

На правах рукописи

ИВАНОВ
Александр Алексеевич

**ПОКАЗАТЕЛИ ЕСТЕСТВЕННОЙ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ
ОТРАВЛЕНИИ ДИОКСИНОМ И ПРИМЕНЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ**

16.00.04 - Ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Казань-2005

Работа выполнена в ФГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт» (г. Казань)

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук
Новиков Валерий Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Конюхов Геннадий Владимирович

доктор ветеринарных наук, профессор
Набиев Фанис Галинурович

Ведущее учреждение: ФГОУ ВПО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия».

Защита состоится " ____ " _____ 2005 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д-220-012.01 при ФГНУ Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте (420075, г. Казань, Научный городок - 2, ВНИВИ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань).

Автореферат разослан "24" марта 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук, с.н.с.  В.И. Степанов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Из экотоксикантов техногенного происхождения большую опасность для человека и животных представляют полихлорированные дибензодиоксины (ПХДД), среди которых наиболее токсичным является 2,3,7,8-тетрахлордибензо-п-диоксин (2,3,7,8-ТХДД), именуемый обобщенным термином диоксин.

Диоксины являются самым токсичным универсальным клеточным ядом, поражающим человека, животных и большинство растений. Особая опасность диоксинов заключается в их высокой устойчивости к биологическому разложению, к действию кислот, щелочей и высоких температур. Необратимый распад диоксинов происходит только при температуре выше 1200 °С, они сохраняются в окружающей среде в течение десятков лет. Период полураспада наиболее токсичного 2,3,7,8-ТХДД составляет в почве свыше 10 лет, в воде 1-2 года, в донных отложениях до 2-х лет (В.В. Куценко, А.Е.Данилина, Е.В. Протопопов, 1997).

Основным источником поступления ПХДД и других диоксиновых ксенобиотиков в организм человека и животных являются пищевые продукты и корма, с которыми поступает 95-98% диоксинов. В организме животных диоксины чрезвычайно стабильны, накапливаются преимущественно в жировой ткани и очень медленно выводятся. Период выведения 2,3,7,8-ТХДД из организма составляет (в днях): у мышей-15, крыс-30, обезьян-455, человека - 5-7 лет.

При диоксиновой интоксикации в патологический процесс вовлекаются практически все органы и системы, превалируют симптомы поражения кожи, печени, желудочно-кишечного тракта, нервной системы. Однако главная опасность диоксинов заключается в их влиянии на иммунную систему.

Продолжительное воздействие диоксина оказывает прямое и опосредованное поражающее воздействие на систему иммунитета и функционально связанную с ней систему кроветворения. Изменения функционирования иммунокомпетентной системы и неспецифических факторов защиты при воздействии диоксином могут оказаться наиболее ранними признаками развивающихся компенсаторных нарушений и патологических состояний, иммунодепрессия может быть результатом чрезвычайного напряжения адаптивных систем организма (Б.М. Борисов, 1998).

Основная опасность диоксинов заключается не столько в их острой токсичности, сколько в проявлении чрезвычайной биологической активности при многократном поступлении в организм животных малых и очень малых доз, в их сверхкумулятивности и способности вызывать отдаленные последствия в виде иммунодепрессивного, мутагенного и эмбриотоксического эффектов. В процессе аккумуляции каждая новая порция диоксина оказывается токсичнее предыдущей.

Данные о токсичности диоксинов, полученные в опытах на животных, свидетельствуют, что максимальной токсичностью обладает собственно диоксин (2,3,7,8-ТХДД), ЛД₅₀ (мкг/кг) которого составляет для: кур-60, овец-200,

крупного рогатого скота-5000, свиней-6000 (А.Л. Лавров и др., 1992; В.А. Желтовидр., 1995).

Специфические средства лечения отравлений диоксином не разработаны, поэтому проводят в основном симптоматическую терапию в зависимости от синдрома интоксикации. Однако симптоматическое лечение диоксиновых интоксикаций малоэффективно. Усугубляет ситуацию и то, что пока неизвестен ни один препарат, способный разрушать или надежно выводить диоксин из организма.

Исследованиями, проведенными в лаборатории техногенных экотоксикантов ВНИВИ (Ю.А. Зимаков, Э.А. Галиев, 2001), было установлено лечебное действие димефосфона при острой интоксикации диоксином. Однако не обоснованы дозы димефосфона, не изучена его эффективность при хронических воздействиях диоксина, влияние на показатели естественной резистентности животных.

На сегодняшний день проблема поиска средств, повышающих естественную устойчивость организма животных к действию диоксина, становится наиболее актуальной вследствие ухудшения экологической обстановки во всем мире.

1.2. Цель и задачи исследований. Целью наших исследований явилось изыскание средств, повышающих устойчивость животных к токсическому действию диоксина.

Исходя из вышеизложенного и в соответствии с государственным заданием «Проведение исследований по разработке и освоению в условиях производства методов и средств предупреждения и ликвидации последствий поражения животных экотоксикантами» (№ госрегистрации 01200202603), необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить влияние диоксина на организм животных в субхроническом и хроническом эксперименте;
2. Изыскать средства, повышающие естественную резистентность организма и определить лечебную эффективность их с учетом клинико-гематологических, биохимических, иммунобиологических, а также гистологических показателей при отравлении животных диоксином;
3. Разработать режимы применения лечебных средств для коррекции естественной резистентности животных при отравлении диоксином.

1.3. Научная новизна работы. Впервые изучено влияние хронической интоксикации диоксином на показатели неспецифической резистентности организма и предложены лечебные средства, повышающие устойчивость животных к данному токсиканту. Установлено, что применение димефосфона улучшает морфологические и биохимические показатели крови, повышает фагоцитарную активность нейтрофилов, увеличивает количество Т- и В-лимфоцитов, концентрацию лизоцима и предотвращает гибель животных при субхроническом и хроническом отравлении диоксином. Определена лечебная эффективность левамизола при хронической интоксикации животных диоксином.

