



004618808

На правах рукописи

УРАЗАЕВА РЕНАТА ДМИТРИЕВНА

**Фармако - токсикологическая оценка и применение
филомеда при филометроидозе карпа**

06.02.03 – ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной
степени кандидата биологических наук

23 ДЕК 2010

Воронеж 2010

Работа выполнена в лаборатории токсикологии и санитарии кормов ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии» РАСХН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Дорожкин Василий Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Востроилова Галина Анатольевна

доктор ветеринарных наук, профессор
Беспалова Надежда Сергеевна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» (РУДН)

Защита диссертации состоится «24» декабря 2010 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 006.004.01 при ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» по адресу: 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИВИПФиТ.

Автореферат разослан «10» ноября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Т.И.Ермакова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Россия – страна, имеющая огромные территории, обладает большой площадью внутренних водоемов. Развитие аквакультуры, в целом, и прудового рыбоводства, в частности, является важной составной частью животноводства нашей страны. Рыба – ценный пищевой продукт, являющийся важным источником протеина животного происхождения. Белки рыбы легко усваиваются, а аминокислотный состав свидетельствует об их полноценности. Витаминный и минеральный состав мяса рыбы часто богаче и разнообразнее, чем у других видов животных. Общее содержание минеральных веществ в рыбе примерно в 1,5 раза выше, чем в мясе млекопитающих. Низкое содержание жира делает рыбу ценным диетическим продуктом (Шерман И. М., Чижик А. К., 1989; Друковский С.Г., 2006).

В настоящее время потребность в рыбе и рыбопродуктах очень высока. С ростом спроса на рыбную продукцию появилось большое количество частных рыбоводных прудов и садковых хозяйств, значительный прирост поголовья рыбы обеспечили комбинаты и рыбозаводы. Восприимчивость рыбы к инфекционным и инвазионным заболеваниям является одним из важнейших биологических факторов, нарушающих нормальное течение рыбоводного процесса. Заболеваемости рыбы способствуют плотные посадки, некачественный корм, низкое содержание кислорода, неблагоприятные температура или рН воды, накопление продуктов метаболизма. Распространение инфекционных и инвазионных заболеваний во многом зависит от нарушений технологии и ветеринарно-санитарных правил при разведении и выращивании рыб (Бауэр О.Н., 1959; Привезенцев Ю.А., Власов В.А., 2004; Козлов В.И. и др., 2006).

Для прудовых хозяйств центральных и южных регионов России, выращивающих товарного карпа, актуальной проблемой является гельминтозное заболевание филометроидоз (Висманис К.О., 1967; Головина Н.А. и др., 2003; Акбаев М.Ш. и др., 2008; Шерман И. М. и др., 1989). По данным Сапожникова Г.И. (2001) заболевание установлено в 17 (19,1%) регионах. По данным ФГУ «Центр ветеринарии» в 2006 г. по филометроидозу было неблагополучно 28 пунктов (Борисова М.Н., Скачков Д.П., 2009). В 2008 году в общей структуре инвазионной патологии филометроидоз составил 12% (Завьялова Е.А., 2009; Мамонтов Ю.П., 2010). Зараженная рыба не представляет угрозы здоровью и жизни человека, но наносит большой экономический ущерб рыбоводному предприятию – рыба истощена, отстает в росте и развитии, теряет до 30 % массы и часто гибнет. Половозрелые нематоды, имеющие красный цвет и достигающие 15 см в длину, локализуются в чешуйных кармашках, из-за чего рыба теряет товарный вид и выбраковывается (Борисова М.Н., 1988).

Несмотря на актуальность проблемы филометроидоза карпа, в настоящее время на Российском рынке ощущается недостаток современных лечебно-профилактических средств, предназначенных для борьбы с данным заболеванием. Поэтому важное значение приобретает создание новых

эффективных препаратов, способных воздействовать на различные стадии развития нематод.

Цели и задачи исследований. Целью настоящей работы является разработка нового лекарственного средства для лечения филометроидоза карпа и оценка его фармако-токсикологических свойств.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Исходя из литературных данных и скрининговых испытаний, выбрать эффективное и безопасное действующее вещество, на основе которого разработать препарат для лечения филометроидоза карпа.
2. Определить токсикологические параметры нового препарата.
3. Определить оптимальные терапевтические дозы и схемы применения препарата.
4. Определить параметры фармакокинетики, в том числе остаточные количества.
5. Провести ветеринарно-санитарную оценку рыбы, получавшей препарат.

Научная новизна работы. Впервые проведены скрининговые испытания ивермектина, эммаектина бензоата и левамизола гидрохлорида на рыбе в плане их безвредности и эффективности при филометроидозе. На основе выбранного, наиболее эффективного действующего вещества - левамизола гидрохлорида, разработан препарат филомед. Проведены комплексные фармако-токсикологические исследования нового препарата, включающие определение параметров общей токсичности и фармакокинетики. Определены оптимальные лечебные дозы препарата при филометроидозе карпа, проведена ветеринарно-санитарная оценка рыбы, подвергнутой обработке филомедом, и рассчитана экономическая эффективность ветеринарных мероприятий.

