

СЕМЕРЯК ЕЛЕНА ВАСИЛЬЕВНА

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ТОКСИЧНОСТИ И
ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ИВЕРМЕКТИНА
НА ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ**

16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Омск – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет»

Научные руководители: доктор ветеринарных наук, профессор
Герунов Владимир Иванович
доктор ветеринарных наук, профессор
Герунова Людмила Карповна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Шведов Сергей Иннокентьевич
доктор биологических наук
Аликин Юрий Серафимович

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова»

Защита состоится 8 декабря 2009 г. в 12³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.050.03 при ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» в институте ветеринарной медицины ОмГАУ по адресу: 644122, г. Омск – 122, ул. Октябрьская, 92, (3812) 23-74-71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет и на официальном сайте www.omgau.ru

Автореферат разослан «06» ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат ветеринарных наук, доцент

Н. П. Жабин

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Развитие сельского хозяйства ни в одной экономически развитой стране невозможно представить без применения пестицидов. Основную массу используемых в мире пестицидов составляют соединения разных химических групп. Ввиду их потенциальной опасности для животных, человека и окружающей среды весьма актуальной является токсикологическая оценка препаратов (В. В. Напалкова, В. Е. Абрамов, 2008). Обеспеченность растущим и не всегда контролируемым использованием химических пестицидов, а также стремление к получению экологически безопасных продуктов питания способствуют развитию альтернативных вариантов.

По оценке специалистов МОТ и ВОЗ, в Российской Федерации в 2007г. заболевания (отравления) людей, вызванные воздействием химических факторов, составляли 8,4%; аллергические заболевания – 2,9% (Н. Ф. Измеров, 2008).

Биопестициды группы авермектина имеют ряд преимуществ по сравнению с химическими средствами: высокую эффективность в отношении широкого круга вредителей, медленное развитие резистентности, сравнительно низкую кумуляцию в плодах и овощах, короткий срок распада во внешней среде. Препараты данной группы широко применяют для лечения и профилактики арахно-энтомозов и нематодозов сельскохозяйственных и мелких домашних животных. В медицинской практике их используют для профилактики и лечения онхоцеркоза (E. Mutschler, 1997).

Однако отмеченные преимущества биопестицидов не исключают опасность проявления нежелательных реакций, а нарушение регламентов их использования в сельском хозяйстве и дозовых режимов в клинической практике может привести к проявлению отдаленных неблагоприятных эффектов.

В связи с широким применением препаратов группы ивермектина для разных видов животных и человека особый интерес представляет изучение патоморфологических изменений и отдаленных последствий их действия в условиях эксперимента и реальной клинической ситуации.

Цель исследований – определить характер и степень морфологических изменений при экспериментальной интоксикации лабораторных животных и противопаразитарной обработке крупного рогатого скота с обоснованием потенциальной опасности отдаленных эффектов действия ивермектина. Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи:**

- определить параметры токсичности ивермектина для крыс;
- в экспериментальных условиях изучить клиническую картину отравления, гематологические, биохимические и патоморфологические изменения у крыс, возникающие при острой и хронической интоксикациях;
- оценить степень риска трансплацентарных эффектов ивермектина при введении лабораторным животным в период беременности;
- определить гематологические, биохимические и патоморфологические изменения у крупного рогатого скота при проведении противопаразитарных обработок ивермектином.

Научная новизна. Установлена высокая токсичность ивермектина, обоснована опасность его передозировки. В экспериментальных условиях выявлены эмбриотоксические и тератогенные эффекты препарата, в том числе отмечены случаи кальцификации хрусталика у плодов, что может служить причиной врожденной слепоты. При многократном введении ивермектина самкам крыс доказана высокая степень риска патологии репродуктивных органов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Материалы исследований представляют определенную ценность для обоснования гигиенических регламентов применения препаратов на основе ивермектина и дифференциальной диагностики отравлений и лекарственных передозировок. На основании результатов проведенных исследований издано и используется в учебном процессе в Омском государственном аграрном университете учебно-методическое пособие «Биопестициды как лекарственные средства и потенциальные токсиканты» (Омск, 2009).

Апробация результатов научных исследований. Основные материалы диссертационной работы доложены и одобрены на научных конференциях аспирантов и преподавателей ОмГАУ (Омск, 2006; 2007; 2008; 2009 г.г.), IX-й научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных», посвященной 75-летию УГАВМ (Троицк, 2005), V-й межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных» (Омск, 2006), XVIII Международной научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии» (Санкт-Петербург, 2006), II-ой российско-китайской конференции по фармакологии “Fundamental Pharmacology and Pharmacy – Clinical practice” (Пермь, 2006), VII Сибирской ветеринарной конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2007), VI межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 85-летию СибНИВИ-ВНИИБТЖ «Биологические аспекты фундаментальной и прикладной медицины и ветеринарии» (Омск, 2007), VIII Сибирской ветеринарной конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2008).

На защиту выносятся следующие положения:

1. Ивермектин является высокотоксичным соединением политропного действия с преимущественным поражением центральной нервной системы, почек, печени и системы крови.

2. Потенциальная опасность ивермектина обусловлена высокой степенью риска эмбриотоксических и тератогенных эффектов при введении животным в период беременности и развитием патологии органов репродуктивной системы у самок в постинтоксикационный период.

3. Обработка крупного рогатого скота ивермектином вызывает обратимые гематотоксические эффекты и развитие лимфоидных инфильтратов в паренхиматозных органах.

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе две из них – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 163 страницах компьютерного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, практические рекомендации. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 48 рисунками. Список литературы включает 158 источников, в том числе 45 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследования

Тема диссертационной работы является разделом плановой научно-исследовательской работы ОмГАУ «Фармако-токсикологическая оценка новых лекарственных средств и пестицидов» и имеет номер государственной регистрации 01.2.00103080.

Работа выполнена на кафедрах анатомии, гистологии и патологической анатомии; диагностики, внутренних незаразных болезней и фармакологии ФГОУ ВПО ОмГАУ, а также в СПК «Пушкинский» Омского района Омской области в период с 2005 по 2009 гг.

