увеличена, темно-вишневого цвета.

При вскрытии животных, перенесших интоксикацию, резкого запаха от внутренних органов не отмечено. В кишечнике и желудке крыс, получавших циткор в дозе 50 и 100 мг/кг, обнаружены признаки воспаления. Печень неравномерно окрашена, почки темно-коричневого цвета, граница между корковым и мозговым веществом сглажена. Легкие неспавшиеся, с участками красного и бледно-розового цвета. Селезенка темно-вишневого цвета.

Сердце увеличено, верхушка его закруглена, коронарные сосуды наполнены кровью.

У крыс, получавших циткор в дозах 200 и 300 мг/кг, наблюдали накопление жира в брюшной полости- Жир серо-желтого цвета, вязкой консистенции. Выражено расширение сердца. Почки немного увеличены, почечная капсула напряжена, вокруг почек - отложение жира. Печень темно-вишневого цвета. Селезенка слегка увеличена, темно-коричневого цвета. Легкие светло-розовые, с участками красного цвета, имеются точечные кровоизлияния.

В отдаленном периоде после острого отравления, а также при хронической интоксикации циткором у крыс отмечали развитие некротических изменений в печени, гнойную пневмонию и увеличение регионарных лимфатических узлов.

2.3. Испытание терапевтической эффективности зоокарба при острой интоксикации циткором

Исследования были проведены на 9 беспородных щенках в возрасте 1 месяца. Циткор вводили животным через зонд в дозе 20 мг/кг массы тела. Через 30 минут после затравки внутрь вводили углеродный энтеросорбент зоокарб.

Щенки первой контрольной группы затравке не подвергались, вторая контрольная группа не подвергалась лечению зоокарбом после введения циткора.

У животных, которым на фоне интоксикации вводили зоокарб, клинические признаки проявлялись с запозданием и носили менее выраженный характер. Препарат купировал признаки угнетения. Щенки, получавшие энтеросорбент, пытались выбраться из клетки, периодически ложились и вставали.

Через 2,5 часа после затравки собаки, получавшие зоокарб, стали подходить к кормушке и поилке. У этих собак отмечалась активизация клеточного иммунитета, о чем свидетельствовало более выраженное повышение концентрации лейкоцитов в периферической крови через 3 часа после отравления. Количество эритроцитов осталось без изменения у животных всех групп. Объем живота у щенков опытной группы был значительно меньше, чем во второй контрольной группе.

За состоянием животных наблюдали в течение 3-х часов. По истечении указанного срока брали кровь для биохимических исследований, затем проводили убой и патоморфологическое исследование. Картина крови по истечении 3-х часов после затравки и введения зоокарба представлена в таблице 1.

Результаты исследования сыворотки крови свидетельствуют о том, что острая интоксикация циткором вызывает статистически достоверное снижение концентрации гамма-глобулинов и повышение уровня альфа-глобулинов. Другие биохимические показатели не являются информативными, хотя отмечается тенденция к снижению содержания витаминов А и С.

Таблица 1. Картина крови у щенков при остром отравлении циткором и фармакокоррекции зоокарбом, $n = 3$

Показатели	До затравки	После затравки:	
		при использовании зоокарба	без лечения
Общий белок, г/л	$51,77 \pm 1,09$	$48,73 \pm 1,46$	$47,57 \pm 3,53$
Белковые фракции, %:			
Альбумины	$55,27 \pm 0,6$	$55,7 \pm 0,12$	$56,63 \pm 0,78$
Альфа-глобулины	$15,5 \pm 0,6$	$24,05 \pm 0,6^*$	$23,23 \pm 1,16^*$
Бета-глобулины	$14,53 \pm 0,4$	$15,4 \pm 0,5$	$11,21 \pm 1,68$
Гамма-глобулины	$14,7 \pm 0,16$	$4,87 \pm 0,5^{**}$	$8,93 \pm 0,08$
Общий кальций, ммоль/л	$2,9 \pm 0,2$	$2,67 \pm 0,14$	$2,67 \pm 0,18$
Фосфор неорг., ммоль/л	$1,97 \pm 0,12$	$1,67 \pm 0,07^*$	$1,9 \pm 0,6$
Общий билирубин, мкмоль/л	$12,53 \pm 0,36$	$10,87 \pm 0,16^{**}$	$12,57 \pm 3,4$
Вит. А, мг%	$133,5 \pm 3,52$	$121,8 \pm 12,9$	$126,7 \pm 5,25$
Вит. С, мг%	$1,53 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,09$	$1,33 \pm 0,12$
Щелочной резерв, об % CO_2	$54,3 \pm 1,0$	$54,5 \pm 1,0$	$48,8 \pm 0,62$

Примечание: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$.

