



003459639

На правах рукописи

ГНЁТОВ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

**ФАРМАКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
И ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОРОДИНА
ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ
ПОСЛЕРОДОВОГО ЭНДОМЕТРИТА КОРОВ**

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

14 ЯНВ 2009

Воронеж – 2008

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

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Беляев Василий Иванович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Слободяник Виктор Иванович

кандидат биологических наук
Толкачев Игорь Сергеевич

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

Защита состоится «14» 07 2009 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета ДМ 006.004.01 при Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте патологии, фармакологии и терапии РАСХН (Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГНУ Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии.

Автореферат разослан «25» декабря 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Т. И. Ермакова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ветеринарная наука и практика уделяют большое внимания вопросам профилактики и лечения акушерско-гинекологических заболеваний, которые по данным ветеринарной статистики наносят значительный экономический ущерб введению животноводства. Эти заболевания проявляются у животных бесплодием, снижением молочной продуктивности животных, преждевременной их выбраковкой, значительными затратами на кормление, содержание, многократное безрезультатное осеменение и лечение бесплодных коров, а также снижением качества продуктов питания (А.Г. Нежданов, с соавт., 2005; С.В. Шабунин с соавт., 2005.). Одним из таких заболеваний является острый послеродовой эндометрит, который у крупного рогатого скота регистрируется во всех регионах страны и последние годы наметилась тенденция к его более широкому распространению (О. В. Распутина, 2007).

Степень распространения послеродового эндометрита у коров колеблется от 5,0 - 20,0% (Р.Г. Кузьмич, 2000; В.М. Бреславец, 2001), до 20,0 - 57,0% (В.А. Напримеров, 2004; В.И. Михалев с соавт., 2005).

Для лечения коров, больных острым послеродовым эндометритом, используются разнообразные средства и методы патогенетической, общестимулирующей, этиотропной и симптоматической терапии, а также методы физиотерапевтического воздействия.

В качестве средств этиотропной терапии, направленной на подавление патогенной микрофлоры в матке и организме животных в целом, используют нитрофурановые, сульфаниламидные и антибиотические препараты в различных сочетаниях. Однако эффективность многих антибиотиков, как и других антибактериальных препаратов, резко снижается из-за широкого распространения антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Поэтому разработка новых эффективных антибактериальных препаратов для лечения и профилактики острого послеродового эндометрита у коров является актуальной задачей ветеринарной науки и практики.

Одной из перспективных групп антибактериальных препаратов в настоящее время является группа фторхинолонов, обладающая широчайшим спектром антимикробного действия в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, сравнительно низкой токсичностью и практически полным отсутствием резистентности к ним у микроорганизмов (Н.И. Фадеева и др., 1993; Е.Н. Падейская, В.П. Яковлев, 1998; С.В. Яковлев, 2007).

Исходя из этих данных, был разработан антибактериальный препарат для профилактики и лечения послеродового эндометрита коров - норродин, активными действующими веществами которого являются, норфлоксацин (фторхинолон II поколения) и диоксидин (препарат хиноксалинового ряда).

Цели и задачи исследования. Целью исследования являлась разработка, фармакотоксикологическая оценка и внедрение в практику ветеринарии препарата нородина для лечения послеродового эндометрита у коров.

Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить фармакотоксикологические свойства нородина;
2. Определить влияние нородина на гематологические и биохимические показатели коров и сроки выведения активнордействующих веществ препарата из организма животных;
3. Оценить профилактическую и лечебную эффективность нородина при послеродовом эндометрите коров;
4. Определить экономическую эффективность применения нородина при профилактике и лечении послеродового эндометрита коров.

Научная новизна. Впервые изучены токсико-фармакологические свойства нового антибактериального препарата нородина, влияние его на клинико-биохимические показатели животных. Установлены пути и сроки выведения препарата из организма коров, определены лечебная и профилактическая эффективность его при послеродовом эндометрите коров, а так же экономическая эффективность применения препарата.

Новизна исследований подтверждена патентом.

Практическая значимость. В практику ветеринарии предложен, для профилактики и лечения послеродового эндометрита коров, новый высокоэффективный антибактериальный препарат.

Данные исследований включены в нормативную документацию и инструкцию по применению нородина.

Апробация результатов исследований. Основные положения диссертационной работы доложены на: первом съезде ветеринарных фармакологов (Воронеж 2007), научно-практической конференции фармакологов РФ посвященной 85-летию М.И. Рабиновича (Троицк, 2007), научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования» посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА (Ульяновск, 2008), Международной научно-практической конференции «Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел» (Москва, 2008), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней молодняка» (Воронеж 2008), Международной научно-практической конференции «Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и птиц» (Троицк, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них три в журналах рекомендованных ВАК РФ и один патент.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, иллюстрирована 37 таблицами и 30 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения,

выводов и практических предложений. Список литературы состоит из 201 источника, из которых 32 иностранных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фармакотоксикологические свойства нородина;
2. Гематологические и биохимические показатели животных при применении нородина;
3. Профилактическая и терапевтическая эффективность нородина.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2005-2008 г.г. в отделе фармакологии и токсикологии ГНУ Всероссийский НИВИ патологии, фармакологии и терапии РАСХН и в других подразделениях института, а также в хозяйствах ЗАО «Манино» Калачеевского района Воронежской области, АОГП «Успенское» и СГЖ «Здоровецкое» Ливенского района Орловской и ЗАО «Должанское» Вейделевского района Белгородской области, в соответствии с планом научно-исследовательских работ по государственному заданию «Разработать новые экспресс-тесты и терапевтические препараты для эффективной системы мероприятий по диагностики, профилактики и терапии болезней органов размножения и молочной железы у коров и свиней, обеспечивающей снижение бесплодия маточного поголовья, получение жизнеспособного приплода и производство продукции высокого санитарного качества» (№ гос. регистрации 15070.3666026906.06.8.002.3).

