

На правах рукописи

**КАРИМОВ
РОБЕРТ РАФФАКОВИЧ**



**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИЗОНА И
ОБОСНОВАНИЕ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В СВИНОВОДСТВЕ**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Троицк-2005

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Башкирский
государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Исмаилова Асия Фахретдиновна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Лыкасова Ирина Александровна

кандидат биологических наук, доцент
Валова Людмила Владимировна

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Новосибирский госу-
дарственный аграрный университет»

Защита диссертации состоится «1» июня 2005 года в 13³⁰ часов на
заседании диссертационного совета Д. 220.066.01 при ФГОУ ВПО «Ураль-
ская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 457100,
Челябинская область, г. Троицк, ул. Гагарина, 13.

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

Автореферат разослан «18» апреля 2005 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Прокофьева Т.В.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Прогресс ветеринарной фармакологии характеризуется непрерывным поиском и созданием новых безопасных препаратов. Установлено, что многие факторы окружающей среды: кормление, стрессы различной этиологии неблагоприятно воздействуют на иммунную систему животных. В связи с этим в животноводстве находят широкое применение различные средства, которые позволяют ослабить влияние неблагоприятных факторов (Шахов А.Г., Бузлама В.С., 1990; Лыкасова И.А., 2000; Папуниди К.Х., Фролов А.В., Назаров В.Р., 2002; Аргунов М.Н., Цветикова О.Н., 2002; Исмаилова А.Ф. с соавт., 2003; Самородова И.М., Рабинович М.И., Гюрджи-Оглы С.Ж., 2004).

Мир лекарственных средств в ветеринарии обширен и пока не имеет тенденции к сокращению. Десятки отечественных и зарубежных производителей лекарственной продукции поставляют препараты для ветеринарного использования. В последние годы интенсивно расширяется выпуск биологически активных препаратов различной направленности для лечения при патологических процессах, а также средств, применяемых для повышения продуктивности животных (Александров И.Д., Антипов В.А., 2004).

При нарушениях, сопровождающихся развитием иммунодефицитов у животных различного возраста, ведущим фактором является ослабление перевариваемости продуктов потребляемых рационов, особенно зерновых, усвоения некрахмалистых полисахаридов, активности полезной микрофауны пищеварительного тракта. У таких животных до 50% продуктов питания проходит пищеварительный тракт транзитом, не подвергаясь биохимической обработке, что на фоне даже рационального питания не сопровождается нормативными показателями прироста живой массы и повышения продуктивности.

Увеличение производства продуктов животноводства является актуальной проблемой. Свиноводство с переходом на новые экономические отношения оказалось в тяжелом финансовом положении. Большое сокращение производства свинины допущено на комплексах Республики Башкортостан. В 1996 году произведено 13,2 тыс. тонн, то есть менее 50 % от проектной мощности. В связи с этим в Республике Башкортостан ставится задача довести в 2005 году до 60 тыс. тонн и восстановить поголовье свиней до 900 тыс. в общественном секторе.

В связи с вышеизложенным ООО «Поливит» проведен целенаправленный синтез препарата Полизон, сочетающий несколько видов фармакологической активности (Струнин Б.П., Антипов В.А., 2001).

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось изучение токсико-фармакологических свойств Полизона - нового препарата фосфорнокислой соли 2-амино-4-метилтио-(S-оксо-S-имино)-масляной кислоты.

Для реализации поставленной цели нами были определены следующие задачи:

- изучить влияние Полизона на иммунную систему лабораторных животных;
- изучить возможность отдаленного нейротоксического действия Полизона;
- изучить влияние Полизона на продуктивность свиней (среднесуточный прирост массы, сохранность поросят);

- изучить влияние Полизона на аминокислотный состав крови поросят;
- изучить воспроизводительную функцию хряков производителей при применении Полизона;
- провести ветеринарно-санитарную экспертизу и изучить товарные качества мяса свиней, получавших в составе рациона Полизон;
- провести гистологические и гистохимические исследования печени крыс и поросят-гипотрофиков.

Научная новизна. Впервые изучены отдельные механизмы иммуностимулирующего действия Полизона. Изучено влияние Полизона на продуктивность и аминокислотный состав крови поросят, воспроизводительную функцию хряков, проведена ветеринарно-санитарная экспертиза и определена степень товарных качеств мяса. Впервые проведены гистологические и гистохимические исследования печени крыс и поросят-гипотрофиков.

Практическая и теоретическая значимость. Предложены методы и схемы применения нового препарата Полизон для повышения естественной резистентности и продуктивности свиней. Получено наставление, утвержденное Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ от 26 июня 2002 года (протокол №2). Регистрационный № ПВР-2-2.2/00969. Получен диплом в секции «Медицинская техника и фармация. Агробιοтехнологии и новые продукты питания» на Второй окружной ярмарке бизнес-ангелов и инноваторов в Приволжском федеральном округе, проходившей 29-30 апреля 2004 года, за предоставленный проект «Токсико-фармакологические свойства Полизона».

Материалы, представленные в настоящей диссертационной работе, используются в учебном процессе на кафедре внутренних незаразных болезней, клинической диагностики и фармакологии ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет».

На защиту выносятся следующие положения:

- о фармакологическом спектре и механизме иммуномодулирующего действия Полизона;
- о степени безвредности иммуномодулятора Полизон;
- о возможности использования Полизона для повышения естественной резистентности и продуктивности свиней.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и получили положительную оценку на: Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии», (Оренбург, 2003 г); Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных» (Воронеж, 2004 г); Международной научно-практической конференции «Наука сельскохозяйственному производству и образованию» (Смоленск, 2004 г); Международной межвузовской научно-практической конференции «Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и образования» (Кинель 2005 г); ежегодных конференциях ученых Башкирского государственного аграрного университета в период с 2002 по 2005 гг.