На фоне действия зоокарба отмеченные в картине крови изменения выражены еще более ярко, к тому же статистически достоверно снижается содержание неорганического фосфора и общего билирубина. Однако клинический статус животных свидетельствует о целесообразности энтеросорбции.

2.4. Картина крови у крыс при хронической интоксикации и энтеросорбции

Для проведения опыта было сформировано 3 группы крыс по 5 голов в каждой. Всем животным в течение 10 дней при помощи микропипетки вводили циткор в дозе 0,2 мг/кг массы тела. Крысам первой и второй групп в течение этого срока с кормом задавали полисорб ВП и смекту в дозах по 0,2 г/кг массы тела соответственно. По истечении 10-дневного курса энтеросорбции следовал 7-дневный перерыв (1 период опыта), после чего введение энтеросорбентов в тех же дозах продолжали в течение 10 дней. Животные третьей группы служили контролем. После введения циткора они находились под наблюдением до окончания эксперимента.

При анализе лейкограмм у животных 1 и 2 групп отмечен сдвиг нейтрофильного ядра влево. Наиболее выраженный характер изменений картины крови наблюдали по окончании эксперимента. У животных этих групп в крови появлялись юные нейтрофилы. У крыс I группы, где на фоне интоксикации скармливали полисорб ВП, количество юных гранулоцитов увеличилось до 0,6 %, во II группе, где крысам применяли смекту, этот показатель возрос до 1,4 %, содержание палочкоядерных нейтрофилов в этих группах несколько снизилось по сравнению с фоновыми показателями. В контроле на фоне повышения количества палочкоядерных гранулоцитов содержание юных нейтрофилов составляло 0,2 %. Количество сегментоядерных нейтрофилов в первых двух группах повышалось по сравнению с фоном. У контрольных животных наблюдали обратную тенденцию: к концу эксперимента содержание сегментоядерных гранулоцитов уменьшилось с 33 % до 17,8 %.

В мазках крови некоторых животных отмечали появление крупных атипичных клеток неправильной формы. У миелобластов большие ядра отличались сетчатой структурой хроматина.

В ядрах некоторых клеток просматривались ядрышки голубого цвета. В цитоплазме нейтрофилов встречали зернистость, единичные палочки Ауэра, а также кокковую микрофлору. Палочкоядерные нейтрофилы часто имели разреженный ядерный хроматин. В крови всех подопытных животных резко увеличивалось содержание клеток Гумпрехта.

Эозинофилия имела выраженный характер в первых 2-х группах. Количество эозинофилов в I группе увеличилось более чем в 2 раза, во II

группе этот показатель несколько ниже. В III группе отмечали тенденцию к понижению количества эозинофилов. Довольно часто в мазках крови крыс всех групп регистрировали базофилы, которые имели вид вытянутых клеток. Из-за плотно прилегающих друг к другу гранул синего цвета ядра практически не были видны, только при разрушении мембран клеток гранулы свободно располагались вокруг ядра.

При подсчете клеток лимфоидного ряда отмечали незначительную лимфопению у крыс I и II групп, более выраженную у животных II группы. У крыс контрольной группы регистрировали лимфоцитоз.

В крови животных к концу эксперимента преобладали лимфоциты больших и средних размеров.

Атипичные формы лимфоцитов отличались большим многообразием. Встречались 2-х и 3-х ядерные клетки, широкоплазменные лимфоциты с бобовидным ядром, лимфоциты неправильной формы. В цитоплазме часто регистрировали токсическую зернистость, вакуолизацию, увеличивалось количество плазматических клеток.

Появление в крови животных полихроматофилов, ядерных эритроцитов, а также гигантских тромбоцитов свидетельствует о вовлечении в патологический процесс клеток не только лимфоидного и миелоидного, но и эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков кроветворения.

При цитохимическом исследовании на миелопероксидазу у 100 % животных после введения циткора отмечали резко положительную реакцию. После отмены пестицида отмечали понижение активности фермента.

Наименьшую активность пероксидазы регистрировали во II группе, где животные на фоне интоксикации получали смекту.