В проведении отдельных исследований принимали участие сотрудники ВНИВИ патологии, фармакологии и терапии Г.А. Востроилова, С.М. Сулейманов, В.И. Шушлебин, Е.В. Михайлов, Т.Е. Рогачева, А.Г. Шахов, В.И. Михалев, Н.В. Притыкин и другие, которым автор выражает искреннюю признательность за оказанную помощь.

В лабораторных экспериментах использованы беспородные белые мыши обоего пола массой 20-22 г. – 160 гол., беспородные белые крысы обоего пола массой 190-230 г. - 156 гол., морские свинки массой 270-300 г. - 30 гол., кролики массой 2,2-3,2 кг. – 14 гол., в научно-производственных опытах - крупный рогатый скот симментальской и черно-пестрой породы массой 500-550 кг. - 250 гол.

Изучение антимикробной активности препарата нородин и его компонентов (диоксидин и норфлоксацин) проводили методом серийных разведений. В качестве тест культуры использовали референтные штаммы *E. coli* 866 и *Staph. aureus* 209P, полевые штаммы *E. coli* O (III) серотипы 033, 0103, 0117, *E. coli* O (IV) серотипы 0127, 0147, *Staf. aureus* и *Strept. porcinus*. Микробная загрузка составляла 500 тыс. м.к. на 1 мл среды.

Стабильность препарата нородин определялась в условиях долгосрочного исследования, показатели качества, предусмотренные требованиями проекта СТО, изучали через 0,5, 1 и 2 года хранения в защищенном от света месте при температурах: $(5\pm 2)^{\circ}\text{C}$, $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ и $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

Токсические свойства нородина изучались в остром и хроническом опыте в соответствии с “Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве” (1991). При острой токсичности эксперименты проведены на половозрелых конвенциональных нелинейных разнополых белых мышах (160 гол.) и белых крысах (90 гол.). Изучение параметров токсичности препарата в остром опыте проведено при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении нородина указанным видам животных с использованием двухэтапного метода. Опыты выполняли в двух повторностях для каждого вида животных. Содержание животных и обеспечение кормами соответствовало нормативным требованиям Международной конвенции. Одновременно на этих животных изучали симптомы острого экспериментального отравления. Павших животных и особей с признаками отравления препаратом, подвергали патологоанатомическому вскрытию.

Среднелетальную дозу – LD₅₀ - определяли аналитическим способом Спиримена-Кербера (Лакин Г.Ф., 1990) и с помощью пробит-анализа с использованием прикладной программы «Статистика +2003». Величины LD₁₆ и LD₈₄ нородина для белых мышей и белых крыс определяли графически на основании соответствующих пробитов и доз в мг/кг массы тела, показатель ошибки средней дозы эффекта – SLD₅₀ - аналитически и графически.

Хроническую токсичность нородина изучали на половозрелых конвенциональных нелинейных белых крысах (60 гол.) при внутрибрюшинном введении нородина в течение 21 дня в следующих дозах; 1-я группа - контроль; 2-я группа - 1/50 LD₅₀ - 570,0 мг/кг; 3-я группа - 1/20 LD₅₀ - 1430,0 мг/кг и 4-я группа - 1/10 LD₅₀ - 2860,0 мг/кг.

Общетоксическое действие препарата оценивали в течение 21 дня, по динамике массы тела животных при взвешивании 1 раз в неделю. Вегетативный статус определяли по состоянию слизистых, шерстного покрова, ширине глазных щелей, наличию саливации, диареи, опрятности животных. Для исследования внутренних органов животных часть грызунов из каждой группы на 7-е, 14-е и 21-е сутки с момента начала опыта подвергали эвтаназии. В эти же сроки проводили морфологический и биохимический анализ крови.

Изучение раздражающего действия нородина на слизистые оболочки, было проведено на кроликах массой 2,2-3,2 кг. С этой целью закапывали пипеткой по 2 капли подогретого до 40 °С нородина, в конъюнктивальный мешок левого глаза животного. Правый глаз у кроликов служил контролем, в конъюнктивальный мешок которого препарат не вносили. Через 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 и 6 часов после инстилляции препарата учитывали клиническое состояние организма животных (температуру тела, частоту пульса, количество дыхательных движений), а также изменение кровенаполнения конъюнктивы, наличие лакримации и выделений, состояние роговицы и век.

Опыты по изучению раздражающего действия нородина на кожу были проведены на кроликах с массой тела 2,2-3,2 кг. Исследуемый препарат наносили в нативном виде. Площадь нанесения составляла 80-82 см². За два дня до эксперимента тщательно выстригали шерсть на спине, избегая механических повреждений кожных покровов. Препарат равномерно распределяли по поверхности участка кожи в дозах от 0,02-0,12 мл/см². Экспозиция 4 часа, после чего кожу аккуратно протирали ватным тампоном, смоченным дистиллированной водой. Реакцию на воздействие препарата оценивали через 1 и 16 часов после однократного нанесения.

Учитывали, функциональные нарушения кожи характеризующиеся появлением различной степени выраженности эритемы, отека, трещин, изъязвлений, изменением температуры тела.

Изучение алергизирующих свойств нородина проводили в соответствии с методическими рекомендациями Фармакологического Комитета МЗ РФ по оценке алергенных свойств фармакологических средств. Изучение алергенного действия нородина было проведено на морских свинках и белых крысах, постановкой тестов *in vivo*: метод накожных аппликаций, конъюнктивальная проба. В качестве *in vitro*-тестов применяли реакцию прямой дегрануляции тучных клеток (РДТК), реакцию специфической агломерации лейкоцитов (РСАЛ) и реакцию специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ).