По результатам исследований подана заявка на получение патента.

1.4. Практическая ценность работы. Разработан способ повышения устойчивости животных к диоксину путем введения димефосфона и левамизола. Результаты исследований использованы при разработке «Временного наставления по применению димефосфона при отравлении животных диоксином», «Временного наставления по применению левамизола при хроническом отравлении животных диоксином», утвержденных директором ВНИВИ 24 декабря 2004 года и «Временных предельно допустимых концентраций диоксина для различных видов животных», утвержденных директором ВНИВИ 25 октября 2004 года.

1.5. Основные положения, выдвигаемые на защиту:

1. Клинико-гематологические, биохимические и иммунологические показатели животных при отравлении диоксином.
2. Лечебная эффективность димефосфона и левамизола при хроническом отравлении животных диоксином.

1.6. Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на ежегодных сессиях Ученого совета ВНИВИ по рассмотрению и обсуждению отчетов (2003-2004 гг.); Международной научно-практической конференции по актуальным проблемам Агропромышленного комплекса, Казань, 2003; Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», Ульяновск, 2003; Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии», посвященной 100-летию со дня рождения академика ВАСХНИЛ А.А.Полякова, Москва, 2004; Международной научно-практической конференции «Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве», Чебоксары, 2004; Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных», Воронеж, 2004.

1.7. Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, в которые вошли основные результаты и выводы.

1.8. Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 25 таблицами, 10 рисунками, 12 фотографиями, состоит из введения, обзора литературы, результатов исследований, выводов, практических предложений. Литературный указатель содержит 188 источника, включая работы 95 отечественных и 93 зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в лаборатории контроля и индикации техногенных экотоксикантов Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института с 2001 по 2004 год.

Исследования проводили на белых крысах и кроликах. Группы животных подбирали по принципу аналогов с учетом породы, возраста, пола и массы тела.

Условия проведения опытов, схемы, вид и количество используемых при этом животных, дозировки, кратность применения препаратов приведены в соответствующих разделах работы.

Для экспериментального исследования использовали 2,3,7,8 - ТХДД (2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксин), который задавали животным с кормом в виде масляного раствора в дозах 1/10, 1/100 ЛД₅₀ для кроликов и 1/200 ЛД₅₀ для крыс.

В качестве лечебно-профилактических препаратов использовали димефосфон и левамизол.

Димефосфон - диметилвый эфир (1,1-диметил-3-оксобутил фосфоновой кислоты), выпускается во флаконах в виде 15%-ного водного раствора и представляет собой прозрачную или слегка опалесцирующую жидкость со своеобразным запахом и горьким вкусом, pH раствора от 2,0 до 4,0. Он оказывает нормализующее действие на метаболические процессы, проявляет антиацидотический, мембраностабилизирующий, противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты. Димефосфон выпаивали ежедневно с водой в дозе для кроликов 100 мг/кг; для крыс - 75 мг/кг массы животного.

Левамизол - 2,3,5,6 - тетрагидро-6-фенилимидазо - [2,1-*b*] - тиазола-гидрохлорид. Белый аморфный или кристаллический порошок, легко растворим в воде. Выпускают во флаконах с содержанием 75 мг левамизола в 1 мл раствора. Применяют при иммунодефицитных состояниях в качестве иммуномодулятора.

Опытным группам кроликов внутримышечно вводили 7,5% раствор левамизола в дозе 2,5 мг/кг массы тела в течение 3 дней, после 4-х дневного перерыва еще проводили два цикла введения препарата с перерывом в 4 дня. Всего курс лечения состоял из девяти инъекций. Белым крысам левамизол выпаивали с водой в дозе 2,5 мг/кг массы тела по той же схеме, что и кроликам при внутримышечном применении.

До начала затравки диоксином, затем на 10, 20, 30, 40, 50 и 60 суток проводили клинико-гематологические исследования, включающие определение массы тела, температуры, частоты пульса и дыхательных движений, содержание эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов, выводили лейкоцитарную формулу общепринятыми методами.

При биохимических исследованиях устанавливали содержание общего белка на рефрактометре RL-1 и белковых фракций сыворотки крови фотоколометрическим способом при помощи КФК-2. Активность лизоцима в сыворотке крови определяли нефелометрическим методом (Ю.М. Марков и др., 1974), основанном на способности лизоцима растворять мукополисахариды оболочки ряда бактерий. В качестве стандарта для определения титра лизоцима в испытуемом материале служила однодневная культура *Micrococcus Lysodeicticus*.

Как один из показателей естественной резистентности определяли фагоцитарную способность нейтрофилов (С.А. Кост, М.И. Стенко, 1968). Объектом фагоцитоза служила однодневная культура *St. Aureus* с наличием 1 млрд. клеток в 1 мл. Определяли фагоцитарную способность нейтрофилов по показа-

телям фагоцитоза: фагоцитарной активности, фагоцитарному индексу и фагоцитарному числу.

Уровень Т-лимфоцитов в периферической крови определяли методом спонтанного розеткообразования с гетерогенными эритроцитами. Метод основан на способности тимезависимых лимфоцитов образовывать спонтанные розетки с эритроцитами, благодаря наличию рецепторов на мембране Т- лимфоцитов, образующих иммунную связь с поверхностными антигенами гетерологических эритроцитов.

Идентификацию В-лимфоцитов проводили методом ЕАС-розеток. Принцип метода заключается во взаимодействии мембраны В-клеток с эритроцитами, «нагруженными» комплементом, с образованием розеток (Х. Фримель, И. Брок, 1986).