Теоретическая и практическая ценность работы. В результате проведенных исследований теоретически обоснована и практически подтверждена возможность безопасного использования филомеда в качестве лекарственного средства для лечения карпа при филометроидозе.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- выбор действующего вещества и разработка препарата для лечения филометроидоза карпа;
- изучение токсичности филомеда на лабораторных животных и карпе;
- определение параметров фармакокинетики филомеда, в том числе остаточных количеств;
- определение оптимальных доз и изучение эффективности филомеда при филометроидозе карпа;
- ветеринарно-санитарная оценка рыбы после применения препарата.

Апробация результатов исследований. Основные результаты работы доложены и обсуждены на международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Вопросы ветеринарии и биотехнологии» ФГОУ ВПО МГАВМиБ, Москва, 2009 г; VII Международной научно – практической конференции «Аквариум, как

средство познания мира», Москва, 2010 г.; LXIV научной конференции молодых ученых и студентов СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 2010г.; Международной конференции в рамках выставки «Золотая осень 2010» «Развитие сельскохозяйственного рыбоводства в Российской Федерации», Москва, 2010 г.

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 4 научные работы, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в которых изложены основные положения и выводы по изучаемой проблеме.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список литературы, приложения. В диссертации 35 таблиц, 12 графиков и 13 рисунков. Всего использовано 166 литературных источников, в том числе 26 зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа проводилась в 2008 – 2010 годах в лаборатории токсикологии и санитарии кормов Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, на базе научно – внедренческого центра «Агроветзащита», рыбоводных хозяйств ООО «Рыбколхоз им. И.В. Абрамова» (Ростовская область), ООО «Слободская сагва» (Ростовская область), ООО «РыбИнвестАгро» (Ростовская область), ООО «Ихтис» (Ростовская область), ЗАО «Егорьевский рыбокомбинат» (Московская область), ООО «Рыбколхоз Полдеревский» (Нижегородская область), ООО «РП№1» (Ставропольский край), сотрудникам которых выражаем искреннюю благодарность за организационно - техническое содействие.

Материалом для исследований служили вещества, обладающие нематодоцидным действием: левамизол гидрохлорид, эммамектина бензоат и ивермектин, которые были использованы в скрининговых опытах по выявлению их острой токсичности и эффективности при филометроидозе карпа. На основании полученных результатов исследований было выбрано действующее вещество для разработки препарата филомед, который изучали с точки зрения его фармако - токсикологических свойств.

В экспериментальной части работы было использовано 107 белых беспородных мышей массой 18 -20 г, 309 белых крыс массой тела 180-220 г и 850597 экз. карпа (*Cyprinus carpio*) различных возрастных групп (сеголетки от 50 до 250 г и товарная рыба от 800 г до 1, 5 кг).

Группы животных разных видов (мыши, крысы и рыбы) подбирались по принципу аналогов. Работа проводилась с соблюдением правил,

предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов.

При изучении острой токсичности определяли переносимые, токсические и летальные дозы фармакологических веществ, причины наступления гибели животных.

Изучаемые препараты вводили *per os* с помощью зонда (шприц с оливой на игле), дробно, натошак, непосредственно в желудок мышам и крысам или в пищевод карпу. В течение 14 дней после введения препаратов осуществлялось наблюдение за состоянием животных. Выживших животных в конце опыта убивали и подвергали патологоанатомическим исследованиям.

Смертельную концентрацию испытуемого вещества (левамизола гидрохлорида) определяли по общепринятым в водной токсикологии методам определения токсичности растворенных в воде веществ для рыб (Лукьяненко В.И., 1967).

Параметры острой токсичности рассчитывали методом пробит – анализа по Литчфилду и Уилкоксоу (1949) в модификации З. Рота и математическим методом Кербера (Беленький М.Л., 1963).

Результаты опытов по определению параметров острой токсичности оценивали в соответствии с общепринятой классификацией химических веществ по степени опасности (ГОСТ 12.1.007.76), смертельную концентрацию оценивали в соответствии с классификацией Дон-Херти (1951).

Местное (пререзорбтивное) действие филомеда изучали на клинически здоровых беспородных белых крысах и мышах массой тела 180-220 г и 18-20 г, соответственно, обоего пола. Сенситизацию проводили многократными аппликациями в течение 10 дней.

При исследовании местного действия, филомед вносили однократно в конъюнктивный мешок мышей и крыс. Влияние препарата учитывали трижды: через 5 минут, спустя 24 и 48 ч.

Кожно-резорбтивное действие филомеда определяли методом погружения хвоста (пробирочным методом). Погружение хвоста проводили ежедневно в течение 10 дней на 2/3 длины в суспензию препарата. В течение последующих 14 дней за животными вели постоянное клиническое наблюдение.

Определение параметров субхронической токсичности филомеда проводили на крысах и карпе по методу Лима и соавторов (1961). Во время экспериментов опытных и контрольных животных, используемых для оценки субхронической токсичности, подвергали комплексным клиническим, патоморфологическим и гистологическим исследованиям. Степень кумуляции оценивали в соответствии с классификацией Л.М.Медведя (1964).

Хроническую токсичность филомеда изучали на белых крысах обоего пола массой тела 180-220 г и на карпе массой тела 100±10 г. На протяжении всего опыта (30 дней) животные находились под систематическим ежедневным наблюдением. Учитывалось клиническое состояние животных,

аппетит, состояние покровных тканей. Проводились гематологические и биохимические исследования по общепринятым методам. Кровь у крыс и рыб брали натощак. Кровь у рыб брали из хвостовой артерии с помощью шприца. Животных, убитых в конце эксперимента, подвергали патологоанатомическим исследованиям.

