На правах рукописи

МИХАЙЛОВ АЛЕКСАНДР АНДРЕЕВИЧ

ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИОКСИГЕНА

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

003487873

Воронеж – 2009

Работа выполнена в отделе фармакологии ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» Россельхозакадемии.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Востроилова Галина Анатольевна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Слободяник Виктор Иванович

кандидат биологических наук
Мартынова Алла Валерьевна

Ведущая организация: ГНУ «Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт» РАСХН

Защита состоится «28» декабря 2009 г. в 13-00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 006.004.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии (ВНИВИПФиТ) по адресу: 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИВИПФиТ

Автореферат разослан «28» ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент Т.И. Ермакова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Несмотря на значительные достижения ветеринарной науки, бактериальные инфекции телят и поросят продолжают наносить значительный ущерб специализированным хозяйствам: даже в случае удовлетворительных зоогигиенических условий переболевают ими до 50-70 % поголовья. При тяжелых формах течения болезни смертность может достигать 90% от общего числа заболевших животных.

Для современного животноводства характерно, что большинство повседневных патологий «открытых полостей» - желудочно-кишечный, респираторный тракты, мочеполовая система – типа гастроэнтероколитов, бронхопневмоний, метритов, маститов, протекают с участием не одного, а одновременно нескольких возбудителей. (А.Г. Шахов, 1985, 1999; С.Н. Джупина, 1999; О.В. Вавина с соавт. 1999; Иванов А. Ф., 1999).

Специфическая профилактика многих бактериальных инфекций является недостаточно эффективной, поэтому, ведущая роль в борьбе с ними принадлежит химиотерапевтическим препаратам, в частности, антибиотикам, сульфаниламидам, нитрофуранам.

Учитывая, что заболевания редко протекают в виде моноинфекций, а чаще в сочетании друг с другом, для борьбы с ассоциациями требуются препараты широкого спектра действия, в том числе и комплексы антибиотиков, одновременно действующих на нескольких возбудителей (Н.В. Молчанов, Е.Ф. Берлизова, 1991; А.Г. Шахов, 2008).

Проблема антибиотикотерапии в интенсивном животноводстве состоит в том, что фармацевтические компании фактически не ведут разработки принципиально новых молекул, как это происходит в медицине. Наиболее успешно эта проблема решается с помощью использования комбинированной антибиотикотерапии.

Нередко, комплекс антибактериальных веществ обладает синергидным эффектом, что позволяет снизить дозу препарата или разработать более удобную схему лечения, уменьшив тем самым риск возникновения побочных эффектов.

В связи с этим перспективным является разработка нового антибактериального комбинированного препарата на основе гентамицина сульфата и диоксидина.

Обоснованность этой комбинации связана с тем, что в лекарственной форме одновременно сочетаются два бактерицидных агента, обеспечивающих синергидный эффект за счет того, что эти препараты действуют в одну фазу клеточного роста, но на разные метаболические пути.

В основе антибактериального действия диоксидина лежит избирательное подавление синтеза ДНК. Кроме этого препарат снижает активность внеклеточной нуклеазы и плазмокоагулазы у микроорганизмов, что приводит к нарушению функции генетического аппарата микробной клетки и в результате подавляется биосинтез биологически активных макромолекул, являющихся факторами патогенности.

Механизм действия гентамицина связывают с нарушением синтеза полипептидов микробной клетки в рибосомах.

Основной целью сочетанного применения диоксидина и гентамицина, является расширение спектра антибактериального действия, восполнение пробелов в спектре каждого из компонентов комбинации, и предупреждение формирования устойчивости микроорганизмов.

Цель и задачи исследований. Целью исследования являлась разработка оптимального состава комплексного антибактериального препарата диоксиген, проведение его фармако-токсикологической оценки и изучение клинической эффективности.

Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

- разработать лекарственную форму нового комплексного антибактериального препарата диоксиген;
- изучить острую, хроническую токсичность, местно-раздражающее и аллергизирующее действие, кумулятивные, эмбриотоксические и тератогенные свойства в опытах на лабораторных животных;
- изучить влияние диоксигена на организм крупного рогатого скота в субхроническом опыте;
- изучить фармакокинетику и определить остаточные количества компонентов препарата диоксиген в организме телят;
- испытать в условиях производства диоксиген при респираторной патологии телят;
- разработать и представить для согласования и утверждения в установленном порядке проект инструкции по применению диоксигена при респираторной патологии телят.

Научная новизна. Теоретически и экспериментально обоснован состав нового комплексного антибактериального препарата диоксиген, изучены его фармако-токсикологические свойства и терапевтическая эффективность при респираторной патологии телят. Установлены особенности распределения, накопления и сроки выведения остаточных количеств диоксигена из организма крупного рогатого скота после его применения. В условиях животноводческих хозяйств подтверждена терапевтическая эффективность и целесообразность применения препарата при респираторной патологии телят. Новизна исследований подтверждена патентом РФ «Способ лечения респираторных болезней молодняка сельскохозяйственных животных» №2367414 от 20 мая 2008 г.

Практическая значимость. Полученные результаты послужили основанием для разработки нового комплексного антибактериального препарата, технологии его производства, контроля качества и инструкции по применению для лечения респираторных болезней бактериальной этиологии у телят, которые вошли в разработанную и утвержденную нормативно-техническая документация на препарат диоксиген (СТО 10590965-0009-2008 и инструкции, утверждённой заместителем руководителя Россельхознадзора РФ за №ПВР-2-1.8/02137 от 22.05. 2008 г.)

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на заседании методической комиссии ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» протокол №1 от 25.01.2006 года; Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых - будущее в развитии АПК» (Воронеж, 2007); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях» (Воронеж, 2008); научно-практической конференции Фармакологов РФ, посвященной 85-летию со дня рождения профессора Рабиновича М.И. «Фармакологические и экотоксикологические аспекты ветеринарной медицины» (Троицк, 2008); Первом съезде фармакологов России (Воронеж, 2007).