Несколько выше активность фермента была у животных I группы, где в качестве сорбента вводили полисорб. Высокая активность пероксидазы отмечалась в постинтоксикационном периоде без применения сорбентов.

2.5. Накопление циткора в органах и тканях крыс при хронической интоксикации и применении сорбентов

При ежедневном введении циткора в организм крыс в дозе 0,2 мг/кг в течение 10 дней наибольшее количество препарата обнаруживается в почках (8,61 мг/кг). В печени его концентрация достигает 6,34 мг/кг, а в семенниках циткор отмечали лишь в следовых количествах. Также в пробах печени обнаружено 4 метаболита с $Rf_1 = 0,19 \pm 0,003$; $Rf_2 = 0,33 \pm 0,004$; $Rf_3 = 0,63 \pm 0,003$; $Rf_4 = 0,84 \pm 0,01$. В пробах почек - 5 метаболитов с $Rf_1 = 0,08 \pm 0,003$; $Rf_2 = 0,19 \pm 0,003$; $Rf_3 = 0,33 \pm 0,004$; $Rf_4 = 0,63 \pm 0,003$; $Rf_5 = 0,84 \pm 0,01$. В семенниках крыс появляется пятно с $Rf_3 =$

0,33 ± 0,004. Большое количество циткора содержится в волосяном покрове крыс. Здесь уровень остатков в контрольной группе (введение циткора без лечения) достигает 126,15 мг/кг, а также обнаруживаются 2 метаболита с $Rf_3 = 0,33 \pm 0,004$ и с $Rf_7 = 0,84 \pm 0,01$. Волосяной покров на остатки циткора исследовали дважды методом тонкослойной хроматографии - по окончании первого и второго курсов энтеросорбции. Для этого использовали 15 беспородных крыс в возрасте 6 месяцев, из которых были сформированы 3 группы животных по 5 крыс в каждой. Циткор вводили 1 раз в день до кормления при помощи микропипетки в дозе 0,2 мг/кг в течение 10 дней. После введения циткора скормливали кашу, в которую подмешивали энтеросорбент полисорб ВП и смекту по 200 мг/кг 2 раза в день. Лечение подвергали первую и вторую группы крыс, третья служила контролем. Первой группе вводили циткор и полисорб ВП, второй - циткор и смекту, третьей - только циткор. По истечении 10 дней введение циткора и сорбентов было прекращено. Через неделю был назначен повторный 10-дневный курс энтеросорбции. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание циткора в волосяном покрове крыс, мг/кг, $n = 5$

Периоды опыта	Циткор + полисорб ВП	Циткор + смекта	Циткор
Первый курс энтеросорбции	64,61 ± 0,58**	80,00 ± 4,77 **	126,15 ± 6,28
Второй курс энтеросорбции	26,82 ± 2,92 *	30,48 ± 2,47	39,02 ± 2,34

Примечание: * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что наибольшей сорбционной активностью по отношению к циткору обладает полисорб ВП, так как при использовании данного препарата снижение содержания пиретроида в волосяном покрове было максимальным. Смекта также способствует детоксикации организма крыс, однако эффективность ее ниже по сравнению с полисорбом ВП.

Концентрация циткора в легких и сердце после введения его в организм животных в дозе 0,2 мг/кг в течение 10 дней и 2-х недельного лечения составила 5,36 мг/кг и 5,84 мг/кг соответственно. В легких обнаружено 3 метаболита с $Rf_2 = 0,19 \pm 0,003$; $Rf_3 = 0,33 \pm 0,004$ и $Rf_4 = 0,55 \pm 0,006$. Появление метаболитов с аналогичными величинами Rf наблюдается во всех

пробах сердца. Содержание циткора в селезенке составило 6,47 мг/кг. К тому же здесь обнаруживается метаболит с $Rf_s = 0,95 \pm 0,01$.

2.6. Перекисная хемилюминесценция сыворотки крови у животных при интоксикации синтетическими пиретроидами

В данной серии опытов мы преследовали цель оценить состояние перекисного окисления липидов и систем антиперекисной защиты у лабораторных животных и крупного рогатого скота в условиях хронической интоксикации пестицидами.

Исследования проведены на 20 беспородных белых крысах и 10 дойных коровах черно-пестрой породы. Те и другие животные были разделены на 2 группы по 10 и 5 голов в каждой соответственно.