Д.Г. Розин (1964) разработал методику оценки детоксицирующей функции печени, в основе которой лежит изменение продолжительности наркотического сна. Наркоз животных вызывали 2% раствором гексенала. Гексенал инъецировали через 1, 4, 8 и 24 часа после введения животным филомеда. Регистрировали в минутах время наступления наркотического сна (боковое положение) и выхода из наркоза (возвращение в исходное положение).

Для определения динамики изменения концентрации левамизола гидрохлорида в крови рыб, получивших филомед, использовали метод жидкостной хроматографии высокого давления с ультрафиолетовым детектированием. Кровь у рыб брали до введения препарата, далее по прошествии 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часов после обработки.

Определение остаточных количеств левамизола гидрохлорида в мышечной ткани карпа проводили на 3,5,7 и 9 сутки после введения в их организм филомеда с кормом. В опыте использовали по 5 карпов на каждый срок отбора проб.

Изучение эффективности филомеда проводили в два этапа. Вначале определяли оптимальную терапевтическую дозу и схему применения при филометроидозе карпа на небольшом поголовье рыб на базе рыбоводного хозяйства «Рыбколхоз им. И.В.Абрамова» (Ростовская область). Для этого было сформировано 7 групп по 25 рыб в каждой. Рыб помещали в разгороженные сеткой бассейны. Препарат в составе 2% крахмального геля с помощью катетера вводили рыбе в пищевод в различных дозах и с различной кратностью. Контрольной группе вводили 2% крахмальный гель в аналогичном объеме.

Далее проводили испытания препарата в условиях производства в рыбоводческих хозяйствах. Объектом исследования служили спонтанно инвазированные филометроидозом карпы (*Surpinus carpio*) различных возрастных групп и различной массы тела. Предварительно проводили вскрытие 20 - 25 экз. карпа для определения нахождения нематод в плавательном пузыре и в чешуйных кармашках рыб.

Препарат задавали рыбе в дозе 500 мг/кг икhtiомассы двукратно с интервалом 24 часа в составе кормолекарственной смеси методом вольного группового скармливания без предварительной голодной диеты согласно технологии кормления, используемой в хозяйстве.

В течение последующих шести - десяти дней после дачи препарата при контрольном облове вели наблюдение за состоянием животных. В конце опыта рыб убивали и подвергали патологоанатомическому исследованию. Фармакологическую активность препарата учитывали по количеству живых и мертвых особей гельминта в чешуйных кармашках и в плавательном

пузыре у контрольных и подопытных рыб. Учет эффективности препарата проводили с расчетом экстенс- и интенсэффективности.

Ветеринарно - санитарную оценку рыб подопытных и контрольных групп проводили в лаборатории Семикаракорской районной СББЖ Ростовской области в соответствии с правилами проведения ветеринарно-санитарной экспертизы пресноводной рыбы. Для определения доброкачественности рыбы были проведены органолептические, физико-химические (ГОСТ 7631 – 2008) и микробиологические исследования.

Экономическую эффективность применения филомеда для лечения филометраидоза карповых рыб рассчитывали в соответствии с «Методикой определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий».

Полученные цифровые данные подвергали обработке методами математической статистики, принятой в биологии и медицине (Лакин Г.Ф., 1990) с использованием программы Biostat. Достоверность различия средних показателей по группам оценивали на основании критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при уровне вероятности $p \leq 0,05$.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Разработка филомеда

На основании анализа литературных данных в скрининговые опыты были взяты три вещества, обладающие антигельминтной активностью по отношению к нематодам: эммамектина бензоат, ивермектин и левамизола гидрохлорид. Определялись и сравнивались параметры острой токсичности выбранных веществ и эффективность против гельминтов при естественном заражении рыб филометраидозом. Результаты экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Острая токсичность и эффективность различных антигельминтных веществ

Действующее вещество	Токсичность, мг/кг		Группа	Доза, мг/кг м.т.	Кол-во рыб в группе	Кол-во вылеченных рыб, через	
	LD ₅₀	LD ₁₀₀				3 дня	6 дней
Эммамектина бензоат	33	39	1	13	10	0	0
Эммамектина бензоат			2	23	10	0	0
Эммамектина бензоат			3	33	10	0	0
Ивермектин	1.35	1.87	4	0,7	10	0	0

Ивермектин			5	0,9	10	0	0
Ивермектин			6	1,3	10	0	0
Левамизола гидрохлорид	588	1005	7	200	10	5	10
Левамизола гидрохлорид			8	300	10	6	10
Левамизола гидрохлорид			9	550	10	10	10

Установлено, что эммамектина бензоат и ивермектин являются высокотоксичными соединениями для рыб, в испытанных дозах данные соединения не вызывали гибели нематод. Левамизола гидрохлорид имеет выраженное антигельминтное действие при филометроидозе карпа. Так уже через 3 дня после введения вещества в дозе 200 мг/кг массы тела отмечалось освобождение 50% рыб от гельминтов, а через 6 дней гельминтов не обнаруживали.

На основании результатов, полученных в ходе скрининговых экспериментов, в качестве действующего вещества для нового препарата был выбран левамизола гидрохлорид, как наиболее безвредное и эффективное средство из апробированных.

С использованием выбранного в ходе предыдущих экспериментов действующего вещества была разработана лекарственная форма филомеда, представляющая собой порошок. 1 г препарата содержит 200 мг действующего вещества левамизола гидрохлорида.