Публикации. Основные научные результаты, включенные в диссертацию, опубликованы в 7 печатных работах, в том числе 1 статья в журнале «Ветеринария и кормление», рекомендованном ВАК Минобразования РФ, 1 патенте.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 32 таблицами и 7 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и практических предложений. Список литературы состоит из 315 источников, из которых 66 иностранных.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

- фармако-токсикологические свойства диоксигена;
- результаты изучения фармакокинетики и остаточных количеств препарата в организме телят после применения диоксигена;
- терапевтическая эффективность диоксигена при респираторной патологии телят.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Настоящая работа выполнена в отделе фармакологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН в период с 2006-2009 гг. в соответствии с планом научно-исследовательских работ по заданию 08.04.01. «Разработать методы ранней диагностики, эффективные средства и способы профилактики и лечения массовых незаразных и вызываемых условно-патогенными микроорганизмами заболеваний у молодняка высокопродуктивных животных» (№ гос. рег. 15070.3666026906.06.8.001.2), программа фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации Россельхозакадемии на 2006-2010 г.г.

Лабораторные и опытные образцы препарата диоксиген изготовлены в отделе фармакологии ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии.

Проведение научно-производственных и экспериментальных опытов осуществлялось в соответствии с требованиями к врачебно-биологическому

эксперименту по подбору аналогов, постановке контроля, а также соблюдению одинаковых условий кормления и содержания животных во время проведения работы и учета результатов. Перед проведением экспериментов животные выдерживались на карантине в течение 2 недель. Доступ к воде и корму был свободным, световой режим естественным.

В проведении ряда исследований принимали участие сотрудники ВНИВИ патологии, фармакологии и терапии Л.В. Ческидова, А.В. Топольницкая, В.В. Чернов, С.Н. Кабицкий, А.Г. Шахов, Ю.Н. Бригадиров, Т.Е. Рогачева, Л.Ю. Сашнина, С.М. Сулейманов, В.И. Шушлебин, Лаврищев П.Е. и другие, которым автор выражает искреннюю признательность за оказанную помощь и плодотворное сотрудничество.

При выполнении работы проводили токсикологические, физико-химические, гематологические, биохимические исследования с применением современных методов.

В опытах было использовано следующее количество животных: беспородные белые мыши обоего пола массой 18-22 г (191 гол.); беспородные белые крысы обоего пола массой 180-230 г (234 гол.); морские свинки обоего пола массой 270-310 г белого цвета или имеющих крупные белые пятна на боках туловища (24 гол.); кролики массой 2-2,5 кг (8 гол.); телята массой 45-50 кг (46 гол.). Клинические испытания препарата в производственных условиях проведены на телятах (421 гол.) с массой тела 55-95 кг, 2-2,5 мес. возраста.

Изучение антимикробной активности и оптимального соотношения компонентов (гентамицина и диоксидина) в препарате диоксиген проводилось in vitro методом серийных разведений (Антонов В.И. с соавт, 1986; Ковалев В.Ф. с соавт., 1988; Сидоров М.А. с соавт, 1995). В качестве тест-культур использовали референтные и полевые (патогенные) штаммы микроорганизмов – возбудителей респираторных болезней телят, типированных по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам.

Минимальную бактериостатическую концентрацию (МБсК) изучаемых препаратов определяли методом серийных разведений в мясопептонном бульоне (МПБ); минимальную бактерицидную концентрацию – путем высева из пробирок с прозрачной средой на плотные питательные среды (МПА), не содержащие препарат.

В опытах in vivo определена эффективность гентамицина и диоксидина, а также этих компонентов в различных соотношениях проводили в модельных опытах при экспериментальном заражении белых мышей Staphylococcus aureus 209Р (500 млн м.к./мышь) и Pasteurella multocida 1314 (100 тыс.м.к./мышь).

Острую, хроническую и субхроническую токсичность оценивали в соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве», утвержденными ГУВ СССР (1991), аллергенную активность в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке аллергенных свойств фармакологи-

ческих средств» (1988), эмбриотоксическую и тератогенную активность - в соответствии с «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств» (1997).

Параметры токсичности препарата определяли в остром опыте по общепринятой методике (М.П. Беленький, 1963; И.В. Саноцкий, 1970). Эксперименты проведены на половозрелых конвенциональных нелинейных разнополых белых мышах (172 гол.) и белых крысах (132 гол.) при однократном пероральном, внутримышечном и внутрибрюшинном введении диоксигена. Наблюдение за животными проводили непрерывно на протяжении первого дня после введения препарата. В последующем состояние животных отмечали 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 признаков токсикоза, оценивали их тяжесть, продолжительность, время выздоровления или гибели животных. Павших животных и особей с признаками отравления препаратом, подвергали патологоанатомическому вскрытию.

Изучение хронической токсичности препарата проводили на 60 белых крысах-самцах с массой тела 160-180 г при внутримышечном введении препарата в течение 21 дня. Общетоксическое действие препарата оценивали по динамике массы тела животных при взвешивании 1 раз в неделю, гематологическим показателям – при исследовании крови у крыс 1 раз в неделю на протяжении 3-х недель введения диоксигена, состоянию системы гемостаза – по окончании курса инъекций и через неделю восстановительного периода.

В опыте использовали контрольную группу животных той же численности и состава, что и подопытные. Контрольным животным вводили стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

Влияние диоксигена на функциональное состояние почек оценивали по состоянию спонтанного суточного диуреза и диуреза, индуцированного водной нагрузкой, содержанию в моче белка, глюкозы, крови, лейкоцитов.

Спонтанный диурез изучали в обменных клетках с подачей воды и корма при температуре 22 ± 1^0С. Регистрировали количество суточной мочи, которую подвергали химическому и микроскопическому анализу.

Для оценки диуретической функции почек методом водной нагрузки крысам-самцам интрагастрально вводили теплую водопроводную воду (38^0С) в объеме 3 мл/100 г и за каждый час на протяжении последующих 5 часов регистрировали объем выделяемой мочи, который выражали в % к объему введенной воды.