Для гистологических исследований от убитых животных брали кусочки печени, почек, сердца, селезенки, заливку в парафин осуществляли по схеме Волковой - Елецкова (1996). Окраску гистопрепаратов производили гематоксилин - эозином по Ганзену (Г.А. Меркулов, 1996). Патоморфологические исследования проводили совместно с доцентом Титовым В.В., которому автор выражает искреннюю благодарность за оказанную помощь.

Экспериментально полученный цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel 2000.

2.2. Влияние димефосфона на организм кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/10 ЛД₅₀

В механизме токсического действия диоксинов ведущим является их ингибирующее влияние на факторы неспецифической защиты, иммунную систему и функционально связанную с ней систему кроветворения. Нами были проведены исследования по изысканию средств, повышающих естественную резистентность и иммунобиологическую реактивность организма, оказывающих положительное влияние на гемопоэз животных. На первом этапе в качестве лечебного средства при интоксикации животных диоксином был отобран димефосфон.

Опыты проводили на 8 кроликах, которые были разделены на две группы: опытную и контрольную. Диоксин животным обеих групп вводили в виде масляного раствора ежедневно в течение 10 дней в дозе 3,0 мкг/кг массы тела, что составляет 1/10 ЛД₅₀ для кроликов. Второй группе наряду с диоксином ежедневно выпаивали димефосфон в дозе 100 мг/кг массы животного.

Установлено, что при ежедневном введении диоксина в дозе 1/10 ЛД₅₀ кроликам в течение 10 дней внешние признаки интоксикации появлялись на 4-6 сутки в виде общего угнетения, вялости, понижения аппетита, взъерошенности шерстного покрова, диареи, истощения, затем наступала гибель животных (из 4-х кроликов пало 2 на 27 и 30 сутки с начала затравки). Во второй группе животных, где наряду с диоксином выпаивали димефосфон, признаки интоксикации наблюдались несколько позднее, на 8-12 сутки, при этом показатели тем-

пературы, пульса, дыхания на протяжении всего опыта находились в пределах физиологической нормы.

В контрольной группе кроликов количество эритроцитов на 20, 30, 50 и 60 сутки уменьшалось на 22, 31, 14 и 23%, уровень гемоглобина в эти сроки снижался на 14, 19,9 и 13% соответственно.

В опытной группе животных содержание эритроцитов снижалось на 20 и 30-й день на 11 и 21%, к 50 дню их количество повышалось до уровня фоновых величин.

Содержание гемоглобина в крови кроликов опытной группы снизилось на 30 сутки на 12%, затем его величина стала постепенно повышаться и на 60 сутки была на 11% выше фона.

Таким образом, применение димефосфона нормализует содержание эритроцитов и гемоглобина при отравлении животных диоксином.

Анализируя данные лейкоцитарной формулы крови животных опытной и контрольной групп, выявлено, что при заправке кроликов диоксином происходит снижение лейкоцитов на 20, 30 и 50 день на 15, 23 и 34% соответственно за счет палочкоядерных нейтрофилов. Количество моноцитов в это время увеличивалось на 20, 29 и 26%. При отравлении диоксином и применении димефосфона наблюдалось незначительное снижение количества лейкоцитов. Уровень моноцитов повышался, но в меньшей степени, чем в контрольной группе, что свидетельствует о менее тяжелом течении отравления диоксином.

При введении животным в течение 10 дней 1/10 ЛД₅₀ диоксина содержание общего белка и альбуминов колебалось на уровне фоновых величин, в то же время отмечали повышение концентрации **β-глобулинов** с 20 по 60 день на 50-76% и снижение **γ-глобулинов** на 19-35%.

При отравлении диоксином и применении димефосфона количество общего белка на 30-е сутки повышалось на 15%, в последующем концентрация его постепенно снижалась и на 60 сутки возвращалась к фоновой величине.

Содержание альбуминов с первых дней опыта возрастало и на 30 сутки было выше фоновых величин на 21%. Количество **α-глобулинов** на 30 сутки было меньше фонового показателя на 12 %, к 50 дню исследований возвращалось к исходному уровню. Количество **β-глобулинов** на протяжении всего опыта колебалось на уровне фоновых данных.

Сравнивая результаты биохимических исследований сывороток крови контрольной и опытной групп можно проследить, что применение димефосфона при отравлении опытных животных диоксином в дозе 1/10 ЛД₅₀ оказывает положительное влияние на показатели белкового обмена.

У опытных животных, получавших димефосфон, снижение концентрации **γ-глобулинов** было менее выраженным и последующее восстановление содержания их происходило значительно быстрее, чем у контрольных.

У контрольных животных, отравленных диоксином, активность лизоцима в крови на 20, 30, 50 и 60-е сутки снижалась на 25, 28, 32 и 38% соответственно. У опытных животных, получавших с водой димефосфон, активность фермента на 10, 20 и 60-й день была повышена на 19, 47 и 30% ($p < 0.05$).

При затравке кроликов диоксином в дозе 1/10 ЛД₅₀ на 10 день введения токсиканта наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов на 40%, на 50 сутки их содержание увеличивалось, но не достигало исходных показателей и было на 18% ниже фонового уровня. Количество В-лимфоцитов на 10 сутки понизилось на 11%, на 20,30 день число их уменьшилось на 16 и 43%, к 60 суткам - возросло на 25% по сравнению с фоном.

Содержание Т-лимфоцитов у животных опытной группы на 10,20 сутки понизилось на 39, 45%, затем стало повышаться и на 60 сутки составило 22% ниже фона. Содержание В-лимфоцитов на 10 сутки понизилось на 11%, на 20 и 30 день снижение составляло 16 и 43%. К 60 дню их количество возросло на 25% от фонового уровня.