Органолептические, физико-химические и биологические показатели филомеда должны соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 2.

Таблица 2

Физико-химические свойства филомеда

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Однородный порошок
Цвет	От желтого до светло-коричневого
Подлинность левамизола гидрохлорида	Должен выдержать испытание
Массовая доля левамизола гидрохлорида, %	20,0 ± 2,0
Массовая доля влаги, %, не более	15,0
Испытание на токсичность в тест-дозе	Должен выдержать испытание
Микробиологическая чистота	Должен выдержать испытание

2.2.2. Результаты изучения токсичности

2.2.2.1. Результаты изучения острой токсичности

Оценку острой токсичности филомеда проводили на белых беспородных мышах, крысах и рыбе. В ходе экспериментов определяли параметры острой токсичности, значимые дозы, проводили систематические клинические и патологоанатомические исследования. Результаты экспериментов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты изучения острой токсичности филомеда при оральном введении

Вид животного	LD ₀ , мг/кг	LD ₁₆ , мг/кг	LD ₅₀ , мг/кг	LD ₈₄ , мг/кг	LD ₁₀₀ , мг/кг
Мыши	2500	2716	3040	3365	3500
Крысы	1969	2254	2671	3089	3374
Карп	2500	2702	3000	3297	3446

Клиническая картина отравления лабораторных животных (крыс, мышей) после введения больших доз препарата была сходна и проявлялась развитием общего угнетения. Животные сидели с полуприкрытыми глазами, сбившись в кучку. Реакция на внешние раздражители слабо выражена. Аппетит отсутствовал. Дефекация у животных учащалась. В таком состоянии животные находились несколько часов, постепенно клинические признаки интоксикации ослабевали и полностью исчезали через сутки. После введения препарата в смертельных дозах общее состояние животных значительно ухудшалось. Гибель крыс и мышей наступала по прошествии нескольких часов.

У рыб картина отравления характеризовалась хаотичными плавательными движениями, прогрессирующим расстройством равновесия и гибелью в течение 15 минут - 1 часа. У выживших карпов возбуждение сменялась угнетением через 30-40 мин. Рыба ложилась на дно и слабо реагировала на внешние раздражители. Отмечались незначительные кровоизлияния в белковую оболочку глаз. Через 24 часа двигательная активность восстанавливалась и рыба выздоравливала в течение нескольких суток.

Проведенное патологоанатомическое вскрытие павших животных показало сильную воспалительную реакцию внутренних органов. Желудок вздут и наполнен препаратом. Кишечник у животных гиперемирован, имеет вздутия. Селезенка увеличена.

Филомед, согласно общепринятой классификации химических соединений по степени опасности, может быть отнесен к 3 классу (умеренно опасные соединения - ГОСТ 12.1.007 - 76).

2.2.2.1.2. Определение смертельной концентрации левамизола

Определить параметры смертельной концентрации препарата филомед не представляется возможным, так как он не растворяется в воде, поэтому определяли параметры смертельной концентрации для действующего вещества, входящего в состав препарата – левамизола гидрохлорида (таблица 4).

Таблица 4

Параметры смертельной концентрации левамизола гидрохлорида для карпа

Вид животного	СК ₀ , мг/л	СК ₁₆ , мг/л	СК ₅₀ , мг/л	СК ₈₄ , мг/л	СК ₁₀₀ , мг/л
Карп	27,5	30,24	37,32	44,40	45,0

При концентрации изучаемого препарата в воде до 27,5 мг/л признаков токсикоза отмечено не было. При более высоких концентрациях вещества в воде отмечались симптомы отравления, которые усиливались в соответствии с количеством вводимого вещества. Клиническая картина токсикоза при введении препарата в концентрации большей СК₅₀ заключалась в быстром хаотичном плавании, прогрессирующем расстройстве равновесия и гибели рыб в течение 15-30 минут. При введении среднететальной и более низкой дозы препарата наблюдали сходную картину. Часть рыб погибала. У выживших возбуждение через 30-40 мин сменялась угнетением. Рыбы ложились на дно и практически не проявляли признаков жизни. Отмечали незначительные кровоизлияния в белковую оболочку глаз. Через 24 часа двигательная активность восстанавливалась и рыба выздоравливала в течение нескольких суток. Реакция рыб на внешние раздражители восстанавливалась.

По общепринятой классификации растворенных в воде веществ левамизола гидрохлорид может быть отнесен к сильно токсичным веществам. Однако, потенциальную опасность отравления рыб при применении препарата филомед можно определить исходя из следующих расчетов. Средняя плотность посадки рыб в рыбоводных прудах – 800 кг/га, рекомендуемая доза препарата по действующему веществу составляет 100 мг/кг икhtiомассы. При двукратном применении будет внесено 160 г левамизола (800 кг x 200 мг). Даже если предположить, что весь левамизол выделится в неизменном виде в водоем, его концентрация составит 0,01 мг/л, что в 2000 раз меньше, чем доза, вызывающая смерть рыбы.

2.2.2.2. Результаты изучения местного раздражающего и кожно – резорбтивного действия филомеда

В результате проведенных исследований подсчитать ЛД₅₀ филомеда при нанесении на кожу не представлялось возможным, так как при проведении экспериментов методом кожных аппликаций гибели животных (мышей, крыс) не отмечалось.