Изучение кумулятивной способности препарата проводили по методу Лима. Для изучения кумулятивных свойств диоксигена были подобраны две группы белых крыс: 1-я – контрольная (10 крыс), которым внутримышечно вводили стерильный физиологический раствор; 2-я – опытная (10 крыс), которым внутримышечно вводили диоксиген дробно в возрастающих дозах в соответствии со схемой (табл. 1).

Таблица 1

Схема введения диоксигена при изучении кумулятивных свойств

Доза диоксигена	Дни введения						
	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28
Ежедневно вводимая доза в частях от однократной $ЛД_{50}$	0,10	0,15	0,22	0,34	0,50	0,75	1,12
Суммарная доза за 4 дня в частях от однократной $ЛД_{50}$	0,40	0,60	0,90	1,40	2,00	3,00	4,50
Суммарная доза по периодам введения в частях от однократной $ЛД_{50}$	0,40	1,00	1,90	3,30	5,30	8,30	12,80

Субхроническую токсичность изучали на 15 клинически здоровых телятах в возрасте 15-20 дней средней массой тела 50 кг, которые были разделены на три группы по 5 телят в каждой. Первая группа – контрольная. Вторая группа получала в течение 10 дней препарат диоксиген в дозе 0,1 мл/кг внутримышечно 2 раза в сутки, третья – в дозе 0,5 мл/кг внутримышечно 2 раза в сутки. Токсическое действие препарата при его внутримышечном применении оценивали по ежедневному клиническому наблюдению с учетом общего состояния, температуры тела и дыхания. В начале опыта и на 10 день брали кровь у телят из яремной вены в утреннее время (до кормления) для морфологического и биохимического исследования.

Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия диоксигена проведено по методике А.П. Шицковой с соавт. (1977) на самках белых крыс массой 180,0±15,0 г. Фазу полового цикла устанавливали путем исследования вагинального содержимого. Первым днем беременности считали день обнаружения спермиев после подсадки самцов к самкам. Животные были разделены на три группы: контрольную и две опытные. Крысам первой опытной группы - на 5-й день беременности (период имплантации) и второй опытной группы - на 10-й день беременности (период органогенеза), вводили диоксиген в дозе 0,8 мл/кг массы тела внутримышечно. Для выявления повреждающего действия препарата на плод половину самок убивали на 19-20 день беременности. Проводили осмотр матки, плацент и плодов, подсчитывали количество желтых тел беременности, оценивали равномерность расположения плодов в рогах матки. Раннюю и позднюю резорбцию, общую эмбриональную смертность, выживаемость подсчитывали по формулам, предложенным А.М. Малашенко и И.К. Егоровым (1977). В целях выявления патологии внутренних органов эмбрионов, материал фиксировали в жидкости Боуэна и 70^0 спирте. Аномалии скелета выявляли по методу Даусона (1984).

Критериями оценки эмбриотоксического и тератогенного действия препарата служили показатели: гибель зародышей на пред- и постимплантационных стадиях развития (эмбриональный эффект), наличие аномалий развития внутренних органов и скелета (тератогенный эффект), а также уровень плодовитости крыс, масса зародышей.

Опыты по изучению раздражающего действия на кожу были проведены на кроликах с массой тела 1,9 -2,0 кг. Количество животных в опытных и

контрольных группах составляло по 6 особей разных полов. Исследуемый препарат наносили в чистом виде. Площадь нанесения составляла 80-82 $см^2$ (5% от общей поверхности тела животных). За два дня до эксперимента тщательно выстригали шерсть на спине, избегая механических повреждений кожных покровов. Препарат равномерно распределяли по поверхности участка тела в дозах от 0,02-0,12 $мл/см^2$. Экспозиция 4 часа, после чего кожу аккуратно протирали ватным тампоном, смоченным дистиллированной водой. Реакцию кожи на воздействие препарата оценивали через 1 и 16 часов после однократного нанесения, учитывая, что функциональные нарушения кожи характеризуются появлением различной степени выраженности эритемы, отека, трещин, изъязвлений, изменением температуры. Раздражающее действие диоксигена на слизистые изучено с помощью конъюктивальной пробы (по Г.П. Трубецкой, 1976) на 2 кроликах массой тела 1,9 -2,0 кг. Под верхнее веко правого глаза вносили по 0,05 мл подогретого до 40^0 С раствора препарата. Для контроля в левый глаз тем же животным по 1 капле физиологического раствора. Через 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 и 24 часа после инстилляции препарата учитывалось клиническое состояние животных (температура тела, частота пульса, количество дыхательных движений), в том числе изменение кровенаполнения конъюнктивы, состояние век и роговицы, наличие выделений. Оценку проводили в баллах согласно таблице 2.

Таблица 2

Оценка степени раздражающего действия на конъюнктиву

Интенсивность реакции	Оценка в баллах	Раздражающий эффект
Отсутствие реакции	0	Отсутствует
Слабая гиперемия	2	Слабый
Выраженная гиперемия	4	Слабо выраженный
Наличие лакримации	6	Умеренный
Наличие выделений	8	Выраженный
Отек век	10	Сильно выраженный

Влияние препарата на качество мясопродуктов изучено с использованием слепого метода по 9-ти бальной шкале для органолептической оценки качества вареного мяса и бульона разработанного ВНИИМП (1985), на двух группах кроликов-аналогов, со средней массой тела 2,6 кг по три животных в каждой. Кролики первой группы препарат не получали - контрольная группа. Животным второй группы диоксиген вводили в дозе 0,1 мл/кг массы тела два раза в сутки внутримышечно в течение 7 дней. Через одни сутки после окончания применения диоксигена кроликов забивали и проводили комиссионную органолептическую оценку вареного мяса и бульона.

Опыты по изучению терапевтической эффективности диоксигена при респираторной патологии проведен в трех опытах на телятах 2-2,5-месячного возраста весом 55-95 кг. Первый опыт проведен в ОАО «Юбилейное» Хохольского района Воронежской области, второй - в СХА «Свобода» Россошанского района Воронежской области и третий - в ООО «Чистая дубрава» Липецкого района Липецкой области.