Настоящая работа выполнена в соответствии с тематикой научных исследований ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет» (номер госрегистрации 01.86.0 - 07.68.78).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 4 научные работы, в которых отражены основные результаты экспериментальных исследований.

Внедрение результатов исследований: опытно-промышленные испытания проведены в СПК колхоза «Октябрь» Кугарчинского района Республики Башкортостан.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 141 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, выводов и практических предложений. Работа содержит 15 таблиц и 47 рисунков. Список литературы включает 177 источников, из них 142 отечественных и 35 зарубежных авторов.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

В соответствии с целью и задачами исследования в настоящей главе представлено описание материалов и методов исследований, использованных для изучения фармакологических свойств Полизона.

Экспериментальные лабораторные исследования проведены на кафедре «Внутренние незаразные болезни, клиническая диагностика и фармакология» ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет» (на 352 белых беспородных мышах, 128 мышах линии СВА и 112 мышах линии С₅₇В1, с живой массой - 18-20 г; на 45 белых беспородных крысах с массой 180-230 г; на 45 десятисуточных цыплятах кросса «Родонит»; а также в условиях производства в СПК колхоза «Октябрь» Кугарчинского района Республики Башкортостан на 115 поросятах, 20 хряках и 60 свиноматках крупной белой породы.

Опытные и лабораторные животные содержались в одинаковых зоогигиенических условиях. Кормление животных проводили согласно суточной потребности с использованием индивидуальных рационов, согласно видового и половозрастного состава групп (Ковалевский К.Л., 1986).

Количество АОК определяли с помощью метода локального гемолиза в жидкой фазе, предложенного Jerne N. K и Nordin E. A. (1965) в модификации Cunningham A.J., Crenberg A. (1987).

Анализ спонтанного (в первой пробирке) и индуцированного латексом (во второй пробирке) восстановления НСТ проводили под иммерсионной системой микроскопа путем подсчета числа активированных псевдоэозинофилов, содержащих темно-фиолетовые зерна формазана, в процентах. На основании результатов микроскопии производили расчет % фагоцитирующих макрофагов, фагоцитарное число, % макрофагов и индекс активации макрофагов (Фрейдлин И.С., 1984).

Лизосомную активность нейтрофилов определяли по суммарному свечению числа лизосом в цитоплазме клеток, окрашенных акридиновым оранжевым, при люминисцентной микроскопии в модификации Л.Я. Эберта с соавт. (1983).

Для оценки влияния Полизона на звено клеточного иммунитета использовали метод количественной оценки РТПХ в региональных узлах при локальном введении аллогенных клеток (Маянский А.Н., Вискман М.Е., 1979; Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1981; Брондз Б.Д., 1987).

Воздействие исследуемого соединения на функциональную способность Т-эффекторов изучали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), спровоцированной динитрофторбензолом, растворенным в ацетоне. С целью более полного изучения влияния исследуемых соединений на клеточно-опосредованные иммунные реакции, нами дополнительно применялся метод формирования реакции ГЗТ у мышей внутривенным введением эритроцитов барана (2×10^6 клеток) - сенсибилизирующей дозы, и через 10 дней, субплантарно в лапку (2×10 клеток) - разрешающей дозы. Спустя сутки после последнего введения, по приросту (в %) массы правой лапки нами определялась интенсивность РГЗТ (Knop J., Stremmer R., Neumann C, 1982).

Содержание аминокислот в сыворотке крови свиней определяли на аминокислотном анализаторе LC 3000 фирмы «Erpendorf-Biotonic» (Германия).

При исследовании эякулята хряков пользовались общепринятыми в ветеринарии методами (Шипилов В.С., 1986, 1988; Михайлов Н.Н., 1990).

Оплодотворяющую способность сперматозоидов определяли путем постановки биологической пробы. С этой целью хряков опытных и контрольной групп по истечении тридцати суток со дня начала исследований случали со здоровыми ремонтными свиноматками, с последующей регистрацией наступления их супоросности и расчета процента оплодотворяемости (Шипилов В.С., 1986, 1988; Михайлов Н.Н., 1990).

Послеубойную оценку туш свиней и органолептические исследования проводили согласно ГОСТ 1213-74.

При определении содержания калия и натрия в мышечной ткани свинины пользовались методом пламенной фотометрии при помощи пламенного фотометра PFC-4.

Определение содержания кальция в мышечной ткани проводили по методике Вичева и Каракашева; магния - по цветной реакции с титановым желтым по Кункелю, Пирсону, Швейгеру в модификации И.В. Петрухина; железа - путем исследования золы, полученной при озолении мяса, по методу Сендела в модификации С.Г. Кузнецова, фосфора - согласно ГОСТа 9794-74 (Кондрахин И.П., К>рилов Н.В. с соавт., 1985).

Для гистологического исследования кусочки тканей фиксировали в 10% нейтральном формалине, после обезживания в серии спиртов возрастающей концентрации, заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM.2145 и окрашивали гематоксилином и эозином. Для гистохимических исследований кусочки тканей фиксировали в жидкости Карнуа в модификации Лилли (абсолютный этанол - 75 мл, ледяная уксусная кислота - 25 мл.) (Кононский А.И., 1976).

Микроскопические исследования проводились с использованием светового микроскопа JENAVAL фирмы «CARL ZEISS» (Германия).

Определение белка в гистоматериале осуществляли путем окрашивания амидочерным 10В. Возникновение окраски связано с образованием ионных связей между кислотными группами молекул красителя и основными группировками белков (аминогруппами лизина, гуанидиновой группой аргинина и имидозольным кольцом гистидина).