2.3. Влияние димефосфона на организм кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀

Изучение влияния димефосфона при отравлении животных диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ проводили на кроликах, которые были разделены на две группы: опытную и контрольную. Диоксин животным обеих групп вводили в виде масляного раствора ежедневно в течение 30 дней в дозе 0,3 мкг/кг массы тела, что составляет 1/100 ЛД₅₀ для кроликов. Опытной группе наряду с диоксином ежедневно выпаивали димефосфон в дозе 100 мг/кг массы животного.

При хроническом отравлении кроликов в течение 30 дней в дозе 1/100 ЛД₅₀ внешние признаки интоксикации животных начинали появляться на 9-13 сутки от начала затравки. Наблюдалось снижение массы тела на 20 и 30 день на 17 и 14%. Температура тела на протяжении всего периода затравки была в пределах физиологической нормы.

Содержание эритроцитов у контрольных животных на 50 и 60 сутки после начала затравки уменьшалось на 30 и 31%, уровень гемоглобина на 20, 30, 40, 50 и 60 сутки снизился на 16, 18, 19,21 и 23 % соответственно от фонового показателя ($p < 0.05$).

В опытной группе животных, где наряду с диоксином кролики получали димефосфон, масса тела колебалась в пределах исходных величин. Количество эритроцитов на 10,20 и 30 сутки повысилось на 14,26 и 40%, на 60 день опыта их содержание возвращалось к фоновой величине.

Уровень гемоглобина в крови кроликов, получавших димефосфон на 10, 20 и 30 сутки был повышенным на 12, 21 и 39% соответственно. К 60 дню содержание гемоглобина возвращалось к фоновому показателю.

Результаты полученных данных свидетельствуют, что применение димефосфона повышало уровень эритроцитов и гемоглобина в крови опытных животных по сравнению с показателями в контрольной группе, когда кроликам многократно в малых дозах вводили диоксин и, где наблюдалось стабильное понижение количества, как эритроцитов, так и гемоглобина (Рис. 2.1,2.2).

Количество общего белка в крови контрольных кроликов при затравке диоксином колебалось в пределах фоновых величин. У опытных животных, получавших наряду с диоксином димефосфон, его содержание увеличивалось на 20% к 10 суткам наблюдений, а затем на 30 сутки постепенно снижалось до фоновой величины.

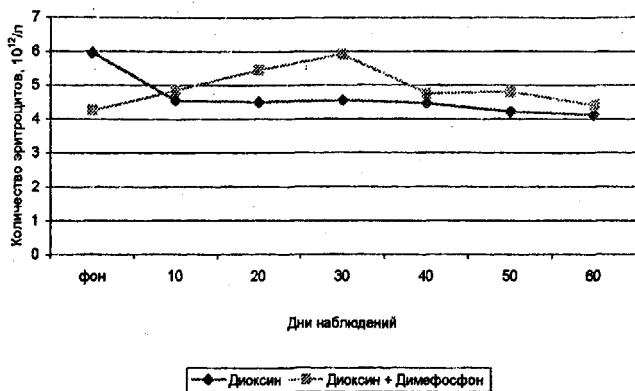


Рис. 2.1 - Содержание эритроцитов в крови кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ и применении димефосфона

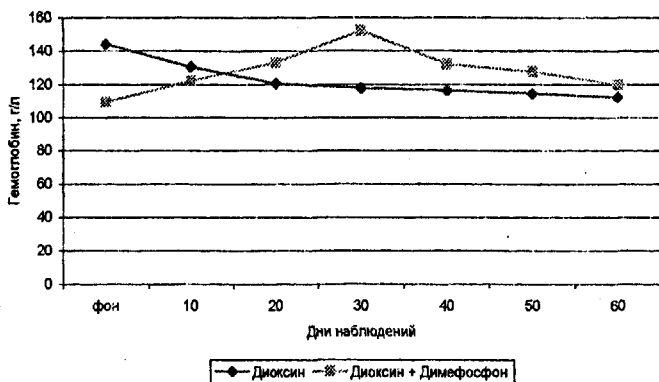


Рис. 2.2 - Содержание гемоглобина в крови кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ и применении димефосфона

Содержание альбуминов в контрольной группе животных на 10 и 30-е сутки снизилось на 26 и 27 % соответственно, в течение последующих 30 дней снижение этих фракций колебалось в пределах 21-25%. Концентрация альбуминов в сыворотке крови опытных кроликов на 10 и 20 день снижалась на 13,40 и 16,30%, что в два раза меньше, чем в контроле.

Содержание **β-глобулинов** при отравлении кроликов диоксином повышалось на 10, 20 и 60 сутки на 96,88 и 95% соответственно. Применение диме-

фосфона несколько нивелировало токсическое действие диоксина, в связи с чем увеличение количества р-глобулинов у опытных животных было в два раза меньше, чем у кроликов контрольной группы, что свидетельствует о более благоприятном течении отравления.

Активность лизоцима в контрольной группе животных на 10, 20, 30 и 40 сутки снижалась на 12, 15, 31 и 37%, к концу наблюдений на 50 и 60 сутки снижение составляло 48 и 51% от фона. В опытной группе, где дополнительно выпаивали димефосфон, активность лизоцима в начале находилась в пределах исходных величин, на 30 и 40 сутки повышалась на 5 и 16%, а к 50 и 60 суткам она увеличивалась на 17 и 22% соответственно (Рис. 2.3).