Влияние нородина на структурную организацию паренхиматозных органов белых крыс изучалось на 3-х группах животных в дозах 1/50 LD₅₀ - 570,0 мг/кг, 1/20 LD₅₀ - 1430,0 мг/кг и 4-я группа - 1/10 LD₅₀ - 2860,0 мг/кг. Препарат применяли белым крысам в течение 21 дня ежедневно в соответствующих дозах. Опытные животные каждой группы подвергались эвтаназии на 7-й, 14-й и 21-й день опыта. При убое образцы паренхиматозных органов (печень, почки, легкие, сердце, селезенка, семенники, надпочечники, тимус) крыс фиксировали в 10-12%-ном растворе нейтрального формалина в течение 10-15 дней, затем обезвоживали в восходящей концентрации этилового спирта, заливались в парафин с последующим изготовлением серийных срезов толщиной 5-7 мкм. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин – эозином и пикрофуксинном.

Определение сроков выведения активновеществ препарата нородина проводили по содержания диоксидина, норфлоксацина и диметилсульфоксида (ДМСО) в молоке и крови.

Определение содержания норфлоксацина в крови и молоке коров проводили методом ВЭЖХ с использованием калибровочных кривых. Определение содержания диоксидина и диметилсульфоксида в крови и молоке проводили методом ГЖХ, также с использованием калибровочных кривых.

Для оценки общего действия нородина на организм лабораторных животных и коров, определяли морфологические и биохимические показатели крови в соответствии с общепринятыми методами, описанными в руководствах Колба В.Г., Камышников В.С., (1982); Кондрахина И.П. с со-

авт. (2004). В крови определяли количество эритроцитов; гемоглобина (г/л), лейкоцитов. Фракции белка определяли электрофорезом в агарозном геле, концентрацию общего белка, липидов наборами фирмы «Vital Diagnostics», концентрацию мочевины, фосфора, холестерина, глюкозы, активность аспаргат- и аланинаминотрансфераз (АсАТ и АлАТ), щелочной фосфатазы на биохимическом анализаторе «Hitachi-902».

Для определения эффективности лечения нородином послеродового эндометрита у коров был проведен опыт на 123 животных. Диагноз на заболеваемость послеродовым эндометритом устанавливали на основании данных анамнеза, результатов клинического и акушерско-гинекологического исследований, учитывая общее состояние животных, поведение, аппетит, состояние половых органов, характер и количество экссудата выделяемого из половых органов. После постановки диагноза на острый послеродовой эндометрит (через 8-10 суток после отела) из больных животных формировали, по принципу пар-аналогов, опытную и контрольную группы.

Животным опытной группы вводили нородин внутриматочно с помощью шприца Жанэ, первые два раза в дозе 200 мл, а затем - по 150 мл, с 48-часовым интервалом до выздоровления, на фоне комплексного лечения, предусматривающего внутримышечное введение 1%-го масляного раствора синестрола в дозе 4-5 мл дважды с интервалом 24 часа с последующим введением внутримышечно 40-50 ЕД окситоцина, а также подкожное введение ихтиола и плаценты денатурированной эмульгированной в соответствии с инструкциями по их применению.

Животным контрольной группы для лечения применяли препарат энроцид производства ЗАО НПП «Агрофарм» в тех же дозах и в те же сроки, что и коровам опытной группы, на фоне комплексного лечения.

За животными в течение опыта проводили ежедневное клиническое наблюдение, учитывая общее состояние, время исчезновения клинических признаков заболевания, объем и характер выделений из наружных половых органов, проявление первой охоты, сроки плодотворного осеменения, количество выздоровевших животных.

Для полного суждения о влиянии нородина на организм коров прослеживали изменения морфологических и биохимических показателей крови подопытных и контрольных животных.

Опыты по изучению эффективности применения нородина для профилактики послеродового эндометрита у коров проведены на 127 животных. Коровы были разделены по принципу аналогов на три группы.

Коровам опытной группы (n=44) применяли препарат нородин, который вводили внутриматочно однократно с помощью шприца Жанэ и катетера в дозе 200 мл сразу после оперативного отделения последа или через 6-12 часов после нормальных родов.

Коровам контрольной группы (n=41) применяли однократно внутриматочно препарат энроцид производства ЗАО НПП «Агрофарм» в дозе 200 мл сразу после оперативного отделения последа или через 6-12

часов после нормальных родов. Животные третьей группы (n=42) служили отрицательным контролем и им препараты не назначались.

За животными в течение опыта проводили ежедневное клиническое наблюдение, учитывая время заболевания, проявление первой охоты, сроки плодотворного осеменения, количество заболевших животных.

При расчетах экономической эффективности лечебно-профилактических мероприятий была взята за основу «Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий» (Москва, 1982) и «Методика определения экономической эффективности использования в сельском хозяйстве результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, новой техники, изобретений и рационализаторских предложений» (Москва, 1980).

Полученный цифровой материал обрабатывали, используя методы математической статистики, принятые в биологии и медицине (Г.Ф. Лакин, 1990). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2007» и «Statistica 3.0» на PC «Pentium D820».

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Фармакотоксикологическая оценка препарата нородин

3.1.1 Состав, физико-химические свойства и стабильность препарата нородин

Нородин (Norodinum) – комплексный антибактериальный препарат, предназначенный для профилактики и лечения послеродового эндометрита у коров. Представляет из себя, прозрачную жидкость желтого цвета с зеленоватым оттенком. Плотность препарата составляет от 1,040 до 1,050 г/мл., рН от 5,0 до 6,0.

Содержание основных компонентов в готовом препарате нородин представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание основных компонентов в препарате нородин

Компоненты	масс./%
Норфлуксацин	0,4-1,0
Диоксидин	0,5-0,9
ДМСО	30-40
Дистиллированная вода	остальное

По результатам исследования стабильности препарата нородин, установлен срок годности препарата - 1 год, рекомендуемая температура хранения 5-20 °С.