Статистическую обработку цифровых данных проводили на PC Pentium IV, с использованием прикладной программы MS Excel©, включающих подсчет средних величин (М), средней ошибки (т), среднеквадратических отклонений выборки (S), определения степени достоверности по Стьюденту.

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Влияние Полизона на гуморальный иммунный ответ

Актуальной задачей современной фармакологии является поиск путей регуляции иммунитета лекарственными средствами. Большой интерес она приобрела в связи с детальным изучением биохимических процессов, лежащих в основе иммунных реакций. Перспективным в этом отношении является изучение иммунотропной активности Полизона.

У мышей, получавших Полизон, при иммунизации эритроцитами барана, наблюдалось и значительное повышение количества АОК (таблица 1).

1 Влияние Полизона на содержание АОК в селезенке мышей

Количество эритроцитов для иммунизации	Доза Полизона мг/кг	АОК на 10^6 спленоцитов		АОК в селезенке	
		М±м	Р	М±м	Р
1×10^7	—	90,0±12,1	—	13592,0±2000,0	—
	3	91,2±12,6	<0,05	13771,0±2521,0	<0,05
	4	150,7±13,1	<0,001	22760,0±2061,0	<0,001
	5	189,0±12,2	<0,001	28551±2221,0	<0,001
5×10^7	—	385,0±24,9	—	56000,0±4822,0	—
	3	400,2±31,2	<0,05	58211,0±4300,0	<0,05
	4	468,1±24,9	<0,001	68200,0±3200,0	<0,001
	5	469,9±18,6	<0,001	68221,0±2220,0	<0,001
4×10^8	—	459,0±23,0	—	68000,0±3800,0	—
	3	481,0±32,0	<0,05	69290,0±3920,0	<0,05
	4	505,0±41,2	<0,001	78150,0±8990,0	<0,001
	5	500,3±36,3	<0,001	77250,0±8900,0	<0,001

Как видно из таблицы 1, при оптимальной антигенной нагрузке иммуностимулирующий эффект Полизон оказывал при его применении в дозах 4 и 5 мг/кг. На фоне антигенной стимуляции меньшим количеством эритроцитов барана ($5 \cdot 10^7$ клеток) усиление антителообразования достигалось уже в дозе 3 мг/кг, при этом число антителообразующих клеток в селезенке увеличивалось в среднем на 4%. Увеличение дозы Полизона до 4 и 5 мг/кг приводило к увеличению стимуляции иммуногенеза, увеличению массы и общей клеточности селезенки. Количество же АОК в селезенке при этом увеличивалось на 21,82% ($68221,0 \pm 2220,0$ АОК при применении Полизона в дозе 5 мг/кг и $56000,0 \pm 4822,0$ АОК в контроле).

Действие Полизона на гуморальный иммунный ответ у мышей линий СВА и $C_{57}VI$ регистрировалось при определении титра циркулирующих в крови антител.

Нами установлено, что титры антител в крови опытных мышей, получавших в течение 5 дней Полизон в дозах 4 и 5 мг/кг, выше, чем аналогичный показатель в контрольной группе.

Учитывая генетически обусловленные различия в силе иммунного ответа у мышей разных генотипов, действие Полизона на показатели гуморального иммунитета изучено не только у «высокоотвечающих» на эритроциты барана мышах линии $C_{57}VI$, но и на мышах линии СВА. Следует отметить, что средние величины содержания АОК, РОК в селезенке и титра антител в сыворотке крови у мышей линии $C_{57}VI$ были ниже соответствующих показателей у мышей линии СВА. Так во второй опытной группе мышей линии СВА титр гемагглютининов на 5 день иммунизации эритроцитами барана составил $12,9 \pm 0,51$ (по сравнению с контролем - $7,9 \pm 0,42$), а у мышей второй опытной группы мышей линии $C_{57}VI$ аналогичный показатель составил только $9,22 \pm 0,30$ (по сравнению с контролем - $6,8 \pm 0,50$).

Таким образом, можно сделать вывод, что при пятикратном применении Полизона в дозах 4 и 5 мг/кг на фоне субоптимальной иммунизации мышей эритроцитами барана происходит достоверный прирост числа антителопродукторов.

2.2.2 Влияние Полизона на функциональную активность перитонеальных макрофагов

Нами изучено влияние Полизона на некоторые функции макрофагов: способность к фагоцитозу частиц латекса, восстановление нитросиннего тетразолия (НСТ) в диформазине, а также лизосомальную активность этих клеток. Действие Полизона оценивали *in vivo* и *in vitro*. В последнем случае различные дозы Полизона вносили в культуральную среду в концентрациях 10-5 - 10-3 М и оценивали по результатам теста с трипсиновым синим, что не нарушало жизнеспособности макрофагов (таблица 2).