Экспериментальные исследования проведены на 416 лабораторных беспородных крысах, в том числе 80 крысиных плодах и 116 крысятах, 14 коровах черно-пестрой породы в возрасте 5-6 лет. Лабораторных животных содержали в специальном помещении кафедры, их кормление осуществляли согласно нормам рациона для лабораторных животных. Коровы получали стандартный рацион в условиях хозяйства. В опытах использовали 0,1%-ый инъекционный раствор ивермектина «Ивертин» (ООО «ВИК-здоровье животных»). Препарат вводили коровам в соответствии с инструкцией по применению для профилактических и лечебных обработок (подкожно в дозе 0,2 мг/кг по ДВ).

Количество эритроцитов и лейкоцитов определяли в счетной камере Горяева, гемоглобин – цианидным методом, лейкограмму - по мазкам крови, окрашенным по методу Романовского-Гимзы. Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) рассчитывали по методу Я.Я. Кальф-Калифа в модификации Б.А. Рейса и др. Миелопероксидазу в клетках крови выявляли по методу Грэхема-Кнолля, количественную оценку проводили по принципу Негели, качественную - по методу Буртянского, вычисляя гистохимический показатель содержания миелопероксидазы (ГПСм).

Исследования плазмы крови проводили на биохимическом анализаторе «Screen Master» фирмы «Hospitex» (Швейцария, Италия) с использованием реактивов фирм «Hospitex» и «Human» (Германия). Определяли: общий белок, альбумины, глобулины, креатинин, мочевины, общий и непрямой били-

рубин, прямой билирубин, аланинаминотрансферазу (АЛТ), аспартатами-
нотрансферазу (АСТ).

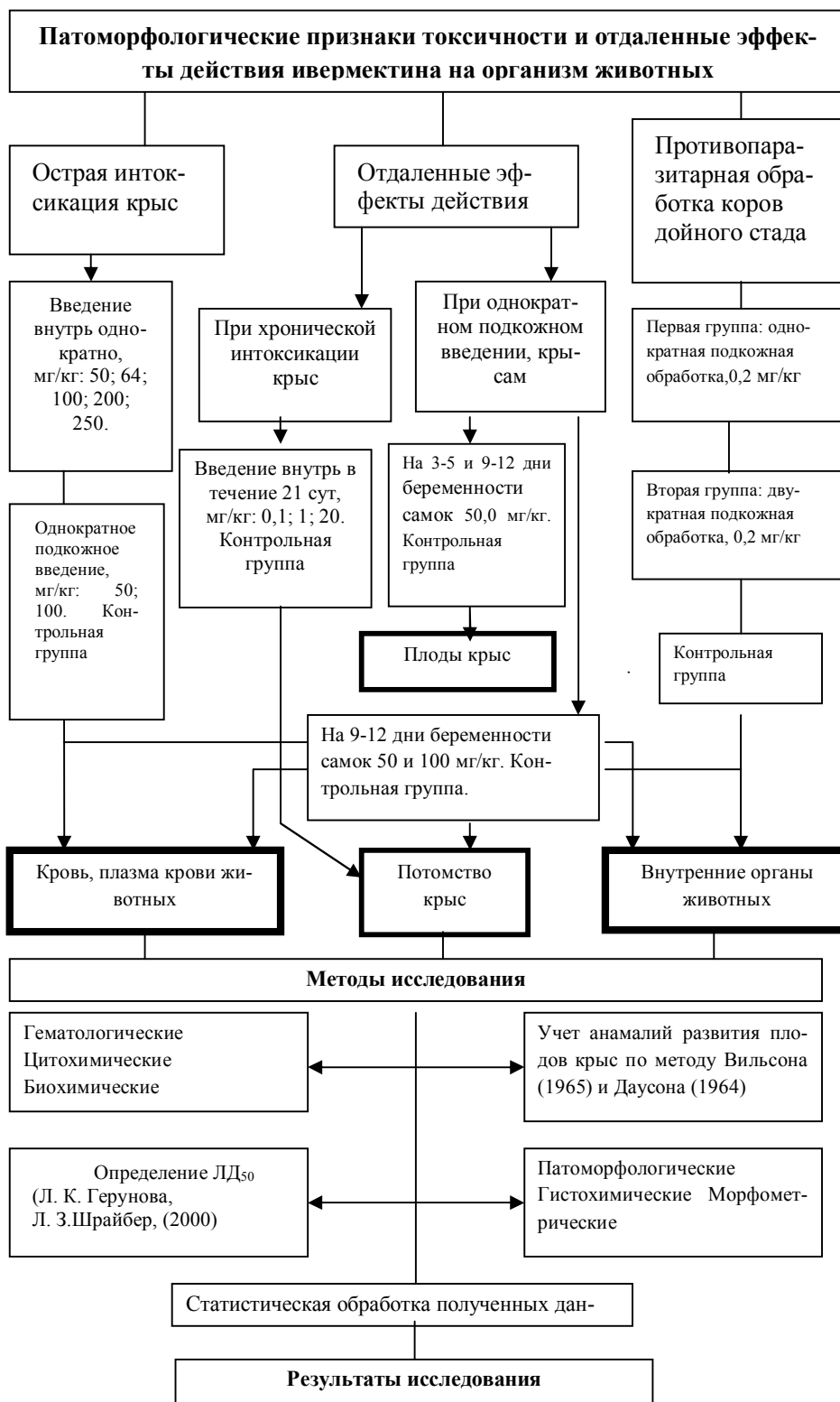


Рисунок 1 – Схема открытого, параллельного, проспективного, нерандомизированного, контролируемого исследования

Для определения ЛД₅₀ ивермектина использовали методику Л. К. Геруновой, Л. З. Шрайбера (2000).

Влияние на потомство крыс оценивали по жизнеспособности, показателям развития, метрическим показателям; эмбриотоксичность - по показателям преемственности и постимплантационной гибели эмбрионов. Терапевтические эффекты изучали по методам Вильсона (1965) и Даусона (1964).