3.1.2 Антимикробная активность норродина

Изучением антимикробной активности препарата норродин и его компонентов установлено, что оба компонента препарата норродин – норфлоксацин и диоксидин, имели высокую антимикробную активность по отношению к *E. coli* 866, *E. coli* 0 (III), *Staph. Aureus* 209P.

Бактериостатическая и бактерицидная активность норфлоксацина по отношению к *Staph. Aureus* 209P составляла соответственно 3,12 мкг/мл и 12,5 мкг/мл, к *E. coli* 866 – 0,39 мкг/мл и 0,78 мкг/мл и к *E. coli* 0 (III) – 6,25 мкг/мл и 12,5 мкг/мл.

Бактериостатическая и бактерицидная активности диоксидина по отношению к *Staph. Aureus* 209P составляла 25 мкг/мл и 100 мкг/мл, к *E. coli* 866 и *E. coli* 0 (III) антимикробная активности была одинаковой и составляла – МБсК - 1,56 мкг/мл и МБцК - 3,12 мкг/мл соответственно.

Норродин обладает широким спектром антимикробного действия в отношении всех испытанных культур микроорганизмов. Самая высокая чувствительность к препарату оказалась у *E. coli* 866, при добавлении в питательную среду норродина в количестве 0,97 мкг/мл рост микроорганизмов прекращался, а концентрация 1,9 мкг/мл вызывала их гибель. Высокую чувствительность к препарату так же показали *E. coli* 0 (III) серотипы 033, 0103, 0117, *E. coli* 0 (IV) серотипы 0127, 0147, для которых минимальная бактериостатическая концентрация составляла 3,9 мкг/мл, а минимальная бактерицидная 7,8 мкг/мл., а так же *Staph. aureus* 209P с МБсК 1,9 мкг/мл и МБцК 7,8 мкг/мл

Более устойчивыми к норродину оказались *Strept. porcinus*, МБцК к которым составляла 15 мкг/мл, при МБсК 3,9 мкг/мл.

3.1.3 Оценка острой токсичности норродина

Изучение параметров токсичности препарата в остром опыте проведено при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении норродина белым мышам и белым крысам. Опыты выполняли в двух повторностях для каждого вида животных. ЛД₅₀ при внутрижелудочном способе введения для мышей равна 41006,2 мг/кг, для крыс - 42685,0 мг/кг массы тела (табл. 1).

Таблица 1

Параметры острой токсичности норродина для лабораторных животных (мг/кг) при однократном внутрижелудочном введении

Вид животных	Параметры токсичности					SLD ₅₀
	МПД	LD ₁₆	LD ₅₀	LD ₈₄	LD ₁₀₀	
Белые мыши	27000,0	32374,1	41006,2 (38300-43700)	49631,6	53946,0	±1367,8
Белые крысы	28000,0	31703,8	42685,0 (38000-47400)	54060,5	59649,7	±2298,8

При внутрибрюшинном способе введения LD_{50} для мышей равна 22558,7 мг/кг, для крыс 28626,0 мг/кг (табл. 2).

Таблица 2

Параметры острой токсичности нородина для лабораторных животных (мг/кг) при однократном внутрибрюшинном введении

Вид животных	Параметры токсичности					SLD_{50}
	МПД	LD_{16}	LD_{50}	LD_{84}	LD_{100}	
Белые мыши	12000,0	17177,8	22558,7 (19200-25900)	28196,3	30950,9	$\pm 1613,3$
Белые крысы	16000,0	20304,4	28626,0 (24600-32700)	37306,0	41556,4	$\pm 1983,3$

Таким образом, препарат нородин по степени токсичности относится к IV классу опасности — малоопасные вещества (ГОСТ 12.1.007-76).

3.1.4 Параметры хронической токсичности нородина

Опыт по хронической токсичности препарата нородина проведен на 60 белых половозрелых крысах самцах с массой тела 190-230 г при внутрибрюшинном введении препарата в течение 21 дня в дозах: 1-я группа — контроль; 2-я группа - $1/50 LD_{50}$ - 570,0 мг/кг; 3-я группа - $1/20 LD_{50}$ - 1430,0 мг/кг и 4-я группа - $1/10 LD_{50}$ - 2860,0 мг/кг.

Проведенными исследованиями установлено, что многократное внутрибрюшинное введение нородина во всех испытанных дозах не вызывало существенных изменений в клиническом состоянии животных. Гибели животных в период опыта не было.

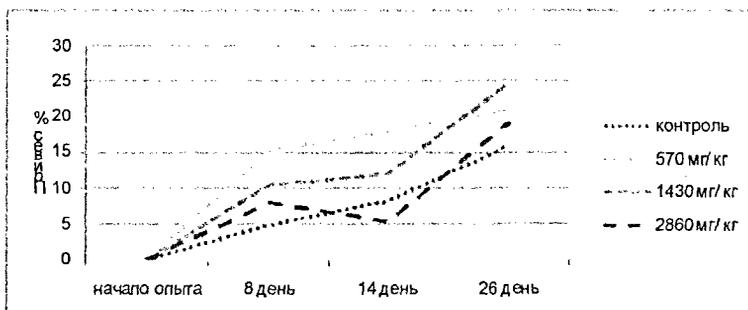


Рис. 1. Динамика изменения массы тела белых крыс при многократном внутрибрюшинном введении нородина

Установлено, что нородин оказывает влияние на интенсивность роста животных (Рис.1). Так, в дозах 570,0 и 1430,0 мг/кг препарат стимулирует рост животных в среднем на 18,0% и 15,7% соответственно. При введении

нородина в дозе 2860,0 мг/кг, подопытные животные не отличались от контрольных по приросту массы тела и в конце эксперимента, статистически достоверных различий по этому показателю не было обнаружено.

