

**МИНГАЛЕЕВ ДАНИЛ НАИЛЬЕВИЧ**

**НОВЫЕ СРЕДСТВА И МЕТОДЫ ПРОФИЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА  
МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора ветеринарных наук

Казань - 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, профессор  
**Равилов Рустам Хаметович**

Официальные оппоненты: **Смолянинов Юрий Иванович**  
доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока ФГБУН СФНЦА РАН

**Протодьяконова Галина Петровна**  
доктор ветеринарных наук, доцент, декан факультета ветеринарной медицины, заведующий кафедрой паразитологии и эпизоотологии животных ФГБОУ ВО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия»

**Букова Наталия Константиновна**  
доктор биологических наук, профессор, ученый секретарь ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

Ведущая организация: **ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»**

Защита диссертации состоится «20» декабря 2018 года в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <http://www.казветакадемия.рф>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г. и размещен на сайтах: <http://www.vak.ed.dov.ru> и <http://www.казветакадемия.рф>

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Юсупова Галия Расыховна

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Увеличение производства продукции скотоводства и повышение ее качества является первоочередной задачей современного животноводства, решить которую можно не только путем совершенствования систем кормления и содержания скота, внедрения новых форм организации производства, повышения генетического потенциала животных, но и созданием стойкого благополучия хозяйств по инфекционным болезням. Несмотря на успехи, достигнутые в борьбе с туберкулезом сельскохозяйственных животных, эта инфекция остается одной из ведущих, наиболее сложных и экономически значимых в инфекционной патологии, причиняя огромный ущерб народному хозяйству и представляя серьезную опасность населению.

Правительством Российской Федерации принято Постановление от 1 декабря 2004 г. № 715 «Об утверждении перечня социально-значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих», где туберкулез занимает первое место в числе социально-значимых заболеваний и тринадцатую позицию в перечне заболеваний, представляющих опасность для окружающих

Разработка, постоянное совершенствование и внедрение в нашей стране системы ветеринарных противотуберкулезных мероприятий позволили локализовать и ликвидировать эту болезнь во многих регионах, а где-то значительно улучшить эпизоотическую обстановку. Однако способность микобактерий туберкулеза длительное время сохраняться в объектах внешней среды, высокая устойчивость их к воздействиям различных неблагоприятных факторов, а также восприимчивость к возбудителю практически всех позвоночных животных, птиц и человека делают эту инфекцию трудноискоренимой. Кроме того, сложность борьбы с этим заболеванием состоит в отсутствии специфических лечебных и надежных профилактических средств защиты молодняка, неполноценности проводимых ветеринарно-санитарных мероприятий и недостаточной эффективности существующих мер борьбы (Овдиенко Н.П., 2004, 2009; Смолянинов Ю.И., 2008; Нуралинов Р.А., 2014).

В распространении туберкулёза значительную роль играют молоко и молозиво от больных коров, особенно при отсутствии у них клинических признаков болезни. Молодняк крупного рогатого скота, инфицированный микобактериями туберкулёза в молочном периоде, реагирует на введение туберкулина в основном только по достижении случного возраста, поэтому профилактика туберкулёза у телят является основой эффективного и активного предупреждения туберкулёза (Кузин А.И., 1982; Донченко А.С., 1983, 2004; Колосов А.А., 2001; Хамзин Р.А., 2006).

В связи с этим, в последние годы появилась острая необходимость разработки новых, более эффективных и надежных комплексных систем борьбы с туберкулезом, в том числе с использованием средств химиопрофилактики, так как добиться положительных результатов иным путем в условиях промышленного ведения отрасли, при высокой концентрации скота на крупных фермах и комплексах, практически невозможно (Хайкин Б.Я., 1990; Мироненко Е.Е., 1990; Смолянинов Ю.И., Кошечев Н.Н., 2001; Донченко Н.А., 2005, 2008).