Эвтаназию животных осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2003). Материал от убитых в ходе опытов животных фиксировали в 4 %-ном нейтральном растворе формальдегида и жидкости Карнуа. Срезы получали с парафиновых и замороженных блоков.

Для изучения общей гистоморфологической картины срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) выявляли галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону, общий белок – сулема-бромфеноловым синим, нейтральные жиры – суданом III по Герксгеймеру. Гликоген и нейтральные гликозаминогликаны (ГАГ) выявляли ШИК-реакцией по методу Шабадаса, кислые гликозаминогликаны – альциановым синим по Сидмену, сульфатированные гликозаминогликаны – основным коричневым по Шубичу. Соединения железа окисной формы выявляли реакцией на берлинскую лазурь по Перлсу. Морфометрические исследования проводили с помощью окулярного винтового микрометра МОВ-1-15^х. Статистическую обработку результатов исследований осуществляли на ПК IBM PC с использованием параметрического t-критерия Стьюдента и пакета программ EXEL (М. Додж и др., 1997).

2.2. Острая токсичность ивермектина для крыс

ЛД₅₀ ивермектина для крыс составляет 98,1±14,4 мг/кг. Ивермектин относится к высокотоксичным соединениям.

При остром отравлении ивермектином в дозе 50 мг/кг у крыс в первые сутки отмечали снижение количества эритроцитов до $4,32 \pm 0,13 \times 10^{12}/л$ ($P < 0,01$); лейкоцитов - до $7,3 \pm 0,07 \times 10^9/л$ ($P < 0,02$); уровня гемоглобина - до $68,2 \pm 0,3$ г/л ($P < 0,001$). Через 14 суток количество эритроцитов и лейкоцитов в крови опытных животных составляло $5,12 \pm 0,24 \times 10^{12}/л$ ($P < 0,02$) и $10,5 \pm 0,2 \times 10^9/л$ ($P < 0,01$), но уровень гемоглобина $69,6 \pm 0,4$ г/л ($P < 0,001$) оставался сниженным относительно контрольных крыс.

Количественный состав клеток крови крыс претерпевал значительные изменения в течение первых семи суток после острой интоксикации (табл. 1).

В 1-е, 3-и и 7-е сутки в лейкограмме отмечали увеличение палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, базофилов, эозинофилов.

Регистрировали качественные изменения клеток крови: разрушенные ядра лимфоцитов и ретикулярных клеток, моноциты с вакуолизированным ядром, в сегментоядерных нейтрофилах кариопикноз, отсутствие связи между сегментами ядра, гиперсегментацию ядра, токсическую зернистость и ва-

куоли в цитоплазме, анизоцитоз, гипохромные и полихроматофильные формы эритроцитов. Через 14 суток отмечали моноцитоз, базофилию и лимфоцитоз.

Таблица 1 – Лейкограмма крыс при острой интоксикации ивермектином, $M \pm m$, $n = 7$

Время исследования	Клетки крови, %						
	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы		Лимфоциты	Моноциты	
			Палочко-ядерные	Сегментоядерные			
До заправки	2,6±0,2	1,6±0,24	3,2±0,58	21,0±0,7	69,2±0,58	2,4±0,21	
После заправки	1 ч	3,2±0,6	1,4±0,5	5,6±0,64*	32,2±2,4*	47,6±2,7*	10,0±1,4*
	3 ч	6,4±1,3*	2,8±0,8	8,2±0,8*	47,2±3,7*	31,8±1,7*	7,6±0,91*
	6 ч	5,6±0,7*	1,6±0,2	4,8±0,4	32,0±0,5*	48,6±1,2*	7,4±1,1*
	1 сут	2,6±0,2	0,6±0,02*	4,8±0,33	36,0±0,8*	47,6±0,6*	8,0±0,31*
	3 сут	1,8±0,3	2,6±0,4	4,8±0,25	36,0±0,01*	45,8±1,2*	8,0±0,5*
	7 сут	1,4±0,2	1,0±0,03	5,6±0,24*	36,4±0,51*	51,2±0,5*	4,4±0,24*
	14 сут	3,2±0,3	1,0±0,02	6,4±0,4*	21,6±1,02	61,2±0,7*	6,6±0,4*

Примечание: * - $P < 0,05$ – различие достоверно по сравнению с контролем.

Активность миелопероксидазы у крыс достигала максимального значения через 24 часа – $1,64 \pm 0,03$ Ед ($P < 0,001$). Значительное повышение ЛИИ ($1,4 \pm 0,06$ Ед против фонового показателя $0,33 \pm 0,02$ Ед, $P < 0,001$) отмечали на 3-и сутки. Повышение ГПСм до $1,03 \pm 0,04$ Ед ($P < 0,001$) и ЛИИ до $0,41 \pm 0,04$ Ед ($P < 0,001$) через 14 суток подтверждает длительное состояние интоксикации.

Биохимические исследования плазмы крови крыс через 14 суток после заправки свидетельствуют о нарушении функции почек и печени. Так, концентрация креатинина при интоксикации ивермектином в дозах 50 и 100 мг/кг повышалась до $52,6 \pm 0,7$ мкмоль/л ($P < 0,001$) и $102,2 \pm 0,7$ мкмоль/л ($P < 0,01$) против $39,1 \pm 0,2$ мкмоль/л в контроле, уровень общего билирубина увеличивался до $2,2 \pm 0,03$ мкмоль/л ($P < 0,001$) и $0,95 \pm 0,07$ мкмоль/л ($P < 0,001$) по сравнению с $0,28 \pm 0,02$ мкмоль/л в контроле; повышение содержания общего белка до $73,24 \pm 1,12$ г/л и $75,7 \pm 0,6$ г/л ($P < 0,001$ по сравнению с контрольными животными) происходило за счет фракции глобулинов и альбуминов. Активность внутриклеточных ферментов в плазме крови при интоксикации ивермектином в дозе 50 мг/кг увеличивалась: АСТ до $196,1 \pm 6,7$ МЕ ($P < 0,001$) и АЛТ до $273,6 \pm 1,6$ МЕ ($P < 0,001$); при интоксикации в дозе 100 мг/кг активность АСТ и АЛТ возрастала до $369,0 \pm 3,5$ Е/л и до $289,9 \pm 3,6$ Е/л ($P < 0,001$).