Ежедневные аппликации препарата в течение 10 дней не вызвали каких-либо изменений состояния кожи: не было отмечено признаков раздражения, воспаления, интоксикации. Изменений толщины кожной складки так же не установлено.

При исследовании местного действия на слизистые оболочки было установлено, что через 5 минут, 24 и 48 часов никаких видимых изменений в поведении животных и в состоянии роговицы глаза не происходит. Покраснений, воспалительных явлений, отечности глаз не было отмечено.

При погружении хвостов животных в пробирки с препаратом и их фиксации в таком положении у животных опытных и контрольных групп не отмечалось изменений кожи хвоста, случаев гибели и каких-либо признаков интоксикации.

На основании результатов проведенных экспериментов можно утверждать, что филомед не обладает местным раздражающим и кожно-резорбтивным действием.

2.2.2.3. Оценка подострой токсичности филомеда

2.2.2.3.1. Оценка подострой токсичности филомеда для крыс

Изучение подострой токсичности филомеда проводили на белых линейных крысах массой тела 180-220 г по методу Лима с соавт. (1961). Группы подопытных и контрольных крыс формировали по принципу аналогов. В каждой группе по 10 животных (таблица 5).

Таблица 5

Результаты изучения субхронической токсичности филомеда для крыс

Показатели	Дни опыта									
	1-16	17	19	23	24	25	26	27	28	29
Суммарная доза филомеда, тыс. мг/кг	8,6	10,0	12,7	20,1	22,2	25,2	28,2	31,3	34,3	38,8
Количество павших крыс	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1
Количество павших крыс в нарастающем порядке	0	1	2	3	4	6	7	8	9	10
ЛД ₅₀ , мг/кг	23164									
K _{кум}	8.7									

Клиническая картина подострого токсикоза, вызванного введением препарата в дозе 5000 – 38871 мг/кг массы тела, характеризовалась развитием у крыс признаков депрессии и угнетения. Животные были апатичны, слабо

реагировали на внешние раздражители. Аппетит и жажда были сохранены. На более поздних этапах опыта крысы были истощены, аппетит нарушался, возникали фебрильные подергивания мышц конечностей. Животные старались зарыться в опилки и остаться неподвижными. Крысы истощены, гибли в коматозном состоянии.

При патологоанатомическом вскрытии трупов крыс отмечали признаки катарально - геморрагического гастроэнтерита, застойной гиперемии желудка и кишечника. Печень увеличена коричнево - красного цвета. Слизистая желудка атрофирована, орган наполнен препаратом, сильно увеличен. Кишечник наполнен газами, местами атрофирован. При проведении патогистологического исследования тушек крыс, отмечали атрофические, дистрофические и воспалительные изменения.

Коэффициент кумуляции, вычисленный по формуле Ю.С.Кагана и В.В.Станкевича (1964), составил 8,7. Препарат относится к группе веществ со слабо выраженной способностью к накоплению.

2.2.2.3.2. Оценка подострой токсичности филомеда для карпа

При определении параметров подострой токсичности и коэффициента кумуляции филомеда для карпа использовали метод субхронической токсичности по Лиму с соавт. (1961). Для проведения эксперимента были сформированы опытная и контрольная группы карпов. В каждой группе по 10 рыб массой тела 100 ± 10 грамм (таблица 6).

Таблица 6

Результаты изучения субхронической токсичности филомеда для карпа

Показатели	Дни опыта							
	1-18	19	20	21	22	23	24	25
Суммарная доза филомеда, тыс. мг/кг	12,7	14,3	15,8	18,1	20,3	22,6	24,9	28,3
Количество павших рыб	0	1	1	1	1	2	3	2
Количество павших рыб в нарастающем порядке	0	1	2	3	4	5	8	10
ЛД ₅₀ , мг/кг	21421							
K _{кум}	7.14							

Клиническая картина подострого токсикоза, вызванного введением препарата, характеризовалась развитием у карпа признаков угнетения. Рыба меняла окраску, плохо реагировала на внешние раздражители. Нарушалась координация движений, аппетит был сохранен. На более поздних этапах опыта карпы были истощены, аппетит нарушался.

При проведении патологоанатомического вскрытия павших рыб отмечали экссудат в брюшной полости. Печень и селезенка были увеличены, красно-коричневого цвета. Желудок был сильно увеличен, наполнен препаратом, слизистая желудка и кишечника атрофирована, так же наблюдались признаки катарально-геморрагического гастроэнтерита. При проведении патогистологического исследования карпов, погибших в ходе опыта, отмечали воспаление, атрофические и дистрофические изменения.

Коэффициент кумуляции филомеда, вычисленный по формуле Ю.С.Кагана и В.В.Станкевича (1964), для карпа составил 7,14 (слабо выраженная кумуляция).

2.2.2.4. Изучение хронической токсичности филомеда

Хроническую токсичность филомеда изучали на белых крысах обоего пола массой тела 180-220 г и на карпе массой тела 100 ± 10 г. Были сформированы по 3 группы каждого вида животных по 15 особей: две подопытные и одна контрольная. Препарат вводили животным внутрь с помощью шприца с оливой в течение 10 суток.

В результате проведенных исследований установлено, что ежедневное введение препарата крысам в дозах 500 и 1000 мг/кг, а карпу в дозах 500 и 800 мг/кг массы тела не вызвало значительных изменений в поведении животных, потреблении корма и воды, как в ходе постановки эксперимента, так и в течение всего срока наблюдения (30 дней). Гибели крыс и карпа в опытных и контрольных группах не отмечалось.