Первая группа крыс подвергалась заправке синтетическим пиретроидом циткором в дозе 0,2 мг/кг в течение 10 дней. Вторая группа служила контролем. Опытная и контрольная группы коров были сформированы с учетом уровня накопления синтетических пиретроидов в сыворотке крови.

У контрольных животных остатки пестицидов были обнаружены в следовых количествах (условно здоровые животные), в сыворотке крови опытных животных содержание пиретроидов достигало 20,5 мг/л (животные в состоянии хронической интоксикации). У всех животных была взята кровь для исследования методом перекисной хемилюминесценции (у крыс - во время убоя по окончании опыта).

Для измерения инициированной перекисью водорода хемилюминесценции сыворотки крови помещали по 150 мл субстрата в кювету биохемилюминметра БХЛ - 06 М, затем добавляли по 300 мл фосфатного буфера ($pH = 7,5$). Кювету располагали в темновой камере хемилюминметра. Не нарушая светоизоляции темновой камеры, вводили по трубочке 410 мкл 2 % раствора перекиси водорода. При этом возникала вспышка хемилюминесценции, которую оценивали по величине амплитуды светосуммы за 3 минуты, при шкале 150 mV и десятикратном усилении.

У коров дополнительно исследовали кровь на содержание малонового диальдегида и глутатиона, а затем им назначали курс энтеросорбции с применением зоокарба и полисорба ВП в дозах по 0,05 г/кг массы тела в течение 10 дней, после чего подвергали повторному исследованию кровь. Результаты исследований представлены в таблицах 3 и 4.

Снижение хемилюминесценции при интоксикации синтетическими пиретроидами коррелирует с накоплением токсикантов в организме животных и, очевидно, происходит за счет выхода в общее кровяное русло через поврежденные клеточные мембраны низкомолекулярных соединений, обладающих тушащим эффектом.

Таблица 3. Показатели перекисной хемилюминесценции сыворотки крови животных при интоксикации синтетическими пиретроидами

Группы животных	Показатели:		
	S, mV·сек	I max, mV	St max, mV·сек
Крысы (n = 10):			
контроль	28,26 + 0,82**	1,06 + 0,21	0,86 + 0,13
интоксикация	18,44 + 2,02	1,3 + 0,05	0,92 + 0,07
Коровы (n = 5):			
контроль	106,11 + 1,84**	2,46 + 0,12**	0,41 + 0,006
интоксикация	85,07 + 0,63	1,67 + 0,02	0,39 + 0,05
Циткор + зоокарб	31,8 ± 7,0*	1,19 ± 0,13*	1,490 ± 0,270
Циткор + полисорб	60,9 ± 8,9 *	1,32 ± 0,22*	2,620 ± 1,320

Примечание: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; S – светосумма; I max – максимальная интенсивность сигнала; St max – светосумма в момент достижения максимальной интенсивности сигнала.

Таблица 4. Показатели перекисного окисления липидов в эритроцитах интактных коров (I), коров в состоянии интоксикации (II), на фоне введения зоокарба в дозе 0,05 г/кг (III) и полисорба в дозе 0,05 г/кг (IV), n = 5

Показатели	I Контроль	II Циткор	III Циткор + зоокарб	IV Циткор + полисорб
Малоновый диальдегид, мкмоль · л ⁻¹	178 ± 14	284,16 ± 45,83*	230 ± 15,95	211,5 ± 3,54**
Глутатион, ммоль · л ⁻¹	1,85 ± 0,07	1,05 ± 0,14 *	1,12 ± 0,03 *	1,71 ± 0,03 **

* – различие достоверно по сравнению с I группой; ** – различие достоверно по сравнению со II группой.

Данные таблицы 4 подтверждают интенсификацию процессов перекисного окисления липидов при интоксикации, о чем свидетельствует повышение концентрации малонового диальдегида и снижение уровня глутатиона в эритроцитарной массе крови. Применение энтеросорбентов способствует активизации системы антиоксидантной защиты. Наиболее выраженная коррекция показателей отмечается при использовании полисорба ВП.

2.7. Оценка мутагенной активности циткора методом соматических мозаиков на клетках крыла *Drosophila melanogaster*

В эксперименте использовали линии *Drosophila melanogaster*, несущие рецессивные мутации, локализованные на левом плече хромосомы 3-*multi wing hairs* (*mwh*; 3 - 0,3) и *flare* (*flr*; 3 - 38,8). В случае мутации *mwh* вместо одной ворсинки наблюдается 2 - 10 более мелких ворсинок, чем в норме, что было установлено при использовании позитивного контроля.