Диагноз на заболевание устанавливали комплексно на основании данных клинического обследования животных, лабораторных исследований, патологоанатомического вскрытия, с учетом эпизоотической ситуации в хозяйстве.

Фармакокинетику диоксигена в крови и остаточные количества в органах и тканях изучали после однократного и двукратного внутримышечного введения препарата в дозе 0,1 мл/кг массы тела по показателям концентрации действующих веществ в крови через 0,5, 1, 3, 6, 8, 12, 24 часа после введения препарата.При проведении исследований руководствовались «Методическими указаниями по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства» №3049-84 от 29.06.84 г. Приготовление тест-культур, микробной взвеси, агаризованных сред и буферных растворов, основного и промежуточных растворов стандартов антибиотиков и построение стандартных кривых проводили по методикам, описанным в справочнике «Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии» (Ковалев В.Ф. с соавт., 1988).

Определение гентамицина в плазме крови проводили микробиологическим методом диффузии в агар с тест-культурой Bacillus pumilus NCTC 8241, основанном на сравнении величин зон задержки роста, образуемых испытуемым биоматериалом и стандартного образца гентамицина известной концентрации. Определение диоксидина проводили спектрофотометрическим методом с использованием калибровочных кривых.

С целью характеристики общего состояния животных при проведении модельных опытов общепринятыми методами, описанными в соответствующих руководствах (И.П. Кондрахин с соавт., 2004) в крови определяли количество эритроцитов (10^{12}/л); гемоглобина (г/л); СОЭ (мм/ч); лейкоцитов (10^{9}/л). Фракции белка определяли электрофорезом в агарозном геле, концентрацию общего белка, липидов и билирубина наборами фирмы «Vital Diagnostics», концентрацию мочевины, фосфора, холестерина, глюкозы, креатинина, кальция, активность аспартат– и аланинаминотрасфераз (АсАТ и АлАТ), щелочной фосфатазы и γ-глутамилтрансферазы – на биохимическом анализаторе «Hitachi-902».

Статистическая обработка результатов проведена с пользованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel», «Statistica 5,0» на PC «Pentium III». Достоверность отличий оценивали методом парных сравнений, используя t-критерий Стьюдента (Г.Ф. Лакин, 1990).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Антибактериальная активность диоксигена

Антибактериальную активность диоксигена изучали совместно с сотрудниками отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии ВНИВИПФиТ (зав. отд. А.Г. Шахов).

Активность диоксигена (табл. 3) в отношении стафилококков находилась в пределах 0,39-0,78 мкг/мл, в отношении полевых штаммов стрепто-

кокков – 0,78 мкг/мл. В отношении музейных и полевых штаммов пастерелл минимальная бактериостатическая концентрация диоксигена составила 3,12-6,25 мкг/мл.

Таблица 3

Антимикробная активность диоксигена в отношении возбудителей респираторной патологии

Культура микроорганизмов	МБсК	МБцК
Staphylococcus aureus 209P	0,78	3,12
Staphylococcus aureus (п)	0,39	1,56
Streptococcus pneumoniae (п)	0,78	1,56
Pasteurella multocida 1314	3,12	6,25
Pasteurella multocida (п)	6,25	12,5
Bordetella bronchiseptica	6,25	12,5

Активность препарата в отношении бордетелл также была высокой – 6,25 мкг/мл. Бактерицидное действие диоксигена в отношении изученных культур превышало бактериостатическое - в 2 раза.

3.2. Токсические свойства диоксигена

3.2.1. Острая токсичность

В результате изучения острой токсичности комплексного антибактериального препарата диоксиген на лабораторных животных установлено (табл. 4), что по параметрам острой токсичности согласно ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к IV классу опасности – веществам малоопасным. Среднелетальную дозу - LD_{50} диоксигена при пероральном введении определить не удалось, так как при введении препарата в максимально возможной дозе 50000,0 мг/кг – белым мышам и белым крысам, не отмечалось гибели животных.

Таблица 4

Параметры острой токсичности диоксигена (мг/кг)

Вид животных	Параметры токсичности					SLD_{50}
	МПД	LD_{16}	LD_{50}	LD_{84}	LD_{100}	
Внутрибрюшинное введение						
Белые мыши	4000,0	4833,7	7237,0 (6090-8260)	9640,4	10842,1	±529,6
Белые крысы	4500,0	5778,1	9032,1 7250-10400	12286,2	13913,3	±750,2
Внутримышечное введение						
Белые мыши	4500,0	5643,3	7078,3 (6310-7850)	8409,6	9101,2	±375,5
Белые крысы	4500,0	6021,2	8249,6 (6950-9550)	10479,2	11593,8	±629,6

3.2.2. Подострая токсичность диоксигена

Результаты изучения подострой токсичности препарата в опытах на лабораторных животных показали, что неблагоприятное влияние лекарственного средства на организм крыс носит дозозависимый характер. Двадцатиоднодневное введение препарата в дозе 0,16 мл/кг (1/50 LD_{50}) не вызывает функциональных изменений в организме крыс, следовательно, эту дозу можно считать недействующей (нетоксичной).

Таблица 5

Морфологические показатели крови белых крыс при многократном (21 день) внутримышечном применении диоксигена

Показатели	Контроль	Дозы диоксигена, мл/кг		
		0,16	0,40	0,80
Эритроциты, 10^{12}/л	5,1±0,19	5,3±0,27	5,0±0,36	5,0±0,43
Лейкоциты, 10^{9}/л	7,8±1,02	8,3±0,64	8,9±0,23	6,9±0,67
Гемоглобин, г/л	135,1±7,97	135,3±5,52	131,4±5,17	126,4±8,39
СОЭ, мм/час	3,05±0,24	3,00±0,19	2,87±0,35	1,81±0,11*
Нейтрофилы, % Палочкоядерные	2,7±0,67	2,4±0,35	2,3±0,43	5,3±0,38*
Сегментоядерные	22,6±3,33	22,7±1,74	24,6±4,67	30,1±4,03*
Эозинофилы, %	1,6±0,17	2,0±0,09	2,0±0,24	4,0±1,03*
Базофилы, %	-	-	-	-
Лимфоциты, %	71,7±1,76	72,0±2,71	69,9±4,81	60,1±3,06*
Моноциты, %	1,33±0,27	1,33±0,33	1,27±0,21	0,56±0,12*

** - $P < 0,05$-$0,001$ по сравнению с контролем*

При введении крысам дозы 0,4 мл/кг (1/20 LD_{50}) появляются первые признаки токсического действия препарата, проявляющиеся повышением, хотя и недостоверным, в сыворотке крови уровня мочевины (15,9%), креатинина (на 9,7%), активности АлАТ (на 11,2%). Таким образом, дозу диоксигена 0,4 мл/кг можно считать пороговой.