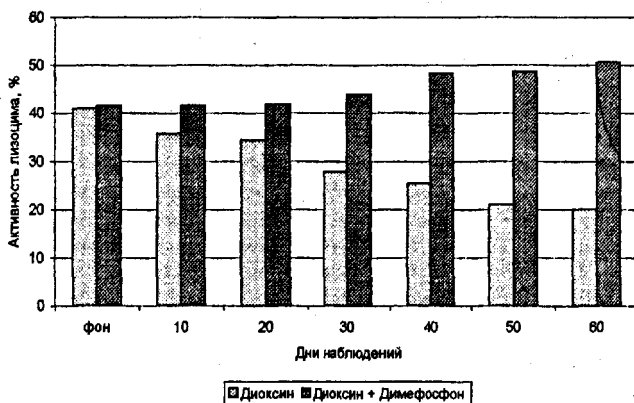


Рис. 2.3 - Активность лизоцима сыворотки крови кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ и применении димефосфона

При отравлении кроликов диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ относительное содержание Т-лимфоцитов на 10 и 20 сутки оставалось в пределах исходных величин, на 30 и 40-й день исследований по сравнению с фоновым показателем количество их увеличивалось на 15 и 17%. Содержание В-лимфоцитов у контрольных животных на 10, 20 и 30 день колебалось на уровне исходных данных, к концу опыта, на 50 и 60 сутки превышение фоновых величин составляло 11 и 15%.

В опытной группе животных количество Т-лимфоцитов повышалось на 10 сутки на 11%, на 40 сутки - на 38%, к концу опыта на 60-й день содержание их превышало фоновый показатель на 59%. В - лимфоциты у опытных животных стабильно повышались на протяжении всего опыта и на 60 сутки их количество превышало фоновую величину в 2 раза.

Таким образом, пероральное введение димефосфона кроликам оказывало положительное влияние на иммунологические показатели животных, "что

характеризовалось количественным увеличением Т- и В-лимфоцитов при интоксикации диоксином, повышением лизоцимной активности сыворотки крови.

• **2.4. Влияние димефосфона на организм белых крыс при отравлении диоксином в дозе 1/200 ЛД₅₀**

Наряду с опытами на кроликах были проведены исследования по применению димефосфона при отравлении диоксином белых крыс.

Использование при отравлении диоксином иммуностимулятора и мембраностабилизатора димефосфона оказывает благоприятное влияние на морфологические и биохимические показатели крови, что проявляется в повышении уровня эритроцитов и гемоглобина, оптимизации лейкоцитарного профиля крови.

Применение димефосфона нормализовало соотношение белковых фракций крови, что говорит о стабилизации функции печени животных при диоксиновой интоксикации.

Результаты проведенных исследований показывают, что при многократном введении малых доз диоксина лабораторным животным происходит достоверное снижение показателей фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса и фагоцитарной емкости, относительного содержания Т- и В-клеток, уменьшается активность лизоцима.

В опытной группе белых крыс, где наряду с диоксином выпаивали димефосфон, количество лейкоцитов оставалось в пределах фоновых величин. Показатели фагоцитарной активности, фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса, фагоцитарной емкости, активности лизоцима по сравнению с фоновыми данными существенно не изменялись, что говорит о благоприятном действии применяемого препарата.

2.5. Влияние левамизола на организм кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀

В данном разделе работы приведены результаты исследований по изучению возможности использования левамизола для коррекции неспецифической резистентности[™] животных при отравлении диоксином. Сведения относительно потенциальной возможности влияния левамизола на иммунологические процессы противоречивы, однако большинство исследователей считают, что основное действие левамизола проявляется в восстановлении функции лимфоцитов и фагоцитов в иммунодефицитном состоянии организма.

Изучение лечебного действия левамизола при отравлении животных диоксином проведено на кроликах-самцах, разделенных на две группы: контрольную и опытную. Животным обеих групп в течение 30 дней задавали масляный раствор диоксина в дозе 1/100 ЛД₅₀, опытной группе кроликов дополнительно вводили внутримышечно 7,5%-ный раствор левамизола в дозе 2,5 мг/кг массы тела в течение 3 дней. После четырехдневного перерыва еще проводили два цикла введения препарата с перерывом в 4 дня, всего курс лечения состоял из 9 инъекций левамизола.

В контрольной группе, где животным вводили только диоксин, количество эритроцитов понижалось на 20, 30, 40, 50 и 60 сутки на 23, 24, 25, 29 и 31%, гемоглобина - на 16,18,11,21 и 22% соответственно, тогда как в опытной группе кроликов, получавших левамизол, содержание эритроцитов на 10 и 20 сутки повышалось на 13 и 11%, гемоглобина - на 14 и 16% от фоновых величин, в последующем гематологические показатели возвращались к исходным результатам. Следовательно, введение левамизола предотвращало нарушение содержания эритроцитов и гемоглобина, вызванной диоксиновой интоксикацией.

В лейкоцитарной формуле у животных контрольной группы наблюдалось снижение количества лейкоцитов на 10 сутки опыта на 36%, которое затем постепенно восстанавливалось и на 30, 40 сутки было понижено на 11%. На 60 сутки исследований содержание лейкоцитов в крови контрольных животных снова снижалось на 29% от фонового уровня.

Количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов на протяжении всего периода исследования стабильно понижалось, в результате чего к 60 суткам содержание их было ниже исходных данных на 34 и 30% соответственно. Число лимфоцитов, начиная с 10 суток было повышенным, на 60 день опыта их количество превышало фоновую величину на 26,6%. Эозинофилы также увеличивались, количество их к 60 суткам повышалось на 77%. Содержание моноцитов по ходу всего исследования существенно не изменялось.

В опытной группе животных, где наряду с затравкой диоксином дополнительно вводили левамизол, количество лейкоцитов уменьшалось и на 20 сутки отравления было ниже исходного уровня на 31%, затем происходило постепенное восстановление их количества и на 60 день исследований оно находилось на уровне фоновых величин. Повышение эозинофилов происходило на 20 и 30 сутки затравки диоксином в 2,3 и 2 раза от фонового показателя соответственно, на 60 сутки содержание их было на уровне исходной величины.