**Степень разработанности темы.** Эффективное применение противотуберкулезных препаратов в медицине дало основание для испытания

таковых и в ветеринарной практике. В этом направлении проведены работы учёными Украины (Андрющенко В.В., 1969; Ротов В.И., 1974, 1982; Чепуров К.П. и др., 1977), Казахстана (Омарбеков Е.О., 1972; Федосеев В.С. и др., 1976; Новак Д.Д., 1980; В.И. Пионтковский и др., 1980), Таджикистана (Михайлова К.И. и др., 1977), Белоруссии (Кузнецов В.А., 1966; Балашенко С.Г., 1978; Тузова Р.В., 1978), Узбекистана (Ли Л.Б., 1980; Исаков М.Т., 1985), Молдавии (Жабоедов А.Н. и др., 1978; Кузьева В.А. и др., 1982), Российской Федерации (Василенко К.Ф., 1964, 1983; Кравец А.Т., Зубаткин В.А., 1983; Хайкин Б.Я., 1980, 1990; Щёткин А.А., 1983; Донченко Н.А., 2008). На основании полученных данных все вышеуказанные авторы отмечали высокую профилактическую эффективность производных изоникотиновой кислоты в борьбе с туберкулёзом животных.

За всю историю борьбы с туберкулезом разработано большое количество антимикобактериальных препаратов, причем самому «молодому» из них – рифампицину, на сегодняшний день уже более 50 лет (Перельман М.И., 2007; Мишин В.Ю., 2007; Zhang Y., Yewt W., 2011).

Более чем полувековое использование основных противотуберкулезных препаратов, антропогенная селекция генетических перестроек микобактерий вследствие беспорядочного назначения врачами субоптимальных режимов лечения и неудовлетворительная приверженность к лечению со стороны пациентов, главным образом, привело к развитию клинической формы лекарственно-устойчивого туберкулеза. Современные доминирующие сценарии развития такой формы болезни вызывают особую тревогу и представляют ощутимую угрозу борьбе с туберкулезом в глобальном масштабе. Лекарственно-устойчивые микобактерии являются серьезным вызовом эффективной противотуберкулезной работе, эта форма болезни не поддаётся лечению стандартным набором препаратов и грозит развитием пандемии устойчивых форм возбудителя (Мишин, В.Ю., 2003, 2009; Zignol M., Nosseni M.S. et al., 2006; Zhang Y., Yewt W., 2011).

Кроме того, в последние годы участились сообщения о том, что противотуберкулезные препараты, используемые для профилактики и лечения туберкулёза, не свободны от побочного действия и, как фармакологические средства, обладают определённой биологической активностью, способной вызывать изменение показателей обмена веществ и структурно-функционального состояния органов и систем, а при передозировке сопровождаться отравлением и даже летальным исходом (Бальцева Л.Б. и др., 1990; Ерохин В.В. и др., 1991; Саджая Л.А., 1999; Борисова М.И. и др., 2003; Лысов А.В., 2006; Гриценко Н.С., 2009; Мордык А.В., 2010; Мишина А.В., 2012; Баласанянц Г.С., 2014).

В этих условиях становится очевидной необходимость поиска и создания новых лекарственных препаратов, способных предотвратить развитие множественной лекарственной устойчивости у микобактерий туберкулеза, снизить частоту побочных действий и тем самым повысить эффективность химиопрофилактики и этиотропной терапии (Хайкин Б.Я., Литовченко А.Н. и др., 1990; Ушакова В.А., 2007; Израилова Г.Г., 2011; Степанян И.Э., 2013; Бочарова И.В., 2014; Меньшикова Л.А., 2016).