Как видно из таблицы 2 применение Полизона в дозах 4 и 5 мг/кг приводило к стимуляции не только активности, но и интенсивности фагоцитоза, что нашло отражение в повышении фагоцитарного числа. Так фагоцитарное число в опытной группе, получавшей Полизон, составило $4,59 \pm 0,39$, что на 14,81% больше, чем в контроле. ($3,91 \pm 0,32$)

2 Влияние Полизона на функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей

Показатели	Полизон (5 мг/кг)	P	Контроль	P
Фагоцитоз частиц латекса:				
% фагоцитирующих макрофагов	72,3±3,3	<0,01	50,1±1,6	<0,01
Фагоцитарное число	4,59±0,39	<0,01	3,91±0,32	<0,01
НСТ –тест				
% активных макрофагов	39,6±4,9	<0,01	24,2±0,92	<0,01
Индекс активации макрофагов	0,44±0,39	<0,01	0,29±0,01	<0,01
Суммарная лизосомальная активность	1,15±0,19	<0,01	1,56±0,13	<0,01

Нами также отмечено регулирующее влияние Полизона в дозе 5 мг/кг на мононуклеарные фагоциты. При этом происходило достоверное увеличение количества макрофагов фагоцитирующих частицы латекса, кроме того, отмечалось увеличение содержания клеток с отложением диформаза в цитоплазме и повышение индекса активизации макрофагов в НСТ - тесте. Свечение лизосом под действием Полизона в дозе 5 мг/кг уменьшалось, что нашло отражение в существенном снижении показателя лизосомальной активности.

Таким образом, направленность действия Полизона на перитонеальные макрофаги в системах *in vitro* и *in vivo* совпадала и указывала на наличие у него регулирующего действия на иммунные реакции.

Кроме того, при постановке реакции «Трансплантат против хозяина» применение Полизона в испытуемых дозах 4 и 5 мг/кг не приводило к достоверному изменению индекса ретракции по сравнению с контролем.

223 Влияние Полизона на реакции клеточного иммунитета

Действие Полизона на клеточный иммунный ответ оценивали в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана и динитрофторбензолу на мышах линии C₅₇Bl и СВА.

Средний процент увеличения отека ушей у мышей опытных групп, за счет выработки медиаторов воспаления, под действием ДНФБ, был достоверно ниже аналогичного показателя в контрольной группе. Это говорит о том, что Полизон в испытуемых дозах (4 и 5 мг/кг) способен ингибировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа в ответ на раздражитель (ДНФБ).

При сравнении развития реакции гиперчувствительности замедленного действия до и после сенсибилизации мышей эритроцитами барана, методом лапки, у животных, получавших Полизон в испытуемых дозах, также отмечена пониженная реакция по сравнению с контролем.

С целью более полного изучения Полизона на клеточно-опосредованные

иммунные реакции нами применялся метод формирования ГЗТ у мышей линии $C_{57}Bl$ и СВА внутривенным введением сенсibilизирующей дозы эритроцитов барана ($2 \cdot 10^6$ ЭБ) и сублиantarно разрешающей дозы эритроцитов барана ($2 \cdot 10^8$ ЭБ). По приросту в процентах массы лапки нами определялась интенсивность реакции ГЗТ.

Полизон вводили внутрь за 5 дней до сенсibilизации (для изучения профилактического влияния) или через 5 дней после сенсibilизации (для изучения лечебной активности).

Нами установлено, что при профилактическом и лечебном введении Полизона мышам линий $C_{57}Bl$ и СВА в испытуемых дозах 4 и 5 мг/кг отмечается уменьшение РГЗТ по сравнению с контрольными животными. Необходимо также отметить, что при профилактическом (до сенсibilизации) назначении Полизона угнетение РГЗТ в ответ на введение эритроцитов барана более выражен, чем при лечебном (после сенсibilизации) его назначении.

Таким образом, можно сказать, что Полизон обладает выраженной способностью подавлять реакцию гиперчувствительности замедленного типа в ответ на сенсibilизирующие факторы.

2.2.4 Изучение возможного отдаленного нейротоксического действия Полизона на кур

Под отдаленным (замедленным) нейротоксическим действием (ОНД) понимают двигательные расстройства нервной системы, которые возникают постепенно после определенного латентного периода (14-21 день), обычно после перенесенного острого отравления. Этим ОНД отличается от других проявлений нейротоксичности, которые могут сопутствовать отравлению многими веществами.

При однократном введении в желудок цыплят - бройлеров Полизона в дозе 1625,0+67,04 мг/кг клиническая картина интоксикации характеризовалась возникновением периодических генерализованных судорог (на фоне общего сопора), диарей, отказом от пищи. Гибель кур наступала, как правило, на 3 сутки после введения препарата с признаками сильной гипотермии, атаксии, параличей и парезов конечностей.

Наблюдения за выжившими птицами в течение 40 дней эксперимента не выявили у них развития симптомов ОНД: нарушения двигательной активности (атаксии), возникновения вторичных парезов и параличей конечностей.

Исследование активности фермента-мишени ОНД - нейротоксической эстеразы в головном мозге кур показало, что Полизон в полулетальной дозе в отличие от препаратов, обладающих выраженным нейropатологическим действием, не оказывает существенного влияния на этот фермент, что выражалось отсутствием достоверного снижения НТЭ как через 24 и 48 часов, так и на 3 сутки опыта, тогда как ингибирование НТЭ у птиц контрольной группы, которые получали среднетоксические дозы афоса, в те же сроки составляло 80-90%.

Таким образом, Полизон не обладает отдаленным нейротоксическим эффектом.

2.2.5 Влияние Полизона на организм свиней

2.2.5.1 Изучение влияния Полизона на прирост живой массы поросят

На сегодняшний день перед всеми производителями в сельском хозяйстве главенствующей задачей является производство высококачественного мяса по конкурентноспособным ценам. В свою очередь повышение экономического давления на производителей продуктов животноводства требует более эффективного использования общепринятых компонентов кормов и поиска возможностей использования более дешевых ингредиентов.