У животных, получавших препарат в дозе 0,8 мл/кг (1/10 LD_{50}), на протяжении всего опыта отмечали наименьший прирост массы тела, увеличение относительной массы печени (16,2%) и почек (22,6%).

Наиболее характерным изменением в составе крови крыс, которым вводили диоксиген в дозе 0,80 мл/кг, была отчетливая моноцитопения (табл.5). У опытных крыс после 21-дневного введения диоксигена выявлено достоверно значимое уменьшение СОЭ (в 1,7 раза), лимфоцитов (на 16,2%), увеличение палочкоядерных (в 2 раза) и сегментоядерных лейкоцитов (на 33,2%), эозинофилов (2,5 раза). Также достоверно возрастало содержание в сыворотке крови креатинина – на 31,1%, мочевины – на 43,5%, активность АлАТ, АсАТ – на 64,8 и 28,6 % соответственно и уровень билирубина на 11,2% (табл. 6). Таким образом, дозу 0,8 мл/кг можно считать токсической.

Таблица 6

Биохимические показатели крови белых крыс при многократном внутримышечном введении диоксигена

Показатели	Контроль	Дозы диоксигена, мл/кг		
		0,16	0,40	0,80
Общий белок, г/л	66,5±2,87	63,7±0,67	67,8±4,94	56,0±1,07*
Альбумины, г/л	35,9±1,16	38,1±1,64	39,0±0,53	39,9±1,79
Мочевина, мМ/л	4,09±0,23	4,92±0,73	4,74±0,68	5,87±0,21*
Глюкоза, мМ/л	5,79±0,30	4,79±0,48	4,37±0,23	5,39±0,62
Холестерин, мМ/л	0,84±0,18	0,78±0,03	0,90±0,14	1,00±0,17
АсАТ, Ед/л	116,8±11,8	106,2±6,85	100,9±5,18	150,2±3,43*
АлАТ, Ед/л	63,7±11,3	72,4±11,4	70,8±9,11	105,0±12,7*
Креатинин, мкмоль/л	61,8±4,19	64,2±2,42	67,8±5,62	81,0±0,79*
ЩФ, Ед/л	85,1±15,6	75,4±14,6	81,3±7,40	80,7±7,91
Билирубин, мкмоль/л	4,66±0,15	3,11±0,52	3,63±0,47	5,18±0,24
β-липопротеиды, г/л	5,07±0,18	5,31±0,27	5,24±0,21	6,48±0,54*

** - P < 0,05 - 0,001 по сравнению с контролем*

Введение препарата в дозах 0,16 и 0,4 мл/кг не вызывало изменений диуреза и гистологической картины почек у крыс. Наблюдаемые в группе животных, получавших максимальную дозу препарата 0,8 мл/кг, функциональные изменения почек (появление следовых количеств белка в моче) по всей видимости связаны с большой и длительной нагрузкой на организм действующих веществ комплексного препарата, выделяющихся через почки.

Все отмеченные изменения носили обратимый характер и восстанавливались после отмены препарата.

3.2.3. Кумулятивные свойства диоксигена

При изучении кумулятивных свойств по методу P. Lime суммарно введенные дозы диоксигена – 55,6 мл/кг для белых крыс не вызвали 50%-ной гибели животных. Это не позволило рассчитать коэффициент кумуляции по показателю смертельный эффект. Но, учитывая, что введенные дозы составляют 12,8 $ЛД_{50}$, то возможный коэффициент кумуляции превышает 12. Это свидетельствует об отсутствии кумулятивного эффекта у диоксигена.

3.2.4. Субхроническая токсичность диоксигена

Установлено, что применение диоксигена в изученных дозах (терапевтическая и в 5 раз ее превышающая) в течение 14 дней не оказывало существенного влияния на клинический статус, поведение и аппетит телят. В период всего опыта телята контрольной и опытных групп были подвижны, аппетит выражен, рефлексы сохранены. Нарушений функций пищеварения и мочеотделения не установлено. Показатели клинического состояния телят всех групп в течение всего опыта находились в пределах физиологической нормы. Препарат в различных дозах не снижал скорости роста телят.

При многократном применении диоксигена в дозе 0,1 мл/кг морфологические и биохимические показатели крови существенно не отличались от показателей у телят контрольной группы (табл. 7).

Таблица 7

Показатели крови клинически здоровых телят при внутримышечном применении диоксигена