При патоморфологическом исследовании крыс, интоксигированных ивермектином в дозах 50 и 64 мг/кг, по истечении 14 суток наблюдали кровенаполненность венных сосудов печени, увеличение размеров гепатоци-

тов и их ядер, зернистость цитоплазмы. В почках эпителий извитых канальцев набухший, цитоплазма зернистая, ядра увеличены, со сниженным содержанием нуклеиновых кислот. Селезенка увеличенная, дряблая, с обильным скоплением гранул гемосидерина. Сосуды мягкой мозговой оболочки кровенаполнены, в головном мозге перипеллюлярные и периваскулярные отеки.

Дозы ивермектина 200; 250 мг/кг вызывали смерть всех подопытных крыс на вторые-третьи сутки после введения препарата. При вскрытии трупов отмечали кровенаполненность центральных вен и межбалочных капилляров. Гепатоциты сдавлены, с признаками атрофии, в некоторых участках с зернистой и вакуолизированной цитоплазмой. Выражена картина кардио- и цитопикноза.

В почках крыс гиперемия, точечные кровоизлияния. Площадь поперечного сечения ядер эпителиоцитов уменьшена до $14,54 \pm 0,15 \text{ мкм}^2$ ($P < 0,001$) против $16,32 \pm 0,09 \text{ мкм}^2$ в контроле. Отмечаются некроз и некробиоз эпителий извитых канальцев, в их щеточной каемке и базальной мембране - повышенное содержание нейтральных ГАГ.

Желудок крыс растянут кормовыми массами, стенки истончены, на слизистой оболочке точечные и полосчатые кровоизлияния. При гистоисследовании отмечали десквамацию однослойного железистого эпителия, скопление кислых и сульфатированных ГАГ на поверхности слизистой оболочки и в фундальных железах желудка.

Острое отравление ивермектином вызывает развитие отека легких. Легкие крыс темно-красные, с синюшным оттенком и светлыми участками, тестоватой консистенции. Кровеносные сосуды переполнены кровью. Межальвеолярная ткань инфильтрирована эритроцитами, лимфоцитами, тучными клетками, видны разрывы альвеол. На слизистой оболочке бронхов большое количество сульфатированных ГАГ, клетки железистого эпителия увеличены, с разрушенной клеточной оболочкой.

При острой интоксикации у крыс отмечали гиперемиию мягкой мозговой оболочки, отек головного мозга. При гистологическом исследовании в головном мозге обнаружены перипеллюлярные и периваскулярные отеки, содержание нуклеиновых кислот в ядрах и цитоплазме нейроцитов снижено.

2.3. Гематологические, биохимические и патоморфологические изменения при хронической интоксикация крыс ивермектином

У животных первой (0,1 мг/кг), второй (1 мг/кг) и третьей (20 мг/кг) групп количество эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина снижалось относительно показателей контрольной группы (табл. 2).

Результаты биохимического исследования плазмы крови крыс представлены в таблице 3. При хронической интоксикации малыми дозами ивермектина в плазме крови крыс значительно повышались уровни креатинина, об-

щего билирубина, активность ферментов АСТ и АЛТ. Содержание общего белка снижалось за счет фракции глобулинов.

У крыс, получавших ивермектин в дозах 0,1 и 1 мг/кг, отмечали расширение желудка, толстого кишечника, увеличение пейеровых бляшек, застойную гиперемию миокарда. Печень у большинства животных увеличенная, дряблая, синусоидные капилляры расширены. Цитоплазма гепатоцитов глыбчатая, с включениями капель жира, ядра увеличены. Содержание нуклеиновых кислот, гликогена снижено.

Таблица 2 – Гематологические показатели при хронической интоксикации крыс ивермектином, $M \pm m$

Показатели, ед.измерения	Контроль, n = 5	Группы животных, доза, мг/кг:		
		0,1; n = 7	1; n = 7	20; n = 7
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	8,05 \pm 0,33	5,65 \pm 0,21 ⁴	6,38 \pm 0,13 ³	6,9 \pm 0,15 ²
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	11,98 \pm 1,48	4,69 \pm 0,06 ³	4,47 \pm 0,11 ³	6,88 \pm 0,12 ²
Гемоглобин, г/л	136,0 \pm 1,1	54,7 \pm 0,9 ⁴	68,0 \pm 0,9 ⁴	103,1 \pm 2,01 ⁴

Примечание: ¹ P < 0,05; ² P < 0,02; ³ P < 0,01; ⁴ P < 0,001- различия достоверны по сравнению с контролем

Таблица 3 – Биохимические показатели плазмы крови крыс при хронической интоксикации ивермектином, $M \pm m$

Показатели, ед.измерения	Контроль, n = 5	Группы животных, доза, мг/кг		
		0,1; n = 7	1; n = 7	20; n = 7
Креатинин, мкмоль/л	39,1 \pm 0,2	56,8 \pm 3,0 ⁴	67,0 \pm 4,0 ³	66,9 \pm 10,0 ¹
Билирубин общий, мкмоль/л	0,28 \pm 0,02	4,2 \pm 0,8 ³	6,9 \pm 1,3 ³	2,4 \pm 0,9 ⁴
АСТ, Е/л	135,0 \pm 1,0	236,0 \pm 10,0 ⁴	321,0 \pm 37,0 ³	362,0 \pm 57,0 ²
АЛТ, Е/л	76,5 \pm 3,2	127,0 \pm 7,0 ⁴	151,0 \pm 10,0 ⁴	142,0 \pm 33,0
Общий белок, г/л	61,7 \pm 0,4	54,2 \pm 2,4 ²	57,5 \pm 1,8	52,2 \pm 2,9 ²
Альбумины, г/л	34,4 \pm 0,4	31,6 \pm 1,4	32,6 \pm 0,3	30,8 \pm 3,7
Глобулины, г/л	27,3 \pm 0,8	22,6 \pm 1,3 ⁴	24,9 \pm 1,6 ⁴	21,4 \pm 1,5 ³