Еженедельный привес крыс и карпа подопытных и контрольных групп в течение опыта достоверно не отличался. Весовые коэффициенты исследуемых органов крыс в период всего эксперимента колебались в пределах нормы и не отличались достоверно от контрольных животных.

Гематологические и биохимические показатели крови подопытных крыс и рыб при длительном использовании филомеда в терапевтической дозе 500 мг/кг массы тела во все периоды исследований не отличались достоверно у животных всех групп. При использовании препарата в дозах, существенно превышающих рекомендуемую, отмечалось достоверное снижение уровня гемоглобина и количества эритроцитов в крови подопытных животных по сравнению с контролем, однако, эти показатели оставались в пределах физиологической нормы. В сыворотке крови отмечалось незначительное снижение содержания креатинина и общего белка. То есть можно утверждать, что длительное введение в организм крыс и рыб филомеда в высоких (токсических) дозах влияет на белок синтезирующие функции организма, а также эритро- и гемопоэз, что следует учитывать при хроническом отравлении животных.

При проведении патологоанатомических исследований крыс и рыб, убитых в конце эксперимента, установлено, что для всех животных была характерна картина, свойственная здоровым животным.

2.2.2.5. Результаты изучения влияния филомеда на антитоксическую функцию печени

Исходя из данных, представленных в таблице 7, следует, что продолжительность гексеналового сна у животных всех опытных и контрольных групп колебалась незначительно от $27,6 \pm 1,4$ до $29,0 \pm 1,6$ минут после введения гексенала. Продолжительность сна не зависела от времени наркотизации после введения филомеда - через 1, 4, 12 или 24 часа ($P > 0,05$).

Таблица 7

Влияние филомеда на антитоксическую функцию печени

Группы	Доза филомеда, мг/кг	Кол-во животных в группе	Время введения гексенала через, ч	Продолжительность сна животных, мин
Опытная	500	5	1	$27,6 \pm 0,9$
Контроль	-	5	1	$28,7 \pm 0,8$
Опытная	500	5	4	$28,4 \pm 0,4$
Контроль	-	5	4	$28,3 \pm 0,7$
Опытная	500	5	12	$28,3 \pm 0,5$
Контроль	-	5	12	$28,7 \pm 0,6$
Опытная	500	5	24	$28,0 \pm 0,9$
Контроль	-	5	24	$28,9 \pm 0,4$

На основании полученных результатов можно заключить, что изучаемый препарат после введения в организм лабораторных животных орально в дозе 500 мг/кг массы тела не влияет на продолжительность наркотического сна, а, следовательно, и на антитоксическую функцию печени.

2.2.3. Определение параметров фармакокинетики филомеда

2.2.3.1. Результаты определения концентрации левамизола в плазме крови рыб

Определение концентрации левамизола в плазме крови карпа после введения терапевтических доз филомеда проводили методом высокoeffективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. Результаты экспериментов представлены на графике 1.

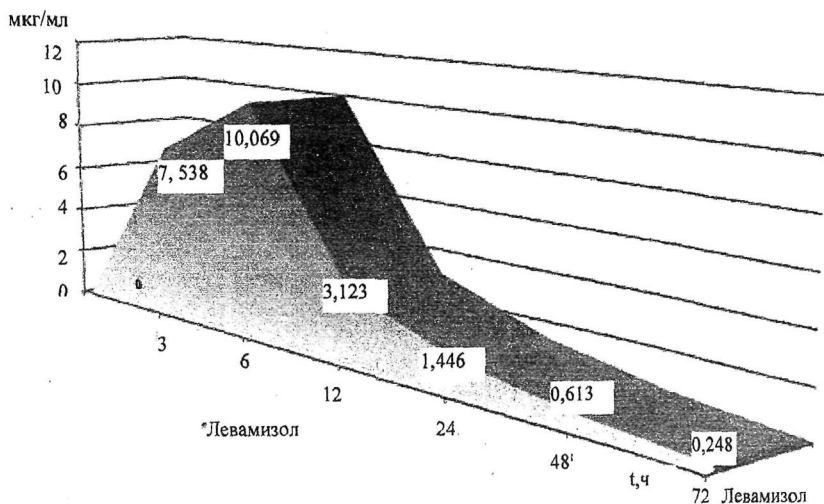


График 1. Изменение концентрации левамизола в крови рыб

Полученные результаты свидетельствуют, что при применении филомеда левамизола гидрохлорид всасывается в желудочно-кишечном тракте, достигая максимальной концентрации в крови через 6 часов (10,07 мкг/мл). В последствии наблюдалось постепенное снижение содержания вещества в крови рыб и через 72 часа левамизола гидрохлорид регистрировали в минимальных концентрациях - 0,25 мкг/мл.

2.2.3.2. Результаты определения концентрации левамизола в мышечной ткани рыб

Определение содержания левамизола в мышечной ткани рыб после введения филомеда так же проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты проведенных исследований (график 2) свидетельствует о том, что полное выведение остаточных количеств левамизола гидрохлорида из организма (мышечной ткани) рыб составляет 9 суток после окончания применения филомеда в терапевтических дозах. Максимальные концентрации левамизола в мышечной ткани рыб регистрировали через 3 суток (114,25 нг/г). На 5 сутки наблюдали значительное снижение концентрации левамизола гидрохлорид (37,398 нг/г), а на 7 сутки минимальные следовые остаточные количества левамизола гидрохлорида обнаружены лишь в одной пробе из пяти.