Показатели		Фон	Контроль	Дозы диоксигена, мл/кг	
				0,1	0,5
Эритроциты, 10^{12}/л		6,5±0,44	6,4±0,31	6,6±0,16	6,1±0,52
Лейкоциты, 10^{9}/л		10,6±3,97	11,1±5,01	10,8±4,13	11,0±4,56
Гемоглобин, г/л		104,8±9,16	103,1±7,12	110,0±6,04	101,1±9,17
Гематокрит, %		36,0±3,15	36,2±0,99	37,1±2,27	36,0±5,07
Общий белок, г/л		64,6±2,17	65,0±0,08	66,7±1,54	63,1±3,32
Альбумины, г/л		33,8±4,32	34,1±5,17	33,9±6,27	33,1±2,98
Глобулины, %	α-	10,1±2,19	9,8±1,08	10,0±2,31	9,7±1,83
	β-	11,1±3,07	11,0±2,15	10,8±1,06	10,5±2,11
	γ-	9,2±1,45	9,1±3,31	9,1±2,64	9,3±1,03
Фосфор неорг., мМ/л		1,56±0,13	1,47±0,43	2,06±0,19	1,68±0,26
Мочевина, мМ/л		4,15±0,24	4,27±0,11	4,99±0,57	5,44±0,36*
Глюкоза, мМ/л		4,11±0,12	4,03±0,09	3,67±0,21	4,22±0,11
Общие липиды, г/л		2,31±0,48	2,16±0,17	1,87±0,08	1,93±0,16
Холестерин, мМ/л		1,21±0,19	1,18±0,21	0,99±0,16	1,14±0,12
АсАТ, ЕД/л		39,4±3,76	36,1±5,04	40,2±4,09	52,8±4,84
АлАТ,ЕД /л		74,5±3,52	76,1±5,99	79,6±7,81	85,0±6,68
Креатинин, мкМ/л		101,2±4,87	109,4±5,54	106,6±4,48	130,3±5,86
Билирубин, мкМ/л		2,38±0,07	2,42±0,24	2,23±0,09	3,26±0,24
Нейтрофилы, %					
Палочкоядерные		7,1±1,02	6,8±0,77	7,2±0,92	7,1±1,12
Сегментоядерные		28,1±3,01	22,3±2,56	22,6±5,16	23,4±2,87
Эозинофилы, %		2,1±0,11	1,9±0,15	2,2±0,21	2,1±0,24
Базофилы, %		0,4±0,05	0,4±0,06	0,5±0,10	0,4±0,10
Моноциты, %		1,1±0,20	1,2±0,46	1,3±0,36	1,1±0,16
Лимфоциты, %		61,1±5,86	67,4±9,01	66,2±6,13	65,9±7,81

*- *$P < 0,05$ по отношению к контролю*

При многократном внутримышечном применении диоксигена в дозе 0,5 мл/кг морфологические и биохимические показатели крови также существенно не отличались от показателей у телят контрольной группы. Исключение составляли показатели, характеризующие функциональное состояние печени и почек. Повышение в сыворотке крови мочевины (на 31,1%), креатинина (на 28,8%), а также увеличение количества билирубина (в 1,4 раза) и активности АсАТ (на 34,0%), АлАТ (на14,1%) свидетельствуют о возросшей нагрузке на эти органы.

Выявленные изменения носили обратимый характер, о чем свидетельствует отсутствие различий в показателях опытных и контрольной группы через 10 дней после отмены препарата. Таким образом, применение диоксигена в терапевтической дозе 0,1 мл/кг не оказывает токсического действия на

организм телят даже при сроке применения в 2-3 раза превышающем рекомендуемый курс лечения.

3.2.5. Эмбриотоксическое и тератогенное действие диоксигена

Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия диоксигена в дозе 0,8 мл/кг массы тела показало, что существенных различий в плодовитости крыс опытных и контрольной групп не установлено. Среднее количество плодов на самку в контрольной группе составило 12,1±1,43, а у крыс, получавших диоксиген в дозе 0,8 мл/кг массы тела на 5 и 10 дни беременности 12,8±1,18 и 11,6±1,40 соответственно.

Крысята, рожденные от самок опытных групп, не отличались от крысят контрольных самок. Проведенные морфологические исследования показали отсутствие аномалий развития внутренних органов и скелета плодов, рожденных от крыс опытных групп. Таким образом, диоксиген в дозе 0,8 мл/кг массы тела не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия.

3.2.6. Местнораздражающее действие

В результате проведенных исследований местнораздражающего действия диоксигена установлено, что при однократной аппликации на кожные покровы кроликам при плотности нанесения от 0,020 до 0,10 мл/см^2 препарат не вызывает повреждение кожи в виде эритемы или ее отеков.

Изучение раздражающих свойств препарата на слизистые оболочки, проведенное на кроликах, показало, что через 60, 180 минут и 4 часа раздражающее действие препарата отсутствовало.

3.2.7. Аллергенные свойства

Опыты по изучению аллергенных свойств диоксигена проведены на белых беспородных крысах и морских свинках при наружном, конъюнктивальном и внутрикожном способах применения препарата.

Результаты оценки сенсибилизирующего действия диоксигена показали отсутствие выраженной реакции иммунной системы подопытных животных на введение препарата. Препарат не вызывал контактного дерматита после многократных накожных аппликаций, при этом реакции специфического лизиса, специфической агломерации лейкоцитов и непрямой дегрануляции тучных клеток были отрицательны. Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии аллергенного действия у изучаемого препарата.

3.2.8. Влияние диоксигена на качество мясопродуктов

Гигиеническую оценку влияния диоксигена на качество мясопродуктов проводили на кроликах со средней массой 2,5 кг. Животным опытной группы вводили диоксиген в дозе 0,1 мл/кг массы тела два раза в сутки в течение 7 дней.

В результате проведенных органолептических исследований не установлено существенных различий между качеством проб бульона и мяса кроликов контрольной и опытной групп. Пробы мяса имели хороший, свойственный продукту цвет и вид на разрезе, ароматный запах, приятный вкус, нежную консистенцию и достаточную сочность. Бульоны были прозрачные,

слегка золотистого цвета с капельками жира, приятные на вкус и достаточно ароматные. Общая органолептическая оценка проб мяса и бульона – хорошая.

3.3. Изучение фармакокинетики препарата на телятах

Изучение фармакокинетики диоксигена проведено по определению содержания диоксидина в крови и гентамицина в сыворотке крови телят при однократном и двукратном внутримышечном введении в дозе 0,1 мл/кг.

При внутримышечном введении диоксиген быстро всасывается. Максимальные концентрации гентамицина и диоксидина в сыворотке крови наблюдаются через 1 час после инъекции. Однократное введение диоксигена в дозе 0,1 мл/кг обеспечивает терапевтическую концентрацию гентамицина в организме телят в течение 6-8 часов, а диоксидина до 12 часов.