Примечание: P < 0,05; ² P < 0,02; ³ P < 0,01; ⁴ P < 0,001- различия достоверны по сравнению с контролем

Почки крыс при интоксикации ивермектином в дозах 0,1 и 1 мг/кг гиперемированы. Высота эпителия, площадь и объем ядер эпителия проксимальных извитых канальцев достоверно увеличились по сравнению с контрольными данными (табл. 4). Щеточная каемка проксимальных извитых канальцев, мезангий сосудистых клубочков интенсивно окрашены по Шабдашу. У некоторых животных в просвете капсулы почечных клубочков отмечается скопление кислых ГАГ.

В селезенке крыс наблюдали выраженную гиперемию. При интоксикации в дозе 0,1 мг/кг в красной пульпе отмечали обильное скопление сидерофагов с большим количеством гранул гемосидерина разной величины по сравнению с опытными (1 мг/кг; 20 мг/кг) и контрольной группами.

У самок опытной группы (0,1 мг/кг) наблюдали признаки гнойно-катарального эндометрита. На разрезе – эндометрий обоих рогов матки тусклый, рыхлый, с небольшим количеством гнойно-катарального экссудата. Слизистая оболочка матки утолщена, инфильтрирована сегментоядерными нейтрофилами, лимфоцитами, с участками десквамированного эпителия. В просвете матки большое количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов. В яичниках у самок в некоторых случаях обнаруживали кисты, заполненные прозрачным содержимым.

Таблица 4 – Морфометрические показатели почек крыс при хронической интоксикации ивермектином, $M \pm m$, $n = 100$

Показатели, ед.измерения	Контроль, $n = 5$	Группы животных, доза, мг/кг:		
		0,1; $n = 8$	1; $n = 8$	20; $n = 10$
Площадь ядер эпителиоцитов проксимального отдела нефрона, мкм^2	16,32±0,09	20,38±0,12 ³	22,46±0,1 ⁴	21,26±0,16 ⁴
Объем ядер эпителиоцитов проксимального отдела нефрона, мкм^3	48,58±0,37	64,96±0,57 ³	75,89±0,54 ⁴	72,9±0,86 ⁴
Высота эпителиоцитов проксимального отдела нефрона, мкм	8,412±0,057	10,11±0,08 ³	10,18±0,907	8,08±0,05

Примечание: ¹ $P < 0,05$; ² $P < 0,02$; ³ $P < 0,01$; ⁴ $P < 0,001$ - различия достоверны по сравнению с контролем

У животных третьей группы (20 мг/кг) печень увеличенная, с множественными мелкими очагами некроза и кровоизлияниями, сосуды кровенаполнены. Отдельные гепатоциты набухшие, с нечеткими контурами, зернистой цитоплазмой, крупными и мелкими каплями жира. Отмечено увеличение отношения ядра к клетке по площади и объему в центральной и средней зонах печеночной дольки. Гепатоциты с высоким содержанием гликогена располагались в печеночной долке мозаично.

У самцов отмечали уретральные пробки разной величины, у самок - слизистые сгустки в мочевом пузыре. На гистопрепаратах цитоплазма эпителия извитых канальцев зернистая, глыбчатая. Площадь и объем ядер нефроцитов проксимальных извитых канальцев достоверно увеличивались по сравнению с показателями контрольных животных.

У самок, интоксцированных ивермектином в дозе 20 мг/кг, обнаруживали скопление крови в полости беременной матки, мертвые плоды, нити фибрина на плаценте, эндометрит катаральный, гнойно-катаральный одного

или обоих рогов матки, кистозные изменения слизистой оболочки матки. Неоднократно отмечали кистозные изменения в яичниках.

2.4. Эмбриотоксические эффекты ивермектина при острой интоксикации беременных самок

Введение препарата в герминальный период беременности (табл. 5) способствовало повышению доимплантационной и постимплантационной гибели, увеличению общей эмбриональной смертности; снижению выживаемости потомства по сравнению с контролем.

Острой интоксикацией самок в эмбриональный период было обусловлено уменьшение количества живых плодов до $5,8 \pm 0,3$ ($P < 0,01$) против $7,6 \pm 0,6$ в контроле, увеличение количества мертвых плодов, повышение постимплантационной гибели и снижение выживаемости потомства (табл. 5).

Таблица 5 – Эмбриотоксические свойства ивермектина при однократном воздействии на самок крыс в дозе 50 мг/кг, $M \pm m$, $n = 5$

Показатели:	Контроль, $n = 5$	Время введения препарата опытным животным:	
		Первая группа, 3-5 сут. беременности	Вторая группа, 9-12 сут. беременности
Доимплантационная гибель, %	$13,6 \pm 5,36,09$	$34,2 \pm 2,4^2$	$13,1 \pm 3,4$
Постимплантационная гибель, %	0	$9,04 \pm 3,1$	$14,2 \pm 2,3$
Общая эмбриональная смертность, %	$13,6 \pm 5,36,09$	$39,2 \pm 2,8^4$	$27,5 \pm 6,12$
Выживаемость, %	$86,3 \pm 5,4$	$60,8 \pm 2,8^2$	$70,0 \pm 6,3$

Примечание: ¹ $P < 0,05$; ² $P < 0,02$; ³ $P < 0,01$; ⁴ $P < 0,001$ - различия достоверны по сравнению с контролем.

У плодов, интоксигированных ивермектином в эмбриональный период, отмечали кровоизлияния в области шеи, гипоплазию внутренних органов, точечные кровоизлияния на серозной оболочке мочевого пузыря.