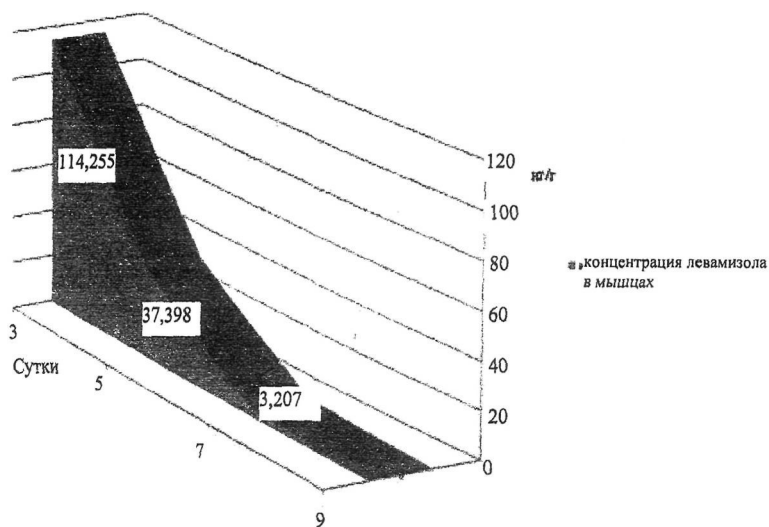


График 2. Концентрация левамизола в мышечной ткани рыб

2.2.4. Изучение терапевтической эффективности филомеда

2.2.4.1. Установление эффективной терапевтической дозы филомеда

Для изучения эффективности препарата филомед, было сформировано 6 опытных группы рыб, спонтанно зараженных филометроидозом. Филомед вводили в пищевод карпов через катетер в составе 2% крахмального геля. Первая группа получила препарат в дозе 200 мг/кг однократно; вторая группа в той же дозе двукратно с интервалом 24 часа; третья группа 500 мг/кг однократно; четвертая группа в той же дозе двукратно; пятая группа 750 мг/кг однократно; шестая группа в той же дозе двукратно. Контрольная группа лечению не подвергалась, рыбе вводили то же количество геля без препарата. Кормление осуществляли один раз в день гранулированным кормом. Через 10 суток после последней дачи филомеда было проведено паразитологическое обследование рыб в опытных и контрольной группах. Результаты опытов представлены в таблице 8.

Препарат продемонстрировал наибольшую эффективность при двукратном применении в дозах 500 и 750 мг/кг ихтиомассы. Исходя из полученных данных, можно предположить, что наиболее эффективная и экономически выгодная доза - 500 мг/кг, соответственно, ее и целесообразно считать оптимальной.

Таблица 8

Эффективность различных доз филомеда

Группа	Кол-во рыб	Разовая доза, мг/кг	Кратность введения	Пораженность нематодами после лечения, %	Терапевтическая эффективность, %
1	25	250	1	90	10
2	25	250	2	80	20
3	25	500	1	40	60
4	25	500	2	0	100
5	25	750	1	20	80
6	25	750	2	0	100
Контроль	25	-	-	90	0

2.2.4.2. Изучение терапевтической эффективности филомеда при филометроидозе карпа

Всего в экспериментах было использовано 850150 экз. разновозрастных карпов. Результаты изучения эффективности препарата филомед в производственных условиях представлены в таблице 9.

Таблица 9

Эффективность филомеда при филометроидозе карпа

Пруд	До обработки			После обработки			ЭЭ, %	ИЭ, %
	Вскрыто рыб, экз	ЭИ, %	ИИ, %	Вскрыто рыб, экз	ЭИ, %	ИИ, %		
ООО «Рыбколхоз им. И.В.Абрамова»								
Пруд № 4 150000 экз.	20	20	1,8	100	0	1	100	100
ООО «РыбИнвестАгро»								
Пруд № 19 120000 экз.	50	50	2,8	80	0	0	100	100
ООО «Слободская сагва»								
Пруд № 7 70000 экз.	20	30	2,1	100	0	0	100	100
ООО «Ихтис»								
Пруд № 4 150000 экз.	20	20	4,3	50	0	0	100	100
ЗАО «Егорьевский рыбокомбинат»								
Пруд №3 110000 экз	10	90	7,6	10	10	1	88,9	86,9
Пруд №5 170000 экз.	10	70	5,6	10	0	0	100	100
Пруд №6 5000 экз.	10	80	6,3	10	0	0	100	100

Пруд № 7 20000 экз.	10	80	7,2	10	0	0	10 0	100
ООО «Рыбколхоз Поддеревский»								
Пруд № 4 150000 экз.	20	70	2,8	100	0	0	10 0	100
ООО «Рекламное предприятие №1»								
Пруд № 4 14000 экз.	20	50	2	25	0	0	10 0	100

При проведении производственных испытаний в различных регионах РФ препарат продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность (88,9-100,0%). Филомед был эффективен при филометроидозе карпа в широком диапазоне температур от 16 до 26° С, т.е. в промежутке температур когда происходит развитие и рост нематод. Препарат оказал влияние, как на половозрелых особей, так и на преимагинальные стадии развития нематод. Препарат пригоден для обработки рыб в различные периоды: как весной в период яркого клинического проявления заболевания, так и в конце лета – начале осени.