При повторном введении диоксигена (интервал между введениями 12 часов) в дозе 0,1 мл/кг наблюдается некоторая кумуляция препарата, а уровень действующих компонентов после повторного введения превышает наблюдаемый в соответствующий промежуток времени после однократной инъекции. В большей степени это относится к гентамицину.

Тенденция к некоторому накоплению препарата и удлинению продолжительности его циркуляции в организме позволяет рекомендовать его двукратное применение с интервалом 12 часов.

Таблица 8

Содержание диоксидина и гентамицина в крови телят после однократного внутримышечного введения диоксигена

Сроки исследования, час	Содержание диоксидина и гентамицина в крови, мкг/мл			
	Диоксидин		Гентамицин	
	однократно	двукратно	однократно	двукратно
0,5	1,47±0,36	1,56±0,20	15,93±4,33	20,32±4,19
1	1,63±0,19	1,72±0,12	16,02±5,12	21,56±4,00
3	1,22±0,24	1,44±0,32	8,17±1,91	10,87±3,29
6	0,71±0,09	0,80±0,20	2,16±0,40	6,79±1,42
8	0,40±0,11	0,35±0,10	0,91±0,14	4,15±0,63
12	0,26±0,07	0,28±0,08	-	0,84±0,15
24	0,08±0,01	0,10±0,04	-	-

3.4. Определение остаточных количеств препарата в органах, тканях и биологических жидкостях телят

При изучении сроков выведения гентамицина и диоксидина после курсового 5-ти дневного применения диоксигена в дозе 0,1 мл/кг с интервалом 12 часов было установлено, что через сутки после последнего введения препарата остаточные количества диоксидина определяются во всех исследуемых органах и биологических жидкостях, на 3 сутки диоксидин выявляется в пределах 0,4-1,5 мкг/мл/г, на 5 сутки после последнего введения препарата

диоксидин отсутствует во всех органах, тканях и жидкостях организма телят (табл. 9).

Таблица 9

Содержание гентамицина и диоксидина в биологических жидкостях и органах телят после 5-ти дневного применения препарата в дозе 0,1 мл/кг массы тела

Биосубстрат	Время исследования, через суток				
	1	3	5	7	14
Гентамицин, мкг/г/мл					
Кровь	26,3±2,66	1,20±0,33	0,24±0,08	0,00	0,00
Печень	10,3±1,15	5,04±0,65	2,81±0,20	0,60±0,10	0,05
Почки	38,5±1,44	28,7±1,59	14,6±1,11	6,10±0,78	0,05
Мышцы	10,0±1,25	5,33±0,58	0,98±0,31	0,00	0,00
Моча	49,4±4,47	28,2±4,02	18,43±2,95	7,97±0,65	0,89±0,13
Диоксидин, мкг/г/мл					
Кровь	2,38±0,34	0,29±0,09	0,00	0,00	0,00
Печень	2,62±0,27	0,53±0,05	0,00	0,00	0,00
Почки	3,87±0,17	0,92±0,07	0,00	0,00	0,00
Мышцы	0,31±0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
Моча	3,81±0,33	0,97±0,10	0,00	0,00	0,00

Исследования содержания гентамицина в сыворотке крови, органах и тканях на 1, 3, 5, 7 и 14 сутки после окончания применения диоксигена показали, что препарат интенсивно выводится из организма телят в первые семь суток в основном с мочой. Остатки гентамицина ниже предела количественного анализа были в крови и мышцах - на 7 сутки, в печени и почках - на 14 сутки.

Таким образом, убой на мясо можно производить через 21 день после последнего введения препарата.

3.5. Терапевтическая эффективность диоксигена при респираторной патологии телят

Научно-производственные опыты были проведены в хозяйствах Воронежской области: ОАО «Юбилейное» Хохольского района и СХА «Свобода» Россошанского района.

Терапевтическую эффективность диоксигена при лечении бронхопневмонии у телят оценивали в двух опытах на телятах 2-2,5-месячного возраста весом 55-95 кг.

Препарат применяли внутримышечно в дозе 0,1 мл/кг с интервалом 12 часов в течение 7 дней, при тяжелом течении болезни – в течение 7-9 дней.

Телят контрольной группы лечили раствором гентамицина сульфата 4%, который применяли в соответствии с инструкцией по применению.

Проведенные исследования показали (табл. 10), что диоксиген обладает высокой терапевтической эффективностью при лечении респираторной пато-

логии у телят (в среднем она составила 91,3%), что на 8,0% выше эффективности раствора гентамицина сульфата 4%. По сравнению с контрольными группами, при применении препарата диоксиген, снизился процент животных, которые остались больными в среднем 2 раза. Уменьшился срок выздоровления в среднем на 16,2%.

Таблица 10

Эффективность применения диоксигена при респираторной патологии телят

Показатели	Группа животных			
	ОАО «Юбилейное»		СХА «Свобода»	
	Гентамицин 4%	Диоксиген	Гентамицин 4%	Диоксиген
Количество животных, гол.	87	93	43	46
Выздоровело, гол.	74	87	35	41
%	85,1	93,5	81,4	89,1
Пало, гол.	-	-	3	2
%			7,0	4,4
Остались больными, гол.	13	6	5	3
%	14,9	6,5	11,6	6,5
Сроки выздоровления, дн.	7,7±0,4	6,9±0,3	8,4±0,7	6,6±0,4
Терапевтическая эффективность, %	85,1	93,5	81,4	89,1

Результаты проведенных нами исследований по разработке лекарственной формы, изучению антибактериальных, фармако-токсикологических свойств и терапевтической эффективности комплексного антибактериального лекарственного средства на основе гентамицина и диоксидина были использованы при разработке стандарта организации и инструкции по применению лекарственного средства в ветеринарии.

ВЫВОДЫ

1. Диоксиген – новый комплексный антибактериальный препарат, в состав которого входят диоксидин и гентамицин, обладает широким спектром антимикробного действия в отношении основных возбудителей респираторной патологии телят. Бактериостатическая концентрация препарата для стафилококков составляет 0,39-0,78 мкг/мл, для стрептококков – 0,78 мкг/мл, для пастерелл – 3,12-6,25 мкг/мл, для бордетелл – 6,25 мкг/мл. Бактерицидное действие диоксигена в отношении изученных культур превышает бактериостатическое - в 2 раза.