3 Показатели среднесуточного прироста массы и сохранности поросят

Наименование препарата	Доза, мг/кг	Кол-во жив-х в группе, гол.	Масса поросят до опыта, кг	Масса поросят после опыта, кг	Пало во время опыта, гол.	Абсолютный прирост, кг	Относительный прирост, %	Среднесуточный прирост, г
Полизон	2	20	28,2± 2,22	43,3± 3,90	–	15,1	53,54	0,503± 0,02
Полизон	3	20	27,9± 2,25	43,1± 4,10	–	15,2	54,48	0,507± 0,03
Контроль	–	20	27,8± 2,21	39,15± 2,29	2	11,35	40,82	0,378± 0,02

Примечание: P<0,01

Среднесуточный прирост живой массы был наиболее высоким у поросят, которые получали Полизон в дозах 2 и 3 мг/кг. Следует отметить, что из опытной группы не заболело и не пало ни одного животного, тогда как в контрольной группе пало и заболели 2 поросенка, что составило 10%. Относительный и абсолютный прирост массы тела, которые показывают рост животных, были наиболее высокими в обеих опытных группах во все периоды опыта.

Таким образом, применение Полизона способствует повышению роста и развитию поросят.

2.2.5.2 Влияние Полизона на аминокислотный состав крови поросят

Известно, что протеиновая питательность кормов определяется качеством протеина. Свободные аминокислоты в отличие от жиров, углеводов, минеральных веществ и витаминов в организме не депонируются, приток их должен быть постоянным и ритмичным. При недостатке в рационе даже одной незаменимой аминокислоты животное пополняет ее за счет поедания большего количества корма, затраты которого в этом случае на получение единицы продукции увели-

чиваются и, более того, ухудшается использование всех питательных веществ рациона.

Свободные аминокислоты крови и плазмы могут служить показателем белкового питания. При несбалансированном белковом и аминокислотном кормлении животных, в частности при недостатке в нем лизина и метионина, либо при нарушении их усвояемости из корма, отмечается понижение аминокислот в плазме крови, а соответственно уменьшается их использование в качестве строительного материала для тканей организма животных.

При введении в рацион поросят Полизона в дозах 2 и 3 мг/кг на фоне увеличения общего белка в плазме крови также отмечается и достоверное ($P < 0,05$) увеличение в ней незаменимых аминокислот. При этом наиболее значительные изменения в аминокислотном составе проявлялись в увеличении так называемых критических незаменимых аминокислот - лизина и метионина. Так, по сравнению с контролем, содержание лизина в плазме крови увеличилось на 21,58%, при применении Полизона в дозе 2 мг/кг, и на 53,24% при применении Полизона в дозе 3 мг/кг.

Содержание метионина увеличилось на 157,14% и 214,29% соответственно. Также нами было установлено значительное увеличение в плазме крови фенилаланина (на 63,39%), гистидина (на 48,70%) и треонина (на 41,18%) при применении Полизона в дозе 3 мг/кг.

Лишь содержание изолейцина в контрольной и опытных группах поросят было стабильным на протяжении всего опыта, что, по-видимому, связано либо с полным его усвоением из корма даже при отсутствии в нем Полизона, либо указывает на отсутствие его стимулирующей активности в отношении усвоения указанной аминокислоты.

Относительно дозировки Полизона, нами было установлено, что наилучшее усвоение аминокислот происходит при добавлении в рацион дозы 3 мг/кг так как при дозе 2 мг/кг усвоение аминокислот из корма было несколько ниже, чем в первом случае.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что Полизон способствуя увеличению в организме заменимых и незаменимых аминокислот, стимулирует рост и развитие за счет их депонирования в организме поросят тем самым, улучшая качество и экологическую чистоту получаемой мясной продукции.

2.2.5.3 Влияние Полизона на воспроизводительную функцию хряков

Решающим показателем качества производителя служат результаты исследования спермы. Высокие экстерьерные показатели и кровность теряют всякое значение, если у производителя выявляют аспермию или неполноценную сперму.

Для изучения влияния Полизона на воспроизводительную функцию хряков нами были сформированы 4 группы животных по 5 голов в каждой. Животные первой, второй и третьей групп с кормом получали Полизон из расчета 2, 3 и 4 мг/кг соответственно, животные четвертой группы служили контролем. Все хряки опытных и контрольной групп были подобраны по принципу аналогов (с оди-

наковой кровностью, живой массой тела, половой нагрузкой и содержащихся на одинаковых рационах кормления).

При исследовании спермы животных опытных и контрольной групп, как в начале, так и в конце опыта не отмечалось каких-либо патологий. Так, сперма всех животных при макроскопическом исследовании имела молочно-белый с сероватым оттенком цвет со специфическим запахом и водянистую консистенцию, напоминающую молоко. Наличия загрязненности, хлопьев, патологического окрашивания и посторонних запахов спермы нами не выявлено.

Нами было установлено, что средний объем эякулята, полученного за одно семяизвержение, в начале опыта во всех группах был примерно одинаков и составлял $239,3 \pm 10,11$ – $244,0 \pm 18,94$ мл.

В конце опыта (по истечении 30 дней) наибольшее увеличение было зарегистрировано во второй опытной группе, животные которой получали Полизон в дозе 3 мг/кг. Так, объем эякулята в этой группе составил $275,13 \pm 5,64$ мл ($P < 0,05$), что было больше по сравнению с контролем на 33,03 мл (12,0%) и на 34,63 мл (12,59%) больше по сравнению с тем же показателем, полученным в этой группе в начале опыта.

Большое значение при оценке качества спермы имеет концентрация в ней сперматозоидов.