В связи с вышеизложенным, в Институте органической и физической химии имени А.Е. Арбузова - обособленном структурном подразделении ФИЦ КазНЦ РАН

синтезированы соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты с гидразидом изоникотиновой кислоты (Тубофен) и ещё 3 группы новых химических соединений: изоцианураты, триазины и  $\alpha, \omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканы. Нами изучены противотуберкулезная активность этих средств, минимальные ингибирующие концентрации, выбраны среди них наиболее эффективные в отношении микобактерий туберкулеза химические соединения, определены их фармако-токсикологические свойства, обоснованы профилактические дозы при туберкулёзе животных, а так же разработаны на этой основе методы химиопрофилактики заболевания у молодняка крупного рогатого скота.

**Цель и задачи исследований.** Целью работы явилось изыскание новых средств и методов профилактики туберкулеза молодняка крупного рогатого скота в неблагополучных по данному заболеванию хозяйствах.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Провести анализ эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота в Республике Татарстан.
2. Определить минимальную ингибирующую концентрацию синтезированных препаратов в отношении микобактерий туберкулеза.
3. Определить лекарственную устойчивость микобактерий туберкулеза к синтезированным препаратам.
4. Изучить противомикробную и фунгистатическую активность «соединений – лидеров».
5. Дать фармако-токсикологическую оценку изучаемым соединениям.
6. Определить дозы и изучить профилактическую эффективность исследуемых препаратов на экспериментальной модели туберкулеза.
7. Изучить в производственных условиях профилактическую эффективность исследуемых препаратов на телятах при туберкулезе крупного рогатого скота.
8. Разработать научно-обоснованную систему профилактических противоэпизоотических мероприятий при туберкулезе крупного рогатого скота с использованием предложенных препаратов.

**Научная новизна.** Впервые проведен ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота в Республике Татарстан в период с 1960 по 2016 годы. Впервые установлены однонаправленная тенденция изменения эпизоотического процесса при туберкулезе крупного рогатого скота, коэффициент заболеваемости и цикличность возникновения новых очагов туберкулезной инфекции, составлена картограмма и определен нозоареал болезни в республике.

Определены туберкулостатические свойства и минимальные ингибирующие концентрации для ряда новых препаратов: соли бис(оксиметил)фосфиновой кислоты с гидразидом изоникотиновой кислоты (Тубофен), 45-ти соединений относящихся к изоциануратам, 3-х - относящихся к триазинам, 34-х – относящихся к  $\alpha, \omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканам.

На основании проведенных исследований из каждой группы новых соединений выделены «соединения – лидеры», определены их острая и

субхроническая токсичность, алергизирующие, кумулятивные, эмбриотоксические и тератогенные свойства. Выяснено влияние новых препаратов на лекарственную чувствительность различных штаммов микобактерий туберкулеза, изучена их противомикробная и фунгистатическая активность.

Впервые изучена специфическая химиопрофилактическая и химиотерапевтическая активность Тубофена, Линарола и Линарола Ф-1 на экспериментальной модели туберкулеза у белых мышей и морских свинок, установлены дозы и схема их применения. В производственных условиях доказана их химиопрофилактическая активность в отношении микобактерий туберкулеза у молодняка крупного рогатого скота молочного периода онтогенеза. Установлено, что новые препараты, наряду с низкой токсичностью, способствуют повышению устойчивости животных к микобактериям туберкулёза и предупреждают развитие туберкулёзного процесса у инфицированных животных.

Приоритет и научная новизна исследований подтверждена патентами на изобретения:

1. № 2281939 «Соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты с гидразидом изоникотиновой кислоты (Тубофен), обладающая противотуберкулезным действием и способ ее получения», зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 20.08.2006 г.;

2. № 2424235 «Изоцианураты, обладающие противотуберкулезной активностью», зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 20.07.2011 г.;

3. № 2431633 «Триазины, обладающие противотуберкулезной активностью», зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 20.10.2011 г.;

4. № 2591256 « $\alpha$ ,  $\omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканы, обладающие противотуберкулезной активностью и  $\alpha$ ,  $\omega$  – бис(метоксикарбонилметилсульфинил или сульфонил)алканы для их получения» зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 29.06.2015 г.