Содержание палочкоядерных нейтрофилов в первые 20 дней затравки колебалось в пределах фоновых величин, на 50 и 60 день опыта наблюдалось их снижение на 43 и 29%. Сегментоядерные нейтрофилы понижались на протяжении всего периода исследования и были ниже исходных данных на 20, 30, 40, 50 и 60 сутки на 9, 44, 20, 15, 44 и 16% соответственно. Количество лимфоцитов постепенно возрастало и к концу опыта повышалось на 17%. Моноциты в течение всего исследования находились в пределах фоновых показателей.

Таким образом, пероральное введение диоксина в течение 30 дней в дозе 0, 3 мкг/кг массы тела приводит к снижению количества лейкоцитов с преимущественным уменьшением содержания палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, что характерно для развития токсикоза. Применение левамизола оказывало благоприятное влияние на лейкограмму животных, о чем свидетельствует нормализация количественного соотношения отдельных форм лейкоцитов.

Хроническая затравка животных диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ приводит к нарушению белкового обмена у кроликов, характеризующегося уменьшением количества альбуминов и **α-глобулинов** и существенным увеличением со дер-

жания β - и γ -глобулинов. Применение лечебного препарата левамизола не вызвало существенного улучшения белкового состава крови.

Фагоцитарная активность, фагоцитарное число и фагоцитарная емкость нейтрофилов у кроликов опытной группы в течение всего исследования были повышены. В то же время у контрольных животных, не получавших левамизол, значения фагоцитарного индекса, числа и емкости, начиная с 10-го дня исследования и до конца опыта, были наоборот снижены.

Введение левамизола положительно влияло на активность Т- и В-систем, при этом содержание Т- и В-лимфоцитов у опытных кроликов на 40, 50 и 60 сутки с начала затравки было выше по сравнению с контролем (Рис. 2.4, 2.5).

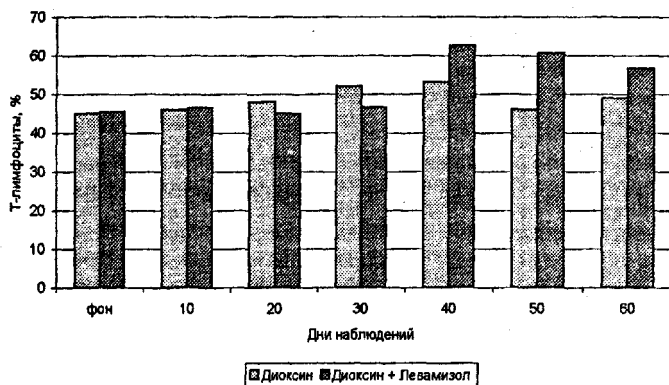


Рис. 2.4 - Содержание Т-лимфоцитов в периферической крови кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ и применении левамизола

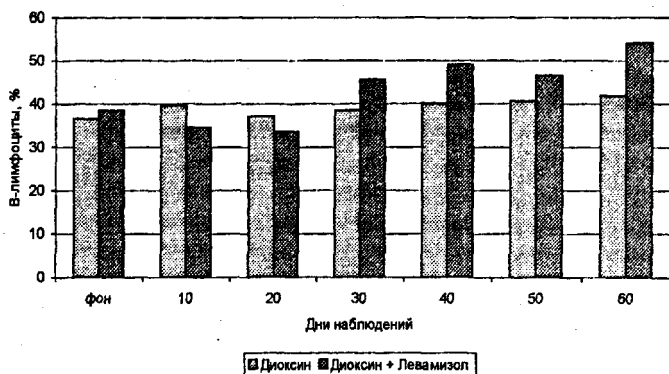


Рис. 2.5 - Содержание В-лимфоцитов в периферической крови кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ и применении левамизола

Однако применение левамизола не оказывало существенного влияния на количественное содержание лизоцима при отравлении животных диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ (Рис. 2.6).

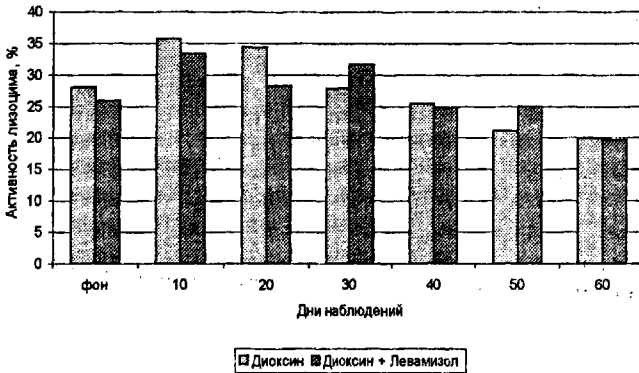


Рис. 2.6 – Активность лизоцима в сыворотке крови кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ и применении левамизола

2.6. Влияние левамизола на организм крыс при отравлении диоксином в дозе 1/200 ЛД₅₀

Изучение влияния левамизола на организм животных при отравлении диоксином в дозе 1/200 ЛД₅₀ проводили на белых крысах, которые были разделены на две группы: опытную и контрольную. Животным обеих групп ежедневно в течение 30 дней вводили перорально диоксин. Опытной группе наряду с диоксином выпаивали левамизол в дозе 2,5 мг/кг массы тела животного.

Результаты гематологических исследований показали, что при применении левамизола количество эритроцитов в крови белых крыс снижается незначительно, в отличие от животных контрольной группы.

Содержание гемоглобина в контрольной группе также уменьшалось и к 60 дню опыта было ниже фоновой величины на 55%, в опытной группе крыс это снижение составляло 25%.

Применение левамизола повышало уровень лейкоцитов, стабилизировало показатели палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов у отравленных диоксином животных.

Анализ проведенных биохимических исследований показан, что при заправке крыс диоксином применение левамизола оказывает нормализующее влияние на белковый обмен животных, которое проявляется относительным постоянством и оптимальным содержанием белковых фракций по сравнению с аналогичными параметрами у нелеченых животных.

фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса и фагоцитарной емкости нейтрофилов.

Таким образом, анализируя результаты исследований по изучению действия димефосфона и левамизола при хроническом отравлении диоксином можно заключить, что оба препарата оказывают положительное влияние на клинико-гематологические, биохимические и иммунологические показатели крови животных, но больший эффект наблюдается при применении димефосфона, действие которого более широко направлено на восстановление показателей естественной резистентности и иммунологической реактивности организма в целом.

2.7. Гистологические исследования органов и тканей кроликов при отравлении диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ при применении лечебно-профилактических препаратов димефосфона и левамизола

Наряду с клинико-гематологическими, биохимическими и иммунологическими исследованиями проводили изучение гистологических изменений в органах и тканях кроликов при хроническом отравлении диоксином и при применении лечебно-профилактических препаратов - димефосфона и левамизола.

Исследование тканей почек при отравлении кроликов диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ показало, что протоплазма эпителиальных клеток извитых канальцев набухшая, эпителий в корковом слое находится в состоянии зернистой дистрофии. Границы канальцев сглажены, их просветы сужены. Капсула почечного тельца расширена, в ее просвете наблюдаются спущенные эпителиальные клетки. Ядра эпителиальных клеток в состоянии пикноза и рексиса. В просвете прямых канальцев местами выявляются гиалиновые цилиндры. Ретикулоэндотелий не выражен. В некоторых прямых канальцах резко выделен кубический эпителий, границы клеток хорошо заметны, ядра пикнотичны.

Печень животных, отравленных диоксином, не имела выраженной дольчатой структуры. Гепатоциты, образующие нестройные ряды балок, выделялись признаками зернистой, жировой, а в отдельных местах некоторых долек - вакуольной дистрофии. Цитоплазма клеток имела опустошенный вид. Печеночные клетки в состоянии кариопикноза и кариорексиса. Местами выявляются некрозы, в триадах соединительнотканная основа в состоянии отека. Кровеносные сосуды сужены. Данные изменения свидетельствуют о необратимости патологического процесса, который неизменно ведет к циррозу печени. Б селезенке кроликов при хроническом отравлении диоксином лимфатические фолликулы уменьшены, пролифилирующая реакция ретикулоэндотелия сглажена. Центры размножения клеток разряжены, подавлена реакция образования лейкоцитов. Кровеносные сосуды сужены, стенки мелких артерий гиалинизированы.

В надпочечнике в пучковой зоне эпителиальные клетки опустошенные, повсеместно наблюдается исчезновение зерен липидов. Местами деструктивно-дистрофические изменения эпителия. Ядра пикнотичные. Более значимые из-

менения наблюдаются в клубочковой зоне. Ретикулоэндотелий сжат, активность угнетена, капилляры сужены.

Таким образом, диоксин вызывал дегенеративно-дистрофические изменения в органах и тканях животных, приводя к необратимым процессам в организме кроликов.

При применении в качестве лечебно-профилактического препарата димефосфона при хроническом отравлении животных диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀ в почках наблюдались следующие изменения: в извитых канальцах хорошо выражены явления зернистой дистрофии и мутного набухания эпителиальных клеток. Заметна пролиферация ретикулоэндотелия в межканальцевых капиллярах и сосудах клубочков. Гистологическое строение органа хорошо сохранено. Прямые канальцы почек вытянуты, границы клеток отчетливо выражены. Местами заметно набухание кубического эпителия. Ядра в состоянии пикноза. Капсула (Шумлянского) расширена, петли капилляров хорошо выражены, отмечается активизация ретикулоэндотелиальных клеток.

При применении димефосфона в строении печени у животных отмечали выраженную дольчатую и балочную структуру, сосуды сужены не сильно. Клетки печени повсеместно в состоянии зернистой дистрофии, ядра резко ограничены, темные, в состоянии пикноза.

В селезенке лимфоидные клетки расположены вокруг кистевидных артерий, пролиферируют, ядра базофильные. Лимфатические фолликулы селезенки в нормальном состоянии.

Эпителиальные клетки клубочковой зоны надпочечника хорошо выражены, содержат значительное количество зерен липидов. Ядра несколько увеличены, хорошо выражены со скоплением хроматина. В пучковой зоне надпочечника эпителиальные клетки без видимых изменений, содержат липидофильные зерна. Ретикулоэндотелий в состоянии слабовыраженной пролиферации, хромофинные клетки мозгового вещества без заметных изменений. Соединительнотканые прослойки между тяжами эпителиальных клеток ярко выражены.

Таким образом, анализ гистологических исследований показал, что димефосфон оказывает благоприятное воздействие на органы и ткани животных при отравлении диоксином, блокируя негативное действие токсиканта.

Следующим этапом было изучение гистологии органов и тканей животных при отравлении диоксином и применении левамизола. При этом наблюдались следующие изменения: гистоструктура коркового слоя-почки нарушена. Канальцы расширены, межканальцевые капилляры сужены. Эпителий извитых канальцев набухший, границы эпителиальных клеток сглажены. Ядра клеток в состоянии пикноза. Ретикулоэндотелий клеток - в стадии активной пролиферации. Клубочки расширены, в капиллярах отмечается активизация ретикулоэндотелия. Местами разрастание соединительнотканной основы.

Клетки печени в состоянии мутного набухания, рисунок балочного строения не выраженный, капилляры сужены. Звездчатые клетки в состоянии выраженной пролиферации. Ретикулоэндотелий в активном состоянии, ядра пикнотичные.

В селезенке хорошо выражено трабекулярное строение, слабо выражена реакция ретикулоэндотелиальной системы. Местами около кистевидных артерий выявляются гиалиновые муфты. Лимфатические фолликулы не выражены.