Результаты наших исследований показали, что до применения Полизона концентрация спермиев в сперме хряков всех опытных групп была примерно одинаковой и составляла 259–273 млн/мл, что соответствует средней густоте. При применении Полизона во всех опытных группах отмечалось незначительное увеличение концентрации спермиев в 1 мл, но эти показатели были недостоверными ($P > 0,05$). Однако, с учетом объема эякулята, получаемого от хряков второй опытной группы, и концентрации в ней спермиев, в начале опыта весь эякулят содержал $64,45 \pm 0,05$ млрд сперматозоидов, а через 30 дней применения Полизона в дозе 3 мг/кг весь объем эякулята уже содержал $74,28 \pm 0,05$, то есть на 9,83 млрд (13,23%) спермиев больше. По сравнению же с контролем этот показатель был больше на 11,33 млрд (15,26%) ($P < 0,001$).

Достоверное увеличение общего количества сперматозоидов во всем объеме эякулята было установлено в 1 и 3 опытных группах ($P < 0,005$), однако эти показатели были несколько ниже, чем во второй группе.

Среди спермиев в эякуляте всех видов животных всегда имеется более или менее значительное количество патологических форм, от наличия которых может существенно измениться их оплодотворяющая способность.

При исследовании мазков для определения количества патологических и незрелых форм сперматозоидов нами было установлено, что во всех группах в начале опыта, а также в контрольной группе по окончании опыта в эякуляте отмечалось наличие значительного количества патологических форм сперматозоидов, что указывало на недостаток электролитов в жидкой среде эякулята.

При исследовании мазков спермы хряков опытных групп после 30 дневного применения Полизона нами было установлено достоверное уменьшение процента как патологических, так и незрелых форм сперматозоидов.

В опытных группах, где животным задавался Полизон во всех испытуемых

дозах, заметно изменился электролитный состав эякулята. На фоне повышения рН увеличивается содержание калия и хлорида натрия, основных элементов, необходимых для поддержания нормального осмотического давления и обеспечения двигательной активности сперматозоидов. Наиболее качественные изменения электролитного состава спермы произошли во второй группе, где рН стала более щелочной на 0,13 Н⁺, а содержание калия и NaCl увеличилось на 8,59 мг% (3,51%) и 5,15 мг% (1,08%) соответственно по сравнению с контролем.

В начале опыта показатели активности сперматозоидов находятся на уровне 7,89-8,00 баллов, а выживаемость сперматозоидов на уровне, при котором возможно использование спермы для оплодотворения (минимум 7 баллов), составляла 36 часов с момента окончания эякуляции. Однако по истечении 30 дней, в течение которых хряки опытных групп получали Полизон, этот срок значительно продлился. Так, в первой опытной группе сперма сохраняла активность на уровне 7 баллов до 60 часов, во второй и третьей опытных группах - до 72 часов, тогда как в контрольной группе хряков активность сперматозоидов уже к 48 часам после эякуляции составляла только $5,44 \pm 0,57$ баллов с преобладанием спермиев с маневжными движениями, а через 72 часа в поле зрения микроскопа были видны лишь единичные экземпляры сперматозоидов с правильным поступательным движением.

Завершающим этапом оценки влияния Полизона на воспроизводительные свойства хряков послужила биологическая проба, направленная на определение оплодотворяющей способности сперматозоидов, так как даже всесторонние лабораторные исследования спермы иногда не могут отражать ее качеств.

С этой целью хряков опытных и контрольной групп по истечении тридцати суток со дня начала исследований случали со здоровыми ремонтными свиноматками с последующей регистрацией наступления их супоросности.

Оплодотворяющая способность сперматозоидов в начале опытов находилась примерно на одном уровне и составляла около 65%. В опытных группах, после тридцатидневного скормливания Полизона в дозах 2, 3 и 4 мг/кг, оплодотворяющая способность спермиев значительно выросла. Так, в первой опытной группе оплодотворяемость составила $71,12 \pm 2,4\%$, во второй - $76,85 \pm 1,7\%$ и в третьей - $74,33 \pm 0,85$ ($P < 0,005$), что больше по сравнению с контролем на 5,34; 11,07 и 8,55% соответственно.

2.2.5.4 Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса при применении Полизона

Увеличение производства сельскохозяйственной продукции, улучшение ее качества (увеличение содержания в них белка, жира, аминокислот, витаминов, макро- и микроэлементов) и повышение сохранности является актуальной задачей

Добавление в рацион свиней Полизона в дозе 2 и 3 мг/кг способствовало также улучшению биохимических показателей мяса благодаря накоплению в органах и тканях макро- и микроэлементов. На это указывают данные, полученные при наших исследованиях.

Так, наибольшее возрастание за весь период опыта по сравнению с контро-

лем было отмечено в 1 группе, где показатели содержания натрия, калия, кальция, магния, фосфора и железа имели тенденцию к повышению (содержание натрия в начале опыта находилось в пределах $40,9 \pm 2,15$ мг%, в конце опыта $46,8 \pm 2,74$ мг%; калия - в начале опыта $306,0 \pm 1,56$ мг%, в конце опыта $352,1121,64$ мг%; кальция - в начале опыта $7,81 \pm 0,15$ мг%, в конце опыта $8,75 \pm 0,15$ мг%; магния - в начале опыта $24,0 \pm 0,98$ мг%, в конце опыта $27,2 \pm 0,94$ мг%; фосфора - в начале опыта $202,0 \pm 5,31$ мг%, в конце опыта $228,0 \pm 11,44$ мг%; железа - в начале опыта $1,29 \pm 0,05$ мг%, в конце опыта $1,65 \pm 0,04$ мг%.

2.2.6 Гистологическое изучение влияния Полизона на структуру печени

2.2.6.1 Влияние Полизона на структуру печени крыс

При воздействии вещества в дозе 30 мг/кг в печени крыс особых структурных изменений не выявлено. На 14 сутки отмечено небольшое увеличение белка в цитоплазме гепатоцитов (++), т.е. интенсификация белкового обмена. К 21 дню эксперимента в цитоплазме гепатоцитов количество белка увеличивается до (+++), но в части печеночных клеток появляются признаки слабо выраженных дистрофических процессов.