Коэффициенты массы внутренних органов крыс, которым применяли препарат норордин в дозах 570,0 мг/кг и 1430,0 мг/кг существенно не отличались от таковых у контрольных животных. На 14 день применения препарата в дозе 2860,0 мг/кг, было отмечено увеличение коэффициента массы почек на 12,9%, к 21 дню это увеличение было более значительно – 20,4%. Это указывает на повышение функциональной нагрузки на почки.

При исследовании крови животных, получавших препарат в дозах 570,0 мг/кг и 1430,0 мг/кг, не отмечено достоверных изменений биохимических показателей по сравнению с показателями в крови животных контрольной группы во все сроки исследования.

Таблица 3

Биохимические показатели крови белых крыс при длительном внутрибрюшинном применении норордина на 21 день опыта.

Показатели	Контроль	Норордин, доза, мг/кг		
		570,0	1430,0	2860,0
Белок, г/л	66,23±0,70	66,50±0,19	70,02±1,90	74,21±0,37*
Альбумины, г/л	37,54±1,59	36,86±1,64	37,78±1,74	38,17±1,89
α- глобулины, г/л	5,72±0,64	5,76±0,51	5,74±0,48	6,23±0,67
β- глобулины, г/л	12,39±0,85	13,11±1,12	14,32±1,25	14,68±1,17
γ-глобулины, г/л	10,58±0,62	10,77±1,06	12,18±1,15	15,13±1,89*
Мочевина, мМ/л	4,19±0,60	4,12±0,80	4,41±0,29	5,07±0,35
Липиды, г/л	2,25±0,07	2,30±0,07	2,28±0,21	2,63±0,25
Холестерин, мМ/л	1,91±0,15	2,13±0,16	2,07±0,20	2,36±0,25
Глюкоза, мМ/л	4,79±0,10	4,48±0,08	4,53±0,07	4,85±0,09
ЩФ, мМ/л. час	3,95±0,37	4,16±0,30	4,37±0,25	5,21±0,50*
АсАТ, мМ/л. час	1,06±0,03	1,07±0,04	1,16±0,05	1,37±0,05*
АлАТ, мМ/л. час	0,65±0,01	0,69±0,03	0,72±0,06	0,87±0,10*

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

Данные биохимических показателей крови белых крыс получавшей норордин в дозе 2860,0 мг/кг массы тела, при внутрибрюшинном введении препарата в течение 21 дня, показали, что наблюдались изменения, характеризующие в основном функциональное состояние почек и печени, преимущественно в отдаленные сроки исследования (табл. 3). Так на 14 день опы-

та активность щелочной фосфатазы при дозе 2860 мг/кг относительно контроля повысилась на 25,8%, активности ферментов АлАТ и АсАТ на 27,6% и 23,3%, мочевины – 11,8%. К 21 дню повышение этих показателей было более значительно: активность щелочной фосфатазы на 31,9%, активности ферментов АлАТ и АсАТ – 33,1% и 29,2%, мочевины – 21,0%. Эти данные указывают о возросшей функциональной нагрузке на печень и почки.

Рассчитать коэффициент кумуляции по показателю смертельный эффект, не представлялось возможным, вследствие отсутствия гибели животных при исследовании хронической токсичности нородина.

3.1.5 Раздражающие свойства препарата нородин

Изучение раздражающего действия нородина на слизистые оболочки, проведенное на кроликах, инсталляцией препарата в течение 6 часов на конъюнктиву глаза, не выявило изменений температуры тела, частоты пульса и количества дыхательных движений, изменений кровенаполнения конъюнктивы, наличие лакримации и выделений.

Опыты по изучению раздражающего действия на кожу проведены на кроликах, однократной аппликацией препарата нородин в нативном виде в дозах от 0,02-0,12 мл/см². Реакцию кожи на воздействие препарата оценивали через 1 и 16 часов после однократного нанесения. Согласно полученным данным при однократной аппликации на кожные покровы, нородин не вызывает повреждение кожи в виде эритемы или ее отеков.

3.1.6 Аллергенные свойства

Изучение аллергенного действия нородина проведено на морских свинках массой 270-300 г и белых крысах массой 180-200 г.

Конъюнктивальная проба была поставлена на морских свинках, которым однократно вводили внутрикочно в правую ушную раковину по 0,05 мл нородина. Через 12 дней в конъюнктивальный мешок закапывали по 1 капле изучаемого препарата. Тест показал отсутствие реакции конъюнктивы на инсталляцию препарата у сенсибилизированных и интактных морских свинок через 1 и 24 часа. Постановка 20 накожных аппликации препаратом нородина на морских свинках не вызывала контактного дерматита.

Изучение алергизирующего действия нородина также проводили в опытах *in vitro*. В качестве *in vitro*-тестов применяли реакцию непрямо́й дегрануляции тучных клеток (РДТК), реакцию специфической агломерации лейкоцитов (РСАЛ) и реакцию специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ).

Установлено, что показатель РДТК составил 0,08%, то есть гиперчувствительность к нородину отсутствует.

Показатель агломерации лейкоцитов в РСАЛ в опытной и контрольной группах находился примерно на одном уровне и составил 1,18 и 1,17 соответственно, РСАЛ – отрицательна.

Также установлено, что у морских свинок, сенсibilизированных нородином, показатель РСЛЛ равен 8,28%, что характеризует отрицательную реакцию специфического лизиса лейкоцитов.

Таким образом, исследования сенсibilизирующего действия нородина не выявило выраженной реакции иммунной системы подопытных животных на данный препарат. Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии аллергенного действия у препарата нородин.

3.1.7 Влияние нородина на структурную организацию паренхиматозных органов белых крыс

Гистологическими исследованиями установлено, что нородин в дозах 570,0 мг/кг и 1430,0 мг/кг массы тела, не оказывал негативного влияния на структурную организацию паренхиматозных органов у белых крыс на 7, 14 и 21 дни наблюдения. Наблюдаемые при этих дозах некоторые отклонения от нормы носили обратимый характер.