Проект «Соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты с гидразидом изоникотиновой кислоты (Тубофен), обладающая противотуберкулезным действием и способ ее получения» награжден дипломом «50 лучших инновационных идей для Республики Татарстан» и дипломом в номинации «100 лучших изобретений России». Проект «Изоцианураты, обладающие противотуберкулезной активностью» награжден дипломом республиканского конкурса «Лучшее изобретение 2011 года».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработаны и внедрены в ветеринарную практику новые противотуберкулезные препараты: Тубофен, Линарол и Линарол Ф-1 для профилактики туберкулёза у телят молочного периода в неблагополучных по данному заболеванию хозяйствах (акты производственных испытаний от 24.09.2004 г.; 18.09.2008 г.; 10.12.2010 г.; 28.12.2011 г.; 18.08.2016 г.). Установлено, что вышеперечисленные препараты обладают выраженными антимикобактериальными свойствами и их применение в течение 2-х месяцев в неблагополучных по туберкулёзу хозяйствах обеспечивает высокий профилактический эффект.

По результатам исследования подготовлены:

- Инструкция по применению нового противотуберкулезного средства «Линарол» в ветеринарии (в порядке производственных испытаний), утвержденное Главным управлением ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан от 18 июня 2010 года;

- Временные ветеринарные правила по применению нового противотуберкулезного средства «Линарол Ф-1» в ветеринарии (в порядке производственных испытаний), утвержденное Главным управлением ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан от 8 декабря 2015 года.

Основные положения диссертации используются в учебном процессе ряда профильных ВУЗов: на кафедре эпизоотологии и паразитологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»; кафедре эпизоотологии имени В.П. Урбана, кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии, кафедре фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»; кафедре ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»; кафедре болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»; кафедре инфекционной и незаразной патологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет»; кафедре инфекционных болезней ФГБОУ ВО Южно - Уральский государственный аграрный университет; кафедре ресурсосберегающих технологий производства продукции сельского хозяйства и лесного комплекса ФГБОУ ДПО «Татарский институт переподготовки кадров агробизнеса».

**Методология и методы исследования.** Для достижения основной цели диссертационной работы и обоснования применения полученных результатов использованы адекватные методологические приемы и доступные методы исследования. Методологические подходы основаны на актуальности, целях и задачах исследований, анализа данных отечественных и зарубежных публикаций по теме диссертации и результатов собственных исследований.

В работе использованы эпизоотологические, клинические, патоморфологические, микробиологические, гематологические, биохимические, фармакологические и токсикологические методы исследований. В проведении экспериментальных работ использовали белых мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов и телят черно-пестрой породы.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в Республике Татарстан характеризуется эндемичностью, линия многолетнего тренда, имеет тенденцию к нарастанию;

- исследованные химические соединения обладают выраженными бактериостатическими свойствами в отношении микобактерий туберкулеза, а некоторые из них достигают уровня минимальной ингибирующей концентрации (МИК) туберкулостатика первого ряда – изониазида;

- новые туберкулостатики Линарол, Аликон и Линарол Ф-1 обладают выраженным бактериостатическим действием на референтные и лекарственно - устойчивый штаммы микобактерий;

- препараты Тубофен, Аликон, Линарол и Линарол-Ф1 обладают избирательным антибактериальным действием, только в отношении микобактерий туберкулеза;

- изучаемые «соединения-лидеры» не обладают острой и субхронической токсичностью, местно-раздражающими, эмбриотоксическими и тератогенными свойствами. Согласно ГОСТу 12.1.007.76 относятся к IV классу опасности - незначительно опасные химические вещества;

- при воспроизведении экспериментальной модели туберкулеза на лабораторных животных Тубофен, Линарол и Линарол Ф-1 проявляют высокий профилактический эффект;