Выявлено негативное влияние ивермектина на рост и развитие осевого скелета плодов. Установлено нарушение окостенения костей черепа, у некоторых плодов отмечено отложение солей кальция в хрусталик. При интоксикации самок в герминальный период отмечали задержку формирования хвостовых, крестцовых позвонков, фаланг и плюсневых костей у плодов. Участки теменной и височных костей черепа были слабо окрашены.

Введение ивермектина самкам на 3 – 5 дни беременности способствовало снижению массы плодов и плаценты, уменьшению кранио-каудальных размеров плодов и плацентно-плодного коэффициента по сравнению с аналогичными показателями контрольных самок (табл. 6).

Таблица 6 – Развитие плацент и плодов у крыс на 20-е сутки беременности при введении самкам ивермектина в дозе 50 мг/кг, $M \pm m$, $n = 5$

Показатели:	Контроль,	Время введения препарата опытным животным:	
		Первая группа, 3 - 5 сут. беременности	Вторая группа, 9 - 12 сут. беременности
Масса плодов, г	4,01±0,02	3,84±0,07 ³	4,52±0,08 ⁴
Кранио-каудальный размер плодов, мм	4,10±0,05	3,90±0,05	4,09±0,1
Масса плаценты, г	0,75±0,01	0,60±0,01 ⁴	0,63±0,02 ⁴
Плацентно-плодный коэффициент	0,19±0,02	0,15±0,04	0,135±0,005 ²

Примечание: ¹ $P < 0,05$; ² $P < 0,02$; ³ $P < 0,01$; ⁴ $P < 0,001$ - различия достоверны по сравнению с контролем.

Интоксикация самок в эмбриональный период беременности, напротив, вызывала увеличение массы плодов, снижение массы плаценты и плацентно-плодного коэффициента.

2.5. Развитие потомства крыс, подвергнутых острой интоксикации в период беременности

При интоксикации беременных самок крыс ивермектином в дозе 50 мг/кг мертворождаемость достигала 27,3±0,3%. У самок, интоксцированных в дозе 100 мг/кг, отмечали низкую жизнеспособность потомства в постнатальный период.

При интоксикации рождалось потомство со сниженной массой тела, в дальнейшем отмечали нарушение роста осевого скелета. Отлипание ушных раковин, открытие глаз, прорезывание зубов, появление волосяного покрова происходило на 2 – 3 суток позднее, чем у контрольных крысят.

При патоморфологическом исследовании в печени крысят первой и второй групп в возрасте 1 месяца выявляли глыбчатость цитоплазмы гепатоцитов, наличие крупных капель нейтрального жира. В корковом веществе почек наблюдали полиморфноклеточные инфильтраты. Кардиомиоциты набухшие, со сниженным содержанием нуклеиновых кислот в ядрах. В головном мозге крысят обнаружены периваскулярные и перицеллюлярные отеки.

2.6. Развитие потомства крыс, подвергнутых хронической интоксикации в период беременности

При ежедневной затравке ивермектином в дозе 20 мг/кг в течение 21 суток у самок наблюдали гибель всех крысят на вторые - третьи сутки после

рождения. При введении самкам ивермектина в дозах 0,1 и 1 мг/кг крысы обладали признаками макросомии: масса тела и интенсивность роста осевого скелета превышали показатели контрольных крысят.

При патоморфологическом исследовании 30-суточных крысят от самок, интоксцированных препаратом в дозах 0,1 и 1 мг/кг, отмечали развитую подкожную жировую клетчатку, большое количество внутреннего жира. При гистоисследовании установлено, что гепатоциты увеличены, с зернистой цитоплазмой, включением капель нейтрального жира, неравномерным распределением гликогена. В почках сосудистые клубочки кровенаполнены, в соединительной ткани - полиморфноклеточные инфильтраты, в щеточной камерке извитых канальцев - высокое содержание нейтральных ГАГ. При интоксикации самок в дозе 1 мг/кг в почках крысят отмечали фокальный некроз эпителия извитых канальцев, лизис ядер и зернистую дистрофию нефроцитов. В миокарде крысят при интоксикации самок ивермектином в дозе 1 мг/кг наблюдали микроразрывы мышечных волокон, полиморфноклеточные инфильтраты. Головной мозг крысят отечен, гиперемирован, при микроскопии срезов видны перицеллюлярные и периваскулярные отеки.

2.7. Изменение гематологических и биохимических показателей у крупного рогатого скота при обработке ивермектином

Через 14 суток после однократной и повторной противопаразитарных обработок ивермектином у животных отмечали выраженную эритропению, лейкопению, снижение уровня гемоглобина (табл. 7), увеличение процентного содержания нейтрофилов в лейкограмме.

Таблица 7 – Гематологические показатели при подкожном введении коровам ивермектина в дозе 0,2 мг/кг, $M \pm m$

Время после обработок, сутки	Группы животных:	Показатели:			
		Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Лейкоциты, $\times 10^9/л$	Гемоглобин, г/л	
Однократная обработка	1	Контроль, n = 4	7,48±0,31	9,25±0,47	63,6±0,24
		Первая, n = 4	6,43±0,22	6,64±0,09 ³	67,3±0,4 ³
		Вторая, n = 5	5,86±0,15 ¹	6,74±0,25 ³	61,8±1,2
	14	Контроль, n = 4	7,35±0,27	10,26±0,51	65,0±0,8
		Первая, n = 4	7,15±0,13	9,33±0,59	65,5±0,6
		Вторая, n = 5	7,23±0,04	6,75±0,89 ²	67,4±0,2 ²
Повторная обработка	14	Контроль, n = 4	7,55±0,12	10,1±0,8	68,7±0,15
		Вторая, n = 5	6,95±0,18 ³	8,47±0,62	67,9±0,5

Примечание: ¹ P < 0,05; ² P < 0,02; ³ P < 0,01; ⁴ P < 0,001- различия достоверны по сравнению с контролем.

Результаты биохимического исследования плазмы крови коров представлены в таблице 8.

Наиболее информативными изменениями при обработках коров ивермектином являются повышение содержания глобулинов, активности АСТ, уровня креатинина, снижение содержания общего, прямого и непрямого билирубина в плазме крови.