Препарат в дозе 2860,0 мг/кг незначительно угнетал иммунную систему в виде гипоплазии клеток коркового слоя тимуса, а также лимфоидных муфт селезенки, вызывал дистрофические изменения в печени, почках и надпочечниках преимущественно в отдаленные сроки исследования.

3.1.8 Определение остаточных количеств активнoдействующих компонентов препарата нородин в крови и молоке коров

Определения остаточных количеств активнoдействующих компонентов препарата нородин в крови и молоке, осуществлено в 2 опытах, на коровах больных острым послеродовым эндометритом. В первом опыте нородин вводили в полость матки с помощью шприца Жанэ и катетера в дозе 200 мл/жив. Перед однократным введением и через каждые 12 часов в течение 3 суток после введения препарата брали пробы молока и крови. Во втором опыте коровам вводили нородин пятикратно с интервалом 48 часов. После последнего пятого введения препарата с интервалом 12 часов брали пробы молока и крови для исследований.

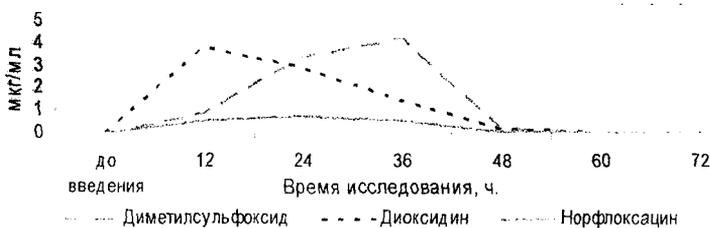


Рис. 2. Содержание диоксидина, норфлоксацина и диметилсульфоксида (мкг/мл) в молоке после однократного введения нородина

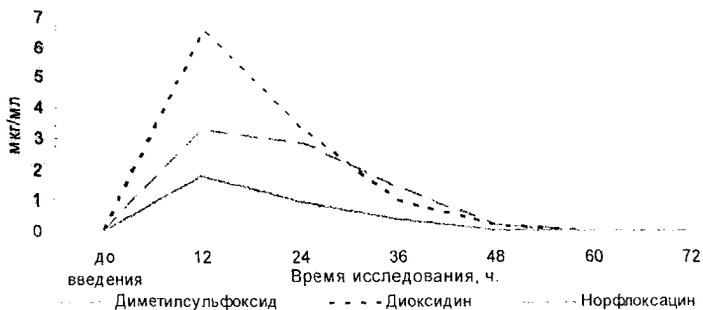


Рис. 3. Содержание диоксидина, норфлоксацина и диметилсульфоксида (мкг/мл) в крови после однократного введения нородина

Количественное определение содержания активнейших веществ в пробах крови и молока после однократного внутриматочного введения нородина коровам показало (Рис. 2,3), что диметилсульфоксид и норфлоксацин содержатся в пробах крови и молока до 48 часов, а диоксидин – после однократного внутриматочного введения в молоко обнаруживался в следовых количествах до 60 часов, а в крови - до 48 часов.

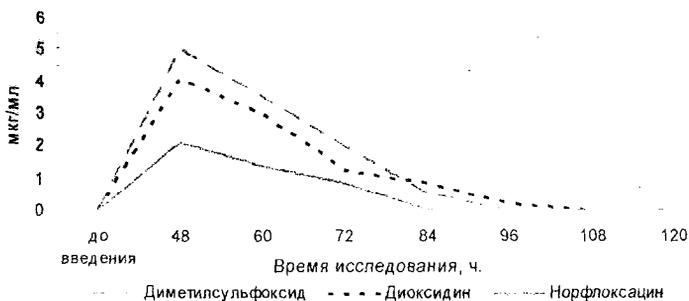


Рис. 4. Содержание диоксидина, норфлоксацина и диметилсульфоксида в молоке после пятикратного введения нородина

Диметилсульфоксид после пятикратного введения обнаруживался в молоке в течение 84 часов, диоксидин - в течение 96 часов и норфлоксацин - 84 часов после окончания применения нородина (Рис. 4,5). В крови после пятикратного введения нородина активнейшие вещества обнаруживались до 84 часов.

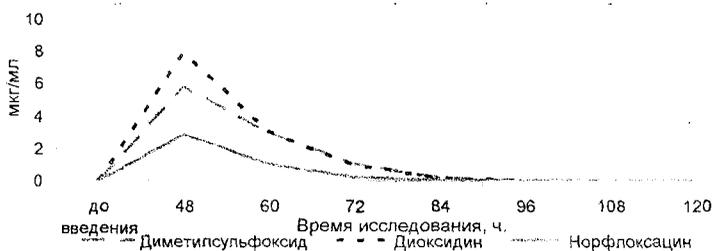


Рис. 5. Содержание диоксидина, норфлоксацина и диметилсульфоксида в крови после пятикратного введения норродина

В результате проведенных опытов установлено, что при внутриматочном введении норродина компоненты всасываются в кровь, а из нее проникают в молоко и обнаруживаются в нем в незначительных концентрациях.