При проведении производственных испытаний препарата не было выявлено каких-либо побочных эффектов или осложнений.

2.2.5. Ветеринарно – санитарная оценка рыбы после применения филомеда

После проведения экспериментов по определению эффективности филомеда при филометроидозе карпа была проведена ветеринарно-санитарная оценка рыб, обработанных препаратом в терапевтической дозе. Органолептические, физико-химические и микробиологические показатели мяса рыб обеих групп соответствовали требованиям, предъявляемым к доброкачественной рыбе. Рыба свежая, доброкачественная, без каких либо пороков. По органолептическим показателям и результатам лабораторных исследований рыба признана пригодной в пищу людям и подлежит свободной реализации. Следовательно, какого-либо неблагоприятного влияния на качество рыбной продукции филомед не оказывает.

2.2.6. Экономическая эффективность применения филомеда в рыбоводстве

Экономическая эффективность применения филомеда при филометроидозе карпа рассчитывалась на основании результатов производственных опытов (таблица 10).

Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий

Предотвращенный ущерб	1152000 руб.
Ветеринарные затраты	4469 руб.
Экономический эффект	1147531 руб.
Эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат	257 руб.

Таким образом, проведение мероприятий по лечению филометроидоза карпа экономически выгодно, так как на каждый рубль ветеринарных затрат хозяйство сохраняет 257 рублей.

ВЫВОДЫ

1. Разработано новое фармакологическое средство филомед, предназначенное для борьбы с филометроидозом карпа. В 1 г препарата содержится 200 мг левамизола гидрохлорида. Препарат относится к 3 классу опасности – умеренно опасные вещества в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76.

2. Филомед не обладает выраженным местным раздражающим и кожно-резорбтивным действием, не вызывает изменений поверхности кожи и слизистых оболочек у лабораторных животных.

3. Коэффициент кумуляции филомеда для крыс составляет 8,7, для карпа – 7,14, что позволяет отнести препарат к группе веществ со слабо выраженным эффектом кумуляции.

4. В хронических экспериментах при многократном введении препарата в течение 10 дней лабораторным животным и рыбам не установлено существенных изменений в клиническом статусе животных, картине крови и патологоанатомического вскрытия.

5. Введение филомеда в дозе 500 мг/кг массы тела в организм лабораторных крыс не влияет на продолжительность наркотического сна и, следовательно, на антитоксическую функцию печени.

6. Максимальная концентрация левамизола в крови наблюдается через 6 часов после введения филомеда, далее происходит ее снижение в течение 72 часов. Выведение остаточных количеств левамизола происходит в течение 9 суток.

7. Филомед обладает антигельминтной активностью при филометроидозе карпа в дозе 500 мг/кг ихтиомассы в составе кормолекарственной смеси при двукратном введении с интервалом 24 часа. Экстенс-эффективность составляет 88,9-100%, интенс-эффективность – 86,9-100%.

8. Применение препарата филомед не вызывает изменений товарного вида, органолептических, физико-химических и бактериологических показателей рыбы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. В результате проведенных исследований теоретически обоснована и практически подтверждена возможность безопасного использования филомеда в качестве лекарственного средства для лечения карпа при филометроидозе. Препарат необходимо давать зараженной рыбе в составе кормолекарственной смеси двукратно из расчета 500 мг/кг ихтиомассы.

2. Для специалистов Госветслужбы, рыбоводных предприятий и ихтиопатологов, занимающихся выращиванием товарного карпа на территории РФ подготовлено «Методическое пособие по борьбе с филометроидозом карповых рыб в прудовых хозяйствах», рассмотренное и одобренное ученым советом ГНУ ВНИИВСГЭ и секцией «Ветеринарная санитария, гигиена и экология» Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 6 от 22 октября 2010 г.)

3. Результаты исследований использованы при разработке проектов нормативных документов:

- «Инструкция по применению филомеда для лечения филометроидоза карпа»

- «Филомед. Технические условия»– СТО 76069684-0087-2010

4. Результаты исследований предлагается использовать в учебном процессе при чтении лекций или проведении лабораторных занятий со студентами по фармакологии (раздел «Антигельминтики»), паразитологии («Паразитарные болезни рыб»), ихтиопатологии («Нематодозы рыб»), на курсах (факультетах) повышения квалификации рыбоводов и ихтиопатологов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Уразаева, Р.Д. Изучение острой токсичности препарата Филомед на белых мышах / Уразаева Р.Д., Дельцов А.А.// Веткорм. – 2009. - №6. – С.50-51.

2. Уразаева, Р.Д. Новый препарат против филометроидоза карпа/ Уразаева Р.Д.// Мат. 64-й науч.конф.мол.учен. и студ. СПбГАВМ.-СПб.,2010.- С.90-91.

3. Уразаева, Р.Д. Филомед для лечения карпов при филометроидозе /Уразаева Р.Д.// Ветеринария. – 2010. - №4. – С.22-24.

4. Методическое пособие по борьбе с филометроидозом карповых рыб в прудовых хозяйствах/ В.И. Дорожкин, Р.Д. Уразаева, С.В. Енгашев, К.В. Гаврилин. -М., 2010. – 19с.

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»

ПД № 1-00007 от 25.09.2000 г.

Подписано в печать 17.11.2010

Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,5

Печать авторефератов (495)730-47-74, 778-45-60