В надпочечнике сохраняется гистоструктура. В корковом слое эпителиальные клетки набухшие, просветы не выражены, капилляры сужены. Зерна липидов в эпителиальных клетках содержатся в достаточном количестве, ядра несколько увеличены, хорошо выражены, зерна хроматина расположены по периферии ядра. В клубочковой зоне структура канальцев нарушена, капилляры сильно сужены, звездчатые клетки не выражены.

Применение левамизола при отравлении кроликов диоксином сохраняет внутреннюю структуру клеток, предотвращая их опустошение и развитие жировой дистрофии. Испытуемый препарат оказывает благоприятное воздействие на гистоструктуру селезенки и надпочечника, что связано с его иммуномодулирующим действием. Левамизол предотвращает нарушение внутренней структуры клетки, но не сохраняет целостность клеточной стенки.

Сравнивая результаты гистологических исследований органов и тканей животных, как при отравлении одним диоксином, так и при применении лечебно-профилактических препаратов - димефосфона и левамизола, можно отметить положительное влияние оказываемое обоими средствами, что проявляется в сохранении гистоструктуры органов, а также внутренней стабильности клеток. Однако димефосфон оказывает более эффективное действие на сохранение целостности органов и тканей организма кроликов, чем левамизол.

3. ВЫВОДЫ

1. Пероральное введение кроликам в течение 10 дней диоксина с кормом в дозе 1/10 ЛД₅₀ вызывает интоксикацию, характеризующуюся снижением количества эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, Т- и В- лимфоцитов, активности лизоцима, уменьшением аппетита, диареей, истощением и гибелью 50% животных (на 27 и 30 сутки после начала затравки). Применение димефосфона с водой в дозе 100 мг/кг массы тела одновременно с введением диоксина, оказывает лечебное действие, предотвращает гибель и ускоряет нормализацию клинико-гематологических показателей у отравленных животных.
2. Поступление в течение 30 дней диоксина с кормом в дозах 1/100 и 1/200 ЛД₅₀ вызывает у крыс и кроликов хроническую интоксикацию, сопровождающуюся снижением массы тела, содержания эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов и альбуминов, увеличением количества Р- и у-глобулинов, уменьшением концентрации лизоцима, что свидетельствует о нарушении морфологического и биохимического состава крови, белково-образовательной функции печени и понижении естественной резистентности животных.
3. Выпаивание димефосфона с водой в дозах 75 и 100 мг/кг массы тела при хронической интоксикации животных диоксином в дозах 1/100 и 1/200 ЛД₅₀, оказывает положительное влияние на гематологические показатели,

белковый обмен и естественную резистентность (увеличивается количество эритроцитов и гемоглобина, оптимизируется лейкоцитарный профиль и фракционный состав белков, повышается активность лизоцима и фагоцитарная активность нейтрофилов в крови).

4. Применение левамизола при отравлении животных диоксином в дозах 1/100 и 1/200 ЛД₅₀ оказывает благоприятное влияние на гематологические показатели и естественную резистентность организма (предотвращает снижение эритроцитов, гемоглобина, нормализует лейкограмму, повышает фагоцитарную активность нейтрофилов, содержание Т- и В- лимфоцитов).
5. Хроническое отравление диоксином в дозе 1/100 ЛД₅₀, вызывает дегенеративно-дистрофические изменения в печени, почках, селезенке, надпочечниках, характеризующиеся нарушением их гистоструктуры, опустошением клеток, развитием белковой и жировой дистрофии, кариопикнозом и кариорексисом. Использование димефосфона и левамизола при отравлении диоксином предотвращает развитие патологических изменений в гистоструктуре внутренних органов, предупреждает опустошение клеток и возникновение дистрофии.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для повышения устойчивости животных к токсическому действию диоксина предложены иммуномодулирующие препараты, применение которых улучшает клинико-гематологические показатели животных, положительно влияет на естественную резистентность и иммунобиологическую реактивность организма.

На основании результатов исследований разработаны «Временное наставление по применению димефосфона при отравлении животных диоксином», «Временное наставление по применению левамизола при хроническом отравлении животных диоксином», утвержденные директором ФГНУ ВНИВИ 24 декабря 2004 года.

Результаты токсикологических исследований вошли во «Временные предельно допустимые концентрации диоксина для различных видов животных», утвержденные директором ФГНУ ВНИВИ 25 октября 2004 года.

5. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Иванов А.А. Иммунобиохимические показатели кроликов при хронической интоксикации диоксином // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Материалы международной научно-практической конференции. - Ульяновск. - 2003. - Т. 1 - С. 190-191.
2. Иванов А.А., Новиков В.А. Влияние препарата Д-15 на показатели естественной резистентности кроликов при отравлении диоксином // Мате-

- риалы Международной конференции по актуальным проблемам Агро-промышленного комплекса. Ч.2.- Казань,- 2003. - С. 203 - 204.
3. Новиков В.А., Иванов А.А., Тремасов М.Я. Коррекция димефосфоном факторов неспецифической резистентности при отравлении кроликов диоксином // Состояние и проблемы вет. санитарии, гигиены и экологии в животноводстве: Материалы Международной научно-практической конференции. - Чебоксары. - 2004. - С. 344 - 347.
 4. Иванов А.А., Новиков В.А. Клинико-гематологические показатели у кроликов при отравлении диоксином и применении препарата Д-15 // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии: Сб. науч. труд. ВНИИСГЭ. - М.: 2004. - Т. -116. - С. 228 - 231.
 5. Тремасов М.Я., Новиков В.А., Иванов А.А. Средства повышающие устойчивость животных к диоксину // Сборник научных трудов ВГНКИ. - М.: - 2005. - Т. 65. - С. 262-270.

Подписано к печати 22.03.2005 Формат бумаги 60х84 /16

Заказ 10 Тираж 100

Печать Riso

Офсетный участок ВНИИ 35

917