Основные итоги учета соматических мозаиков на клетках крыла дрозофилы представлены в таблице 5.

Таблица 5. Учет соматических мозаичных пятен на клетках крыла *Drosophila melanogaster*

Воздействие, концентрация	Количество крыльев	Мутации (количество пятен):		Всего мутаций	Количество мутаций на крыло
		одиночные	двойные		
Контроль позитивный (ЭМС) 0,4 мг/кг	120	467	62	529	4,41
Контроль негативный	87	15	2	17	0,195
Циткор: 3,1 мг/кг	72	8	6	14	0,19
1,2 мг/кг	64	8	2	10	0,156

В случае мутации *flr* наблюдали «обожженные» ворсинки-«пеньки». Мутантные клеточные клоны проявлялись в виде одиночных (*mwh* или *flr*) или двойных (*mwh* и *flr*) мозаичных мутантных пятен на крыле имаго.

Чтобы получить достоверный результат, тестовое вещество (циткор) вводили в корм трансгетерозиготных личинок (*mwh* / *flr*) в концентрациях 3,1 и 1,2 мг/кг корма. Выбор доз был регламентирован требованиями, изложенными в методических рекомендациях, одобренных Фармкомитетом МЗ РФ (Методические рекомендации, 1991; Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств, 1992; Методические рекомендации, 1998) и определен токсичностью препарата, дозы которого не должны превышать LD₅₀. Для имаго *Drosophila melanogaster* линии *mwh* / *mwh* летальной является доза 6 мг/кг корма. Время экспозиции - от кладки яйца

до имаго. В целях позитивного контроля в корм личинкам дрозофилы добавляли этилметансульфонат (ЭМС) в концентрации 0,4 мг/кг. Негативным контролем служили мухи-дрозофилы, выращенные без добавок.

Добавление циткора в корм в концентрациях 3,1 и 1,2 мг/кг корма существенно не повлияло на частоту мутирования в соматических клетках крыла дрозофилы.

Таким образом, в испытанных концентрациях циткор не является генотоксичным для дрозофил, хотя значительно увеличивает количество двойных мутаций и резко снижает плодовитость мух, при этом среднее количество мутаций на крыло остается на уровне или ниже негативного контроля.

3. ВЫВОДЫ

1. Циткор - (1 RS)- цис. транс- 3- (2,2- дихлорвинил)- 2,2- диметилциклопропан -карбоновой кислоты (RS)- 3- фенокси - а- цианобензиловый эфир - является среднетоксичным соединением. LD_{50} по действующему веществу для беспородных лабораторных крыс составляет $291,16 \pm 8,02$ мг/кг массы тела.
2. Клиническая картина острого отравления циткором характеризуется преобладанием признаков поражения центральной нервной системы с дозозависимым переходом стадии угнетения в судорожные приступы и паралич. Летальные дозы препарата вызывают гибель животных в течение первых двух суток после отравления.
3. В патологоанатомической картине острого отравления циткором в первые двое суток после отравления преобладают признаки острого расширения желудка, застойной гиперемии печени, почек, селезенки, головного мозга. В последующем прогрессируют дистрофические изменения в паренхиматозных органах и воспалительные изменения в желудочно-кишечном тракте. Хроническая интоксикация сопровождается развитием некротических изменений в печени, гнойной пневмонией, увеличением регионарных лимфатических узлов.
4. При хронической интоксикации циткором развиваются гематотоксические эффекты, характеризующиеся эозинофилией и повышением содержания базофилов и лимфоцитов с преобладанием бластных форм, а также атипичных недифференцируемых клеток на фоне снижения активности миелопероксидазы.
5. Накопление циткора в органах и тканях крупного рогатого скота приводит к интенсификации перекисного окисления липидов, вследствие чего повышается содержание малонового диальдегида, уменьшается концентрация глутатиона в крови и снижается H_2O_2 -зависимая хемилюминесценция сыворотки крови.