Таблица 8 – Биохимические показатели плазмы крови коров при обработке ивермектином в дозе 0,2 мг/кг, М±m

Показатели, ед изм.	Время после однократной обработки, сут.						Время после повторной обработки, сут.	
	1			14			14	
	Конт- роль, n = 4	Первая группа, n = 4	Вторая группа, n = 5	Конт- роль, n = 4	Первая группа, n = 4	Вторая группа, n = 5	Конт- роль, n = 4	Вторая группа, n = 5
Альбумины, г/л	33,8 ±1,03	30,47 ±0,54 ¹	31,04 ±0,55	32,15 ±1,21	29,22 0,37 ¹	31,52 ±0,57	32,91 ±3,23	31,6 0,38
Глобулины, г/л	44,52 1,27	49,9 ±1,8 ¹	54,82 ±1,71 ³	48,2 ±3,3	52,17 ±3,86	51,41 ±2,04	45,12 ±0,24	47,4 0,5 ⁴
АЛТ, Е/л	38,88 ±1,38	33,9 ±7,7 ³	33,8 ±1,8 ³	31,42 ±2,86	35,63 ±3,28	38,7 ±1,68 ¹	36,68 ±1,41	38,7 ±1,57
АСТ, Е/л	40,8 ±0,6	104,2 ±0,75 ⁴	108,9 ±0,82 ⁴	41,07 ±2,19	102,45 ±0,73 ⁴	105,06 ±0,51 ³	40,5 ±3,5	106,1 ±5,1 ⁴
Креатинин, мкмоль/л	115,7 ±0,2	124,97 ±0,98 ⁴	124,74 ±0,53 ⁴	118,25 ±2,76	122,7 ±2,3	107,0 0,59	105,7 ±4,3	106,8 ±4,3
Общий били- рубин, мкмоль/л	8,08 ±0,29	7,62 ±0,04	8,24 ±0,34	7,95 ±0,95	7,03 ±0,20	6,84 ±0,67	7,91 ±0,26	6,87 ±0,04 ⁴
Прямой били- рубин, мкмоль/л	1,86 ±0,49	2,0 ±0,2	3,12 ±0,06 ⁴	1,63 ±0,39	1,7 ±0,38	1,32 ±0,11	1,81 ±0,31	1,03 ±0,03 ⁴
Непрямой би- лирубин, мкмоль/л	6,22 ±0,38	5,63 ±0,01	5,12 ±0,42	6,32 0,35	5,32 ±0,91	5,52 ±0,60	6,10 ±0,15	5,84 ±0,01 ⁴

Примечание: ¹ P < 0,05; ² P < 0,02; ³ P < 0,01; ⁴ P < 0,001- различия достоверны по сравнению с контролем.

После первой обработки животных ГПСм в 1-е сутки снижался до 0,45±0,09 Ед. против фона 0,59±0,05 Ед.; через 14 суток повышался до 0,86±0,02 Ед. После повторной обработки коров ГПСм повышался на 14-е сутки до 0,78±0,05 Ед. ЛИИ достигал максимального значения в 1-е и 14-е сутки после однократной обработки (0,73±0,06 Ед. и 0,56±0,1 Ед. соответственно против фонового показателя 0,3±0,03 Ед.). После повторного применения ивермектина уровень ЛИИ соответствовал 0,52±0,04 Ед.

2.8. Патоморфологические изменения в органах и тканях крупного рогатого скота при воздействии ивермектина

При гистоисследовании в печени коров после однократной обработки отмечены полиморфноклеточные инфильтраты, снижение содержания гликогена в перипортальной зоне печеночной дольки. После двукратной обработки

выявлены очаговая зернистая дистрофия гепатоцитов, снижение содержания нуклеиновых кислот и гликогена. Установлено увеличение площади гепатоцитов центральной зоны дольки до $147,3 \pm 2,1$ мкм² ($P < 0,01$), уменьшение размеров ядер гепатоцитов.

В почках опытных животных между извитыми канальцами - скопления лимфоидных клеток, очаговая зернистая дистрофия эпителия проксимальных извитых канальцев. В миокарде коров обеих групп отмечено переполнение капилляров кровью, скопление лимфоидных клеток, набухание и отек мышечных волокон, потеря исчерченности.

При окрашивании по Перлсу в селезенке коров опытных групп выявляли большое количество гранул гемосидерина.

3. ВЫВОДЫ

1. Ивермектин является высокотоксичным соединением. ЛД₅₀ для беспородных лабораторных крыс составляет $98,1 \pm 14,4$ мг/кг. Острое отравление сопровождается признаками угнетения центральной нервной системы и гемопоеза, поражением почек и печени, застойной гиперемией легких и головного мозга.

2. При хронической интоксикации крыс ивермектином прогрессируют дистрофические и некробиотические изменения в паренхиматозных органах на фоне сосудистых расстройств. У самок развиваются патологические изменения репродуктивных органов: фибринозный плацентит, катаральный и катарально-гнойный эндометрит, кисты яичников и эндометрия.

3. Информативными изменениями биохимических показателей при интоксикации крыс ивермектином являются повышение уровня креатинина (при острой - до $102,2 \pm 0,7$ мкмоль/л, при хронической - до $66,9 \pm 10,0$ мкмоль/л против $39,1 \pm 0,2$ мкмоль/л, $P \leq 0,01$), общего билирубина (при острой - до $2,22 \pm 0,03$ мкмоль/л, при хронической - до $6,9 \pm 1,3$ мкмоль/л против $0,28 \pm 0,02$ мкмоль/л в контроле, $P \leq 0,001$), активности АСТ и АЛТ. Уровень общего белка изменяется разнонаправленно: при острой интоксикации увеличивается до $75,7 \pm 0,6$ г/л против $61,7 \pm 0,6$ г/л в контроле, $P \leq 0,001$), при хронической - снижается до $52,2 \pm 2,9$ г/л.