3.2 Эффективность норродина при лечении послеродового эндометрита коров

При оценке терапевтической эффективности норродина при остром послеродовом эндометрите коров установлено (табл. 3), что норродин проявляет высокую терапевтическую эффективность при остром послеродовом эндометрите у коров. Эффективность применения норродина для лечения коров, больных послеродовым эндометритом составила 88,0%, что в среднем на 15,4% выше, чем в результате применения препарата энроцид (контрольная группа). Клиническое выздоровление коров опытной группы составило после $3,56 \pm 0,28$ введений норродина, а в контрольной группе после $4,57 \pm 0,41$. Продолжительность лечения животных опытной группы была короче, чем коров контрольной группы и составила $12,4 \pm 0,93$ дня. При этом в последующем, из числа выздоровевших животных, оплодотворились в опытной группе 82,6% и в контрольной группы 68,9%. Индекс оплодотворения у коров, лечившихся норродином, в среднем равнялся $1,91 \pm 0,17$, тогда как в контрольной группе он составлял $2,69 \pm 0,21$. Период от отела до оплодотворения, в среднем на одно животное, в опытной группе был равен $65,1 \pm 5,55$, что по сравнению с коровами контрольной группы было меньше на 19,3 дня.

В процессе выздоровления коров, в опытной группе животных, которым вводили норродин с момента начала лечения, на 12 день в крови повысилось содержание гемоглобина на 11,7% ($P < 0,02$), эритроцитов - на 10,0%, глюкозы - на 20,1% ($P < 0,05$), а в сыворотке - содержание общего белка на 10,2% ($P < 0,05$), мочевины - на 19,6%, общих липидов - на 23,3%, кальция - на 10,3% ($P < 0,05$), витамина А - на 19,9% ($P < 0,05$), витамина Е - на 18,6% и каротина - на 32,3%. В то же время в крови уменьшилось коли-

чество лейкоцитов на 24,5%, а в сыворотке - активность щелочной фосфатазы - на 33,0%, АсАТ и АлАТ - соответственно на 22,8 ($P<0,01$) и 8,2%.

Таблица 3

Эффективность препарата нородин при лечении послеродового эндометрита у коров

Показатели	Группа животных	
	Энроцид	Нородин
Количество животных, гол	58	65
Выздоровело, гол	42	57
%	72,6	88
Осталось больными, гол.	16	8
%	27,4	12,1
Срок выздоровления, дни	15,0±1,24	12,4±0,93
Количество введенный препарата	4,57±0,41	3,56±0,28
Период от отела до оплодотворения, дни	84,4±7,04	65,1±5,55
Оплодотворилось, гол	29	47
%	68,9	82,6
Индекс оплодотворения	2,69±0,21	1,91±0,17

3.3 Применения нородина при профилактике послеродового эндометрита коров

Эффективность применения нородина для профилактики острого послеродового эндометрита у коров (табл. 4), составила, после самопроизвольного отделения последа 90,85% и после оперативного отделения последа 77,50%, что в среднем соответственно на 15,6% и 20,2% выше, чем после применения энроцида и в 1,6 и 8 раза выше, чем без применения препаратов (отрицательный контроль). В течение 90 дней после отела, оплодотворение у животных после внутриматочного введения нородина наступало у 83,7%, что на 12,4% больше, чем у коров после введения энроцида и на 33,7% в сравнении с животными, которым препараты не назначали. При этом период от отела до оплодотворения у животных получавших препарат нородин оказался короче на 12,9 дня, чем у коров получавших энроцид и на 29,6 дня - в сравнении с отрицательным контролем.

Проведенные испытания свидетельствуют о высокой эффективности применения нородина для профилактики острого послеродового эндометрита у коров.

Таблица 4

Эффективность применения нородина для профилактики послеродового эндометрита коров

Показатели	Группа животных					
	нородин		энроцид		отрицательный контроль	
	СОП	ООП	СОП	ООП	СОП	ООП
Количество животных, гол.	22	22	20	21	21	21
Заболело послеродовым эндометритом: гол.	2 9,15	5 22,5	4 20,2	9 42,8	9 43,2	19 90,5
Оплодотворилось, гол. %	31 83,7		20 71,3		7 50	
Период от отела до оплодотворения, дней	52,8±1,5		65,7±0,1		82,4±0,3	
Индекс оплодотворе-	1,77±0,02		2,08±0,04		2,50±0,01	
Профилактическая эффективность, %	90,85	77,50	75,30	57,30	56,70	9,60

СОП - после самопроизвольного отделения последа

ООП- после оперативного отделения последа

3.4 Экономическая эффективность нородина при терапии и профилактики острого послеродового эндометрита коров

Проведенные расчеты экономической эффективности профилактических и лечебных мероприятий при остром послеродовом эндометрите с использованием нородина указывают на обоснованность его применения с экономической точки зрения. Экономический эффект на 1 корову при профилактике нородином составляет 648,4 руб., экономический эффект на 1 рубль затрат – 14,17 руб. Экономический эффект при лечении нородином на 1 корову составляет 958,2 руб., экономический эффект на 1 рубль затрат – 5,1 руб.

4. ВЫВОДЫ

1. Теоретически разработан и экспериментально обоснован комплексный антибактериальный препарат нородин, содержащий норфлоксацин, диоксидин, диметилсульфооксид и дистиллированную воду. Компоненты нородина обладают взаимодополняющим антимикробным действием, а диметилсульфооксид способствует всасыванию нородина.

2. Нородин – антибактериальный препарат для профилактики и лечения послеродового эндометрита коров, обладающий широким спектром

действия в отношении эшерихий, стрептококков и стафилококков, бактерицидная активность к которым составляет от 1,9 до 15 мкг/мл.

3. LD₅₀ нородина при однократном внутривнутрижелудочном введении для белых мышей составляет 41006,2 мг/кг, для белых крыс — 42685,0 мг/кг массы тела. При однократном парентеральном (внутрибрюшинном) введении LD₅₀ для белых мышей составляет 22558,7 мг/кг, для белых крыс - 28626,0 мг/кг массы тела. Выраженной видовой и половой чувствительности к препарату не выявлено. Препарат не оказывает существенного влияния на поведение и общее состояние животных, интенсивность роста и вегетативные функции. По показателям острой токсичности он относится к малоопасным веществам - 4 класс опасности по ГОСТ 12.01007-76.