Морфологические изменения в виде относительно крупных отложений глыбок белка в цитоплазме гепатоцитов появляются при дозе 60 мг/кг (++++) уже на 5 сутки. В дальнейшем в гепатоцитах нарастают дистрофические процессы, цитоплазма клеток опустошается. Воспалительных явлений в виде клеточных инфильтратов не обнаружено. Пролиферативная активность Купферовских клеток возрастает, что объясняется, по-видимому, возрастанием цитотоксичности вещества с увеличением дозы.

Степень выраженности патологических процессов возрастает по мере увеличения дозы. Можно полагать, что введение вещества в дозе 1 г способствует резкому увеличению проницаемости стенок сосудов за счет нарушений в эндотелиальных клетках. Это ведет к агрегации эритроцитов и стазу крови в кровеносных сосудах. Остановка кровотока в синусоидных капиллярах вызывает ишемические явления, от чего животные погибают уже на 4-5 сутки.

Таким образом, по результатам морфологических исследований можно рекомендовать применение вещества в дозе 30-60 мг/кг (предпочтительна доза 30 мг/кг), но сроком не более 14 суток.

2.2.6.2 Морфофункциональные показатели печени свиней-гипотрофиков

Среди всех патологий сельскохозяйственных животных, обусловленных нарушением технологии содержания и кормления, наибольший удельный вес занимают незаразные болезни молодняка. При этом одно из первых мест по частоте, массовости и величине экономического ущерба принадлежит желудочно-кишечным болезням, в частности патологии печени.

Гистологические исследования печени свиней-гипотрофиков в исследуемой группе показали, что печень покрыта тонкой соединительнотканной капсулой

(Глиссона). Имеются отдающие в глубь органа очень тонкие прослойки, которые разделяют его на дольки. Контуры долек печени свиней четко определяются расположением «триад» и находящимися между ними тяжами соединительной ткани. «Триады» составляют междольковые сосуды и желчные протоки. Центром полигональной печеночной дольки является центральная вена. От нее радиально расходятся печеночные балки (трабекулы), построенные из рядов гепатоцитов-печеночных эпителиоцитов. Клетки имеют одно, а иногда и два ядра с хорошо выраженной оболочкой.

Печеночные пластинки разделялись внутридольковыми кровеносными капиллярами - синусоидами. Просвет их в различных участках печеночной дольки неодинаков. В просветах синусоидов выявлены веретеновидные формы с базофильным ядром, синусоидные эндотелиоциты, а также звездчатые ретикулоэндотелиоциты (клетки Купфера), последние имеют округлую или удлинённую отросчатую форму и значительно выступают в просвет синусоида. Внутридольковые капилляры сливаются в центральные вены.

Нами выявлены следующие патологические изменения в печени свиней-гипотрофиков: в срезах вокруг центральных вен с гемостазом обнаруживаются небольшие участки разрушенных гепатоцитов. Клетки набухшие и теряют свои очертания, сливаются. Ядра не просматриваются. Паренхима в некоторых участках теряет пластиночное построение гепатоцитов. В таких участках имеются небольшие зоны круглоклеточной инфильтрации. Многие гепатоциты с признаками выраженной белковой дистрофии с набуханием цитоплазмы и содержанием в ней светлой зернистости. Также отмечаются как, диффузно рассеянные лимфоциты, так и в скоплениях.

Морфологические признаки крупно-капельной жировой дистрофии в виде вакуолей разных размеров больше выявляются в периферических областях. Ядра печеночных клеток в таких областях размыты, хроматин просматривается нечетко. В портальных трактах определяли слабо выраженную лимфофибробластическую инфильтрацию. Более выраженную лимфофибробластическую инфильтрацию в виде скоплений клеток определяли около центральных вен. Иногда в портальных сосудах выражен стаз крови.

Очень часто на гистологических препаратах выявляли небольшие зоны гемостаза в синусоидах, гепатоциты в этих областях также были с признаками белковой дистрофии клеток, то есть набухшие, отечные, с просветленной цитоплазмой.

После скормливания свиньям Полизона в дозе 3 мг/кг в течение 15 суток между строением печени животных двух групп значительных изменений не наблюдали. На гистологических препаратах печени свиней-гипотрофиков первой группы после скормливания Полизона через один месяц отмечали некоторое улучшение со стороны структуры печеночной паренхимы. Они отмечались в выявлении увеличения количества двуядерных клеток. Ядерные мембраны гепатоцитов приобретали более четкие границы и контуры. Хроматин в ядрах просматривался в виде базофильных глыбок. Хотя определялись отдельные участки, особенно вблизи центральных вен, гепатоциты с нечеткими контурами и бледно окрашенными ядрами.

В печени животных второй группы через два месяца признаки вакуолизации цитоплазмы были менее выражены. Ядра клеток становились более четкими, хорошо просматривалась структура синусоидных капилляров, а также выявлялись участки с рядами пролиферирующих гепатоцитов, отличающихся малыми размерами и хорошо окрашенным ядром и цитоплазмой. В основном паренхима печени состояла из плотно прилегающих гепатоцитов, составляющих трабекулярные пластинки. По мере усиления регенерации паренхимы уменьшалось количество участков с признаками жировой дистрофии. Двухядерные гепатоциты обнаружили преимущественно вокруг портальных трактов. В междольковых сосудах явления стаза крови исчезали. В большинстве желчных протоков были интактные структуры, и прослеживалось восстановление паренхимы печени с образованием печеночных пластин.