- пероральное назначение Тубофена, Линарола и Линарола Ф-1 молодняку крупного рогатого скота в течение молочного периода обеспечивает надежную защиту животных от заражения микобактериями туберкулеза и позволяет провести гарантированное выращивание на фермах неблагополучных хозяйств здоровых телят, в том числе полученных от коров больных туберкулезом.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов исследования, основных положений и научных выводов диссертации подтверждена большим объемом проведенных экспериментов на лабораторных и сельскохозяйственных животных, а также широким спектром методических приемов. Объективность научных положений и выводов подтверждается применением биометрической обработки экспериментальных данных. Тема диссертации, направления исследований и их результаты рассмотрены, обсуждены и одобрены на заседаниях методического, научно-технического и Ученого совета ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ (2003 – 2017 гг.). Материалы диссертации доложены и получили положительную оценку на ежегодных итоговых научно-производственных конференциях ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ (Казань, 2003 – 2017 гг.); конференции молодых ученых и специалистов Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (Казань, 2004); Международной научно-практической конференции, посвященной 75- и 85-летию образования зооинженерного факультета (Казань, 2005, 2015); на научной сессии Академии наук РТ (Казань, 2005); Всероссийской конференции «Инновации молодых ученых сельскому хозяйству» (Москва, 2006); Московском международном ветеринарном конгрессе «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Москва, 2010); Antimicrobial Drug Discovery Conference (Spain, Madrid, 2013); Всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 85-летию Ивановской государственной сельскохозяйственной академии имени Д.К. Беляева (Иваново, 2015); Международной научно-практической конференции «Инновационные решения в ветеринарной медицине, зоотехнии и биотехнологии в интересах развития агропромышленного комплекса» (Казань, 2017).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 30 научных работ, в том числе 15 статей в изданиях, включенных в перечень ВАК Министерства



образования и науки РФ и одна статья, входящая в базу данных Scopus. Получено 4 Патента РФ, разработаны и утверждены на Республиканском уровне 2 инструкции по применению Линарола и Линарола Ф-1, подготовлены и изданы 2 монографии.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 334 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, списка сокращённых терминов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 58 таблицами и 30 рисунками. Список литературы включает 455 литературных источника, в том числе 118 - зарубежных авторов.

## **2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **2.1 Материалы и методы исследований**

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии и паразитологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана». Производственные опыты проведены в неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота животноводческих предприятиях Республики Татарстан в соответствии с тематическим планом научно – исследовательской работы кафедры (№ госрегистрации: АААА-А17-117033110122-2).

Объектами исследования являлись статистико–эпизоотологическая информация, лабораторные животные и молодняк крупного рогатого скота сельскохозяйственных предприятий республики, патологический материал (кровь, паренхиматозные органы, лимфатические узлы), синтезированные противотуберкулезные препараты.

В опытах было использовано 210 белых мышей, 383 белые крысы, 16 кроликов, 143 морских свинок и 129 телят. Животные для опытов подбирались по принципу аналогов, с учётом пола, породы, возраста и живой массы тела (Западнюк И.П. и др., 1974). Группы опытных и контрольных животных содержали с соблюдением правил, норм кормления, ухода и гуманного обращения, согласно ветеринарно-санитарным требованиям (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 г., № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»).

Мониторинг эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота в республике, проводился путем изучения ветеринарной отчетности Главного управления ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан. Анализ собранной информации осуществлялся согласно методическим указаниям и учебным пособиям по порядку проведения эпизоотологического исследования сельскохозяйственных предприятий (Джупина С.И., 1991; Кисленко В.Н., 2000; Бакулов И.А. и др., 2008).

Определение минимальной ингибирующей концентрации исследуемых химических соединений в отношении микобактерий туберкулеза проводили в опытах *in vitro*, используя методы последовательных серийных разведений (Першин Г.Н., 1971) и вертикальной диффузии на плотной питательной среде «Новая», а также стандартную радиометрическую ростовую систему ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson).