2. Препарат по степени токсичности относится к IV классу опасности – малоопасные вещества (ГОСТ 12.1.007-76). Среднелетальную дозу- LD_{50} диоксигена при пероральном введении определить не удалось, так как при введении препарата в максимально возможной дозе - 50000,0 мг/кг белым мышам и белым крысам, не отмечено гибели животных. При внутрибрюшинном введении LD_{50} для белых мышей составляет 7237,0 мг/кг, для белых крыс

– 9032,1 мг/кг; при внутримышечном введении для белых мышей – 7078,3 мг/кг, для белых крыс – 8249,6 мг/кг.

3. При многократном внутримышечном введении диоксигена белым крысам в дозах 1/50 от $ЛД_{50}$ (0,16 мл/кг) и 1/20 от $ЛД_{50}$ (0,4 мл/кг) в течение 21 дня не выявлено функциональных изменений в организме животных. Применение препарата в максимальной токсической дозе 1/10 от $ЛД_{50}$ (0,8 мл/кг) повышает нагрузку на печень и, главным образом, на почки при отсутствии клинических признаков интоксикации.

4. При изучении влияния диоксигена на организм клинически здоровых телят при длительном применении не установлено его отрицательного влияния на морфологический состав крови и основные виды обмена веществ. В дозах в 5 раз превышающих терапевтические он вызывает незначительные отклонения в функции выделительной системы организма животных, носящие обратимый характер.

5. Диоксиген не обладает местно-раздражающим действием. У препарата отсутствуют кумулятивные, эмбриотоксические, тератогенные и аллергенные свойства.

6. Максимальное содержание диоксидина и гентамицина наблюдается через 1 час после введения диоксигена. При однократном введении диоксигена в дозе 0,1 мл/кг терапевтическая концентрация гентамицина в организме телят поддерживается в течение 6-8 часов, а диоксидина - до 12 часов. Введение диоксигена в дозе 0,1 мл/кг два раза в сутки обеспечивает поддержание терапевтической концентрации диоксидина и гентамицина в течение 24 часов.

7. Оба компонента препарата хорошо проникают в различные органы и ткани, т.к. концентрации их в ткани почек превышают сывороточные в 1,6-1,5 раза. Элиминация компонентов препарата происходит преимущественно с мочой и в меньшей степени с фекалиями. Убой животных на мясо можно разрешить через 21 сутки после последнего введения препарата в суточной дозе 0,2 мл/кг, т.к. остатки диоксидина не обнаруживаются в биоматериале на 5 сутки, а остаточные количества гентамицина детектируются на уровне чувствительности метода в печени и почках на 14 сутки.

8. Терапевтическая эффективность препарата диоксиген в дозе 0,1 мл/кг массы тела 2 раза в сутки при лечении респираторной патологии телят составляет 89,1-93,5%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для лечения больных респираторной патологией телят рекомендуется применять диоксиген внутримышечно в дозе 1 мл/10 кг массы тела с интервалом 12 часов в течение 5 дней, при тяжелом течении болезни – в течение 7 дней в соответствии с инструкцией по применению, утверждённой заместителем руководителя Россельхознадзора РФ за №ПВР-2-1.8/02137 от 22.05. 2008 г.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*1. **Шабунин С.В.** Комплексные лекарственные препараты на основе гентамицина и колистина при бактериальных инфекциях телят / С.В. Шабунин, Г.А. Востроилова, В.В. Чернов, **А.А. Михайлов** и др. // Ветеринария и кормление, 2007. - ноябрь-декабрь. - С. 12-13.

2. **Михайлов А.А.** Раздражающее действие диоксигена / А.А. Михайлов // Достижения молодых ученых - будущее в развитии АПК: Матер. межрегиональной науч.-практ. конф. Молодых ученых - Воронеж, 2007. - С. 183-184.

3. **Михайлов А.А** Изучение влияния диоксигена на эмбриогенез животных / А.А. Михайлов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Матер. междунар. науч. - практ. конф. – Воронеж, 2008. – С.255-257.

4. **Михайлов А.А.** Фармако-токсикологическая оценка диоксигена / А.А. Михайлов, Г.А. Востроилова // Фармакологические и экотоксикологические аспекты ветеринарной медицины: Матер. науч.-практ. конф. Фармакологов РФ, *посвящ. 85-летию со дня рождения проф. Рабиновича М.И.* - Троицк, 2007. – С.178-182.

5. **Михайлов А.А.** Параметры токсичности препарата диоксиген / А.А. Михайлов, Г.А. Востроилова, Л.В. Ческидова, Т.Е. Рогачева, П.В. Лаврищев // Первый съезд фармакологов России: Материалы съезда. - Воронеж, 2007. - С. 431-433.

6. Шахов А.Г. Антибактериальная активность комплексного препарата диоксиген / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина, Г.А. Востроилова, Ю.Н. Бригадиров, П.Е. Лаврищев, **А.А. Михайлов** // Первый съезд фармакологов России: Материалы съезда. - Воронеж, 2007. - С.658-660.

7. Способ лечения респираторных болезней молодняка сельскохозяйственных животных: Патент РФ 2367414 С1 МПК А61К 31/00, 31/7036 / Шабунин С.В., Востроилова Г.А., Ческидова Л.В., Шахов А.Г., Бригадиров Ю.Н., Сашнина Л.Ю., **Михайлов А.А.**, Лаврищев П. Е., Иванов М.А.; - Заявитель и патентообладатель ГНУ ВНИВИПФиТ. – 2008120097/13. - Опубликовано 20.09.2009. - Бюл. №26.

* - издания из Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ.

Подписано в печать 27.11.2009 г. Формат 60x84/16.
Гарнитура «Times New Roman». Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100. Заказ 151.

Цифровая типография «Скоропечатня»
394000, Воронеж, пер. Солдатский 18, тел.:616-228.