4. При введении ивермектина беременным самкам крыс в период имплантации возрастают показатели доимплантационной гибели ($34,16 \pm 2,4\%$ против контроля $14,2 \pm 5,3\%$, $P < 0,02$) и эмбриональной смертности ($39,2 \pm 2,8\%$ относительно контроля $14,2 \pm 5,3$, $P < 0,001$), отмечается низкая выживаемость потомства ($60,82 \pm 2,81\%$ против $86,3 \pm 5,4\%$ в контроле, $P < 0,02$). Интоксикация самок в период плацентации и органогенеза повышает постимплантационную гибель, общую эмбриональную смертность, снижает плацентно-плодный коэффициент ($0,135 \pm 0,005$ против $0,19 \pm 0,02$ в контроле; $P < 0,02$) и выживаемость потомства.

5. Тератогенное действие препарата при введении беременным крысам в течение 9-12 дней в дозе 50 мг/кг проявляется нарушением оссификации кос-

тей черепа у плодов, задержкой формирования хвостовых позвонков, фаланг и плюсневых костей, кальцификацией хрусталика. Кроме того, хроническая интоксикация самок крыс способствует макросомии и ожирению потомства. У крысят развиваются отек вещества головного мозга, белково-жировая дистрофия печени, белковая дистрофия миокарда и лимфоидные инфильтраты в паренхиматозных органах.

6. Обработка крупного рогатого скота ивермектином в рекомендованных дозах (0,2 мг/кг) вызывает развитие гематотоксических эффектов с повышением лейкоцитарного индекса интоксикации ($0,52 \pm 0,04$ Ед против фонового показателя $0,3 \pm 0,03$ Ед, $P < 0,05$), снижение функциональной активности почек и печени с достоверным повышением уровня креатинина и активности АСТ в плазме крови, а также угнетение миелопероксидазы ($0,33 \pm 0,09$ Ед против фонового показателя $0,58 \pm 0,05$ Ед, $P < 0,05$). Патоморфологические изменения в органах и тканях характеризуются гемосидерозом селезенки, белковой дистрофией и лимфоидными инфильтратами в паренхиматозных органах.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Токсичность и высокая степень риска побочных эффектов ивермектина требуют строгого соблюдения дозового режима и схем его применения с периодическим контролем показателей крови.

2. В дифференциальной диагностике отравлений животных ивермектином необходимо учитывать патологию органов репродуктивной системы у самок на фоне сосудистых расстройств, спленомегалии и дистрофических изменений в паренхиматозных органах.

3. Установленные эмбриотоксические и тератогенные эффекты ивермектина исключают возможность его использования для обработки беременных животных.

4. По результатам исследований издано учебно-методическое пособие «Биопестициды как лекарственные средства и потенциальные токсиканты» (Омск, 2009).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Семеряк Е. В. Влияние ивертина на организм крыс / Е. В. Семеряк // Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных : материалы IX науч.-практ. конф., посвященной 75-летию УГАВМ. – Троицк, 2005. – С. 140 – 141.

2. Семеряк Е. В. Жизнеспособность потомства крыс при использовании ивертина / Е. В. Семеряк // Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: материалы V межрег. науч.-практ. конф. – Омск, 2006. – С. 316 – 317.

3. Семеряк Е. В. Гематотропные эффекты ивертина в условиях эксперимента / Е. В. Семеряк // Новые фармакологические средства в ветеринарии:

материалы XVIII Междунар. науч.-практ. конф. – Санкт-Петербург, 2006. – С. 145-147.

4. Семеряк Е. В. The potential Danger hematotoxic and embriotoxic Effects of Ivertin / Е. В. Семеряк // “Fundamental Pharmacology and Parmacy – Clinical practice”: 2-ая российско-китайская конф. по фармакологии 25-27 сентября 2006г. – Пермь, 2006. - С. 145-146.

5. Семеряк Е. В. Параметры острой токсичности ивертина для крыс / Е. В. Семеряк // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: материалы VII Сибирской ветеринарной конф. 15-16 февраля 2007г. – Новосибирск, 2007. – С. 42 – 43

6. Герунова Л. К. Изменение метаболизма у крыс при хронической интоксикации ивертином / Л. К. Герунова, В. Д. Конвай, Е. В. Семеряк // Биологические аспекты фундаментальной и прикладной медицины и ветеринарии: материалы VI Межрег. науч.-практ. конф., посвященной 85-летию СибНИВИ-ВНИИБТЖ, 2007г. – Омск, 2007. – С. 19 – 22.

7. Герунов В. И. Патоморфологические изменения в печени крыс при хронической интоксикации ивертином в эксперименте / В. И. Герунов, Л. К. Герунова, Е. В. Семеряк. А. Ю. Козина // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: материалы VIII Сибирской ветеринарной конф. 14-15 февраля, 2008. – Новосибирск, 2008. – С. 184 - 185.

8. Семеряк Е. В. Патоморфологическая характеристика внутренних органов крыс при острой и хронической интоксикации ивертином / Е. В. Семеряк, Ю. М. Гичев // Ветеринарная патология. – 2009. - № 1(28). – С. 90 – 94.

9. Герунова Л. К. Биологическое моделирование как метод доклинического испытания лекарственных средств /Л. К. Герунова, Ю. В. Редькин, Е. В. Семеряк // Международный вестник ветеринарии. - 2009. - № 2. – С. 17- 20.

10 Учебно-методическое пособие : Биопестициды как лекарственные средства и потенциальные токсиканты / Л. К. Герунова, В. И. Герунов, Е. В. Семеряк, Ю. В. Редькин. – Омск : Диалог, 2009. – 36 с.

На правах рукописи

СЕМЕРЯК ЕЛЕНА ВАСИЛЬЕВНА

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ТОКСИЧНОСТИ И
ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ИВЕРМЕКТИНА НА
ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ**

16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Омск – 2009

Сдано в набор 09
Подписано в печать 09
Формат 60x84/16. Гарнитура Times New Roman.
Усл.печ.л. 1,00. Бумага офсетная.
Способ печати – оперативный
Тираж 100

Отпечатано с оригинал-макета
В типографии