Таким образом, при применении Полизона в дозе 3 мг/кг в течение 15 дней наступает улучшение состояния паренхимы печени, что выражается в увеличении количества двухядерных гепатоцитов и значительным уменьшением клеточных инфильтратов и соединительнотканых элементов.

ВЫВОДЫ

1. В реакции иммуностимулирующего действия Полизона имеют место следующие механизмы:
 - наряду с увеличением количества РОК, у мышей, получавших Полизон, при иммунизации эритроцитами барана наблюдалось и значительное повышение количества АОК;
 - при пятикратном применении Полизона в дозах 4 и 5 мг/кг на фоне субоптимальной иммунизации мышей эритроцитами барана происходит достоверный прирост числа антителопродуцентов;
 - Полизон в дозах 4 и 5 мг/кг приводит к стимуляции не только активности, но и интенсивности фагоцитоза, что нашло отражение в повышении фагоцитарного числа;
 - применение Полизона в испытываемых дозах 4 и 5 мг/кг не приводит к достоверному изменению индекса ретракции по сравнению с контролем;
 - Полизон обладает выраженной способностью подавлять реакцию гиперчувствительности замедленного типа в ответ на сенсibilизирующие факторы.
2. Полизон не обладает отдаленным нейротоксическим эффектом.
3. Назначение Полизона в дозе 3 мг/кг в течение 15 суток приводит к увеличению относительного и абсолютного прироста массы тела поросят, а также предотвращает их падеж.
4. Полизон в дозе 3 мг/кг при назначении его в течение 15 суток вместе с кормом способствует увеличению в организме заменимых и незаменимых аминокислот, стимулирует рост и развитие за счет их депонирования в организме поросят, тем самым улучшает качество и экологическую чистоту получаемой мясной продукции.

5. Полизон, задаваемый хрякам в дозе 3 мг/кг в составе стандартного рациона в течение 30 дней, повышает количественные и качественные показатели их спермопродукции, позволяет получить доброкачественную, свободную от посторонних примесей сперму, содержащую достаточное количество живых, устойчивых во внешней среде сперматозоидов, способных принять активное участие в оплодотворении.
6. Добавление в рацион свиней Полизона в дозе 3 мг/кг способствует улучшению биохимических показателей мяса благодаря накоплению в органах и тканях макро- и микроэлементов.
7. При воздействии Полизона в дозе 30 мг/кг в печени крыс структурных изменений не выявлено. Однако на 14 сутки отмечается небольшое увеличение белка в цитоплазме гепатоцитов (++), т.е. происходит интенсификация белкового обмена. При скармливании Полизона в дозе 3 мг/кг в составе стандартного рациона пороссятам-гипотрофикам в течение 15 дней наступает улучшение состояния паренхимы печени, что выражается в увеличении количества двуядерных гепатоцитов и значительным уменьшением клеточных инфильтратов и соединительнотканых элементов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Полизон способствует активизации белкового обмена, повышению резистентности организма, улучшению воспроизводительных функций организма свиней, более полному усвоению потребляемых кормов, ускорению темпов роста, увеличению прироста живой массы.

Препарат рекомендуется применять при кормлении свиней, тщательно перемешанным с кормом, индивидуально или групповым методом, в дозе 3 мг/кг живой массы, с лечебной или профилактической целью (наставление по применению препарата подготовлено на основании проведенных испытаний, утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ от 26 июня 2002 года (протокол №2). Регистрационный № ПВР-2-2.2/00969).

Результаты исследований могут быть использованы при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами по ветеринарной фармакологии и внутренним незаразным болезням животных.

Список трудов опубликованных по теме диссертационной работы:

1. Исмагилова А.Ф. Изучение возможного отдаленного нейротоксического действия Полизона. /А.Ф. Исмагилова, Ш.М. Мухаметьянов, Р.Р. Каримов //Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 150 летию ветеринарной службы Оренбуржья «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии». -Оренбург, 2003. -С. 57-58.
2. Каримов Р.Р. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса при применении Полизона. /Р.Р. Каримов, А.Ф. Исмагилова, Р.Ф. Халимов, В.А. Антипов //Материалы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных». -Воронеж, 2004. -С. 550-552.
3. Каримов Р.Р. Влияние Полизона на продуктивность свиней. /Р.Р. Каримов, А.Ф. Исмагилова, Б.П. Струнин, Р.Ф. Халимов //Международная научно-практическая конференция, посвященная 130-летию основания ФГОУ ВПО «Смоленский сельскохозяйственный институт». «Наука - сельскохозяйственному производству и образованию». -Смоленск, 2004. -С. 136-137.
4. Каримов Р.Р. Влияние Полизона на воспроизводительную функцию хряков. //Материалы II Международной, межвузовской научно-практической конференции «Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и образования». -Кинель, 2005.-С. 145-150.

На правах рукописи

Каримов Роберт Раффакович

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИЗОНА И
ОБОСНОВАНИЕ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В СВИНОВОДСТВЕ**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

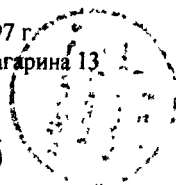
Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Сдано в набор 06.04.04. Подписано в печать 08.04.04
Формат 60х84 1/16. Усл. печ. л. 1.0. Печать оперативная. Бумага офисная
Гарнитура «Times». Заказ № 1205. Тираж 100 экз.

Издательский центр УГАВМ,
Лицензия ЛР № 01252 от 31 декабря 1997 г.
457100, Челябинская область, г. Троицк, ул. Гагарина 13
тел.: (35163) 2-64-75

19 МАЙ 2005



379