4. Препарат не обладает кумулятивными, аллергизирующими, раздражающими (слизистая глаз, кожа) и кожно-резорбтивными свойствами.

5. При многократном внутрибрюшинном введении нородина белым крысам в дозах 1/50 LD₅₀ - 570,0 мг/кг и 1/20 LD₅₀ - 1430,0 мг/кг в течении 21 дня не выявлено функциональных и структурных изменений в организме животных. Применение препарата в максимальной дозе 1/10 LD₅₀ - 2860,0 мг/кг повышает функциональную нагрузку на печень и почки, при отсутствии клинических признаков интоксикации.

6. После одно- и пятикратного введения нородина в матку коровам, молоко не содержит компонентов препарата через 60 часов после однократного и 96 часов после пятикратного введения препарата, в пробах крови компоненты нородина не обнаруживали через 48 и 84 часов соответственно.

7. Однократное внутриматочное введение нородина коровам через 6-8 часов после самопроизвольного отделения последа или сразу после оперативного его отделения предупреждает развитие эндометрита соответственно у 90,85% и 77,50% (в среднем у 84,18%) животных. Заболеваемость коров послеродовым эндометритом после применения нородина ниже, чем при назначении энроцида в 2 раза и в 4,2 раза меньше, чем в группе контроля.

8. Эффективность лечения коров больных острым послеродовым эндометритом с использованием нородина составила 88,0%, что в среднем на 15,4% выше, чем при терапии животных контрольной группы (препарат энроцид), при сравнении с контролем, уменьшилось кратность применения препарата в 1,2 раза, срок выздоровления на 18,1%, коэффициент оплодотворения на 28,5% и повысилась оплодотворяемость на 12,5%.

9. Экономическая эффективность применения нородина составляет при профилактике на 1 корову - 648,4 руб., экономический эффект на 1 рубль затрат - 14,17 руб. Экономический эффект при лечении нородином на 1 корову - 958,2руб., экономический эффект на 1 рубль затрат - 5,1 руб.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для профилактики послеродового эндометрита коров вводить нородин внутриматочно однократно с помощью шприца Жанэ и катетера в

дозе 200 мл сразу после оперативного отделения последа или через 6-12 часов после нормальных родов в случаях широкого распространения данной патологии в хозяйстве

2. Для лечения послеродового эндометрита коровородов вводить внутриматочно с помощью шприца Жане, трех – четырехкратно, первые два раза в дозе 200 мл, а затем - по 150 мл, с 48-часовым интервалом до выздоровления.

3. Основные положения диссертации могут быть использованы в учебном процессе на факультете ветеринарной медицины ВУЗов и колледжей по курсам фармакология с токсикологией и акушерство.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Антибактериальные свойства и эффективность нородина при эндометритах у коров / В.И. Беляев, А.Н. Гнётов, В.И. Михалёв, А.Г. Шахов // Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и птиц: Материалы международной научно-практической конференции. - Троицк, 2008. – С. 35-38.

2. Беляев В.И. Влияние нородина в различных дозах на гомеостаз коров / В.И. Беляев, Г.А. Востроилова, А.Н. Гнётов // Материалы научно-практической конференции фармакологов Российской Федерации. - Троицк, 2007. – С. 34-35.

3. Беляев В.И. Субхроническая токсичность нородина для теплокровных животных / В.И. Беляев, Г.А. Востроилова, А.Н. Гнётов // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы международной научно-практической конференции. - Ульяновск, 2008.- Т. 3.- С. 11-13.

4. Беляев В.И. Токсикологические характеристики нородина / В.И. Беляев, Г.А. Востроилова, А.Н. Гнётов // Ветеринарный врач. - 2008. - №5. – С. 8-9.

5. Гнётов А.Н. Параметры острой токсичности нородина / А.Н. Гнётов // Материалы первого съезда ветеринарных фармакологов России. - Воронеж, 2007. – С. 300-302.

6. Гнётов А.Н. Аллергенные свойства нородина / А.Н. Гнётов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Материалы международной научно-практической конференции. - Воронеж, 2008. – С. 92-96.

7. Комплексный антибактериальный препарат для профилактики и лечения эндометритов у коров / В.И. Беляев, Г.А. Востроилова, А.Н. Гнётов, В.И. Михалёв // Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел: Материалы международной научно-практической конференции. - Москва, 2008.- С. 53-55.

8. Михалёв В.И. Терапевтическая эффективность нородина при остром послеродовом эндометрите коров / В.И. Михалёв, В.И. Беляев, А.Н. Гнётов // Аграрный вестник Урала. - 2008. - №6. – С. 62-64.

9. Препарат для лечения и профилактики послеродового эндометрита у коров и метрит-мастит-агалактии у свиноматок [Текст]: пат. № 2333759 РФ МПК А61К31/47 / Мисайлов В.Д., Востроилова Г.А., Шабунин С.В., Шахов А.Г., Коцарев В.Д., Михалев В.И., Беляев В.И., Гнётов А.Н., Скрынников О.Н.: Заявитель и патентообладатель ГНУ ВНИВИПФиТ – 2007126304; Заявл. 10.07.07, опубл. 20.09.08 бюл. №26.

10. Эффективность нордима для профилактики и лечения послеродовых эндометритов коров / В.И. Беляев, Г.А. Востроилова, В.И. Михалёв, А.Н. Гнётов // Мясное и молочное скотоводство. - 2008. - №8. – С. 31-32.

Подписано в печать 23.12.2008 г. Формат 60x84 1/16.
Гарнитура "Times New Roman". Печать офсетная.
Бумага офсетная. Объем 1,0 п.л. Тираж 100 экз.
Заказ № 1059.

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленного
оригинал-макета в типографии "ИСТОКИ"
394087, г. Воронеж, ул. Мичурина, 1
Телефон 53-77-28