Лекарственную устойчивость микобактерий к исследуемым препаратам проводили, используя метод абсолютных концентраций на среде Левенштейна – Йенсена, согласно приказа МЗ РФ №109 от 21.03.2003 г.

Оценку спектра действия, степени антибактериальной и фунгистатической активности синтезированных противотуберкулезных препаратов Тубофена, Аликона, Линарола и Линарола Ф-1 проводили согласно «Руководству по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ» под редакцией Хабриева Р.У. (2005).

Общетоксическое действие изучаемых средств определяли на лабораторных животных согласно «Методических указаний по доклиническому изучению общетоксического действия лекарственных препаратов» (утверждены Фармакологическим комитетом МЗ СССР 1985 г.).

Гематологические исследования проводили общепринятыми методами (Кудрявцев А.А. и др., 1969; Меньшиков В.В., 1987). Биохимические исследования крови, проводили с использованием биохимического анализатора Selectra Junior. Для определения количества альбуминов и глобулинов крови использовали устройство для электрофореза сыворотки крови УЭФ – 01 «Астра».

Эмбриотоксическое и тератогенное действия препаратов оценивали в соответствии с «Методическими указаниями по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию» (утверждены МЗ СССР 14.03.1986 г.).

Для изучения хронической токсичности препаратов использовали «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под редакцией Хабриева Р.У. (2005).

Для изучения специфической антимикобактериальной активности и определения профилактических доз, синтезированных химических соединений на заражённых лабораторных животных, воспроизводили экспериментальный туберкулёз морских свинок, по методике Першина Г.Н. (1971).

Аллергические исследования морских свинок и крупного рогатого скота, проводили в соответствии с «Наставлением по диагностике туберкулеза животных» (утвержденным Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 18.11.2002 г.) и «Инструкцией по применению туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих, стандартного раствора» (утв. Зам. руководителя Россельхознадзора РФ 30.09.2011 г.).

Для проведения патоморфологических и гистологических исследований кусочки печени, селезёнки, почек, легких и сердца фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и этанол-формалине. Уплотнение фиксированного материала проводили путем заливки в парафин и изготавливали гистологические срезы толщиной 5 – 10 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином (Меркулов Г.А., 1969; Хонин Г.А., Барашкова С.А. и др., 2004).

Бактериоскопические и бактериологические исследования патологического материала от зараженных животных, проводили в соответствии с рекомендациями по «Лабораторной диагностике туберкулеза» (разработанными Всесоюзным научно-исследовательским институтом бруцеллеза и туберкулеза животных) и

«Наставлением по диагностике туберкулеза животных» (утвержденным Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 18.11.2002 г.).

Изучение профилактической противотуберкулезной эффективности Тубофена, Линарола и Линарола Ф-1 проводили на новорожденных телятах, 3 - 12 дневного возраста, полученных от не реагирующих и реагирующих на туберкулин коров из хозяйств Республики Татарстан неблагополучных по туберкулезу.

Статистическую обработку цифрового экспериментального материала проводили в программе «Microsoft Excel XP», по показателям средних значений ( $M \pm m$ ). Достоверность устанавливали по методу Стьюдента-Фишера (Плохинский И.А., 1970).

## 2.2 Эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в Республике Татарстан

В период с 1960 по 2000 годы эпизоотическая обстановка по туберкулезу крупного рогатого скота в республике оставалась напряженной. Давность и множественность очагов инфекции, а также систематическое инфицирование животных, в силу нарушения хозяйствами профилактических мер снижали эффективность проводимых оздоровительных мероприятий. За 40 лет (с 1960 по 2000 годы) было оздоровлено 726 неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота пунктов, в которых заболело 130479 животных. Наиболее тяжелым, в эпизоотическом плане, для республики был период с 1960 по 1970 годы. В указанный период по республике в целом, состояло на учете ежегодно более 50 неблагополучных пунктов (рисунок 1).