6. Максимальная концентрация циткора при остром отравлении отмечается в содержимом желудочно-кишечного тракта, легких, почках и печени. В большинстве органов и тканей регистрируется до 8 метаболитов циткора, среди которых преобладает метаболит с $R_f = 0,33 + 0,004$, имеющий одинаковые с метаболитами других синтетических пиретроидов хроматографические характеристики. При хронической интоксикации максимальный уровень остатков циткора и его метаболитов регистрируется в волосяном покрове.
7. Для имаго *Drosophila melanogaster* линии mwh/mwh LD₅₀ циткора составляет 6 мг/кг корма с экспозицией от кладки яйца до имаго. При введении циткора в корм трансгетерозиготных личинок (mwh/flr) в концентрациях 3,1 и 1,2 мг/кг корма генотоксичность не установлена, но выявлены тенденция к увеличению двойных соматических мозаиков на клетках крыла и снижение плодовитости мух.
8. Максимальное снижение концентрации циткора в органах и тканях при интоксикации крыс, собак и крупного рогатого скота отмечается при энтеросорбции с применением полисорба ВП в дозах 0,05 - 0,2 г/кг, этот же сорбент в наибольшей степени повышает выведение с мочой метаболита с $R_f = 0,33 + 0,004$. Менее выраженной терапевтической эффективностью обладают зоокарб и смекта.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Материалы исследований включены в заключительный отчет о результатах широких производственных испытаний энтеросорбента углеродного зоокарба и наставление по применению препарата, представленные для рассмотрения в ВГНКИ (г. Москва).
2. Изданы методические рекомендации «Дифференциальная диагностика лейкоза крупного рогатого скота и хронической интоксикации пестицидами», одобренные секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области (протокол № 6 от 11.11.2004 г.).
3. Результаты исследований могут быть использованы при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами по ветеринарной токсикологии.

СПИСОК

опубликованных работ по теме диссертации

1. Влияние зоокарба на клинический статус и картину крови у щенков при остром отравлении циткором в условиях эксперимента / Л.К. Герунова, Л.Г. Пьянова, Т.В. Бойко, Е.Ю. Востриков // Актуальные вопросы ветеринарной медицины домашних животных: сб.ст. - Екатеринбург: АМБ, 2001. - Вып. 4. - С. 61-63.
2. Востриков, Е.Ю. Влияние зоокарба на содержание остаточных количеств циткора в сыворотке крови собак / Е.Ю. Востриков // Перспективные направления научных исследований молодых ученых и специалистов Урала и Сибири: материалы VI науч.-практ. конф. - Троицк, 2002. - г 7-8.
3. Оценка мутагенности циткора методом соматических мозаиков на клетках крыла *Drosophila melanogaster* / Л.П. Захаренко, Т.Д. Дубостолова, Л.К. Герунова, Е.Ю. Востриков // Омский научный вестник. - 2002. - Вып. 18. - С. 142-143.
4. Пашкова, А.А. Влияние сорбентов на ферментативную активность Аиидин-пепсина in vitro / А.А. Пашкова, Р.Р. Даминов, Е.Ю. Востриков // Актуальные проблемы инвазионной, инфекционной и незаразной патологии животных: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения проф. С.Н. Никольского. - Ставрополь, 2003. - С. 342-343.
5. Герунова, Л.К. Перекисная хемилуминесценция сыворотки крови у животных при интоксикации синтетическими пиретроидами / Л.К. Герунова, Е.Ю. Востриков // Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных: материалы Междунар. науч.-практ. конф. - Воронеж, 2004. - С. 22-24.
6. Довгань, Н.Б. Сравнительный анализ метаболитов циткора, суми-альфа и адониса, обнаруживаемых методом тонкослойной хроматографии / Н.Б. Довгань, Е.Ю. Востриков // Предпосылки и эксперимент в науке: материалы II Междунар. межвуз. науч.-практ. конф. аспирантов и соискателей. - СПб., 2004. - С. 70-72.
7. Дифференциальная диагностика лейкоза крупного рогатого скота и хронической интоксикации пестицидами: Метод, указания для специалистов вет. службы / В.И. Околенов, Л.К. Герунова, Т.В. Бойко и др. - Омск, 2004. - 16 с.

На правах рукописи

**ВОСТРИКОВ
Евгений Юрьевич**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ
ЦИТКОРА И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ
ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Троицк-2005

Лицензия ЛР № 021252

Издательский центр УГАВМ,
457100, г. Троицк, Челябинская обл., ул. Гагарина, 13
Тел.:(35163)2-64-75

Сдано в набор 12.01.05. Подписано в печать 10.01.05
Формат 60x84/16. Гарнитура Times New Roman.
Усл.печл. 1,00. Бумага офсетная.
Способ печати ~ оперативный
Тираж 100

BT.

1851

22 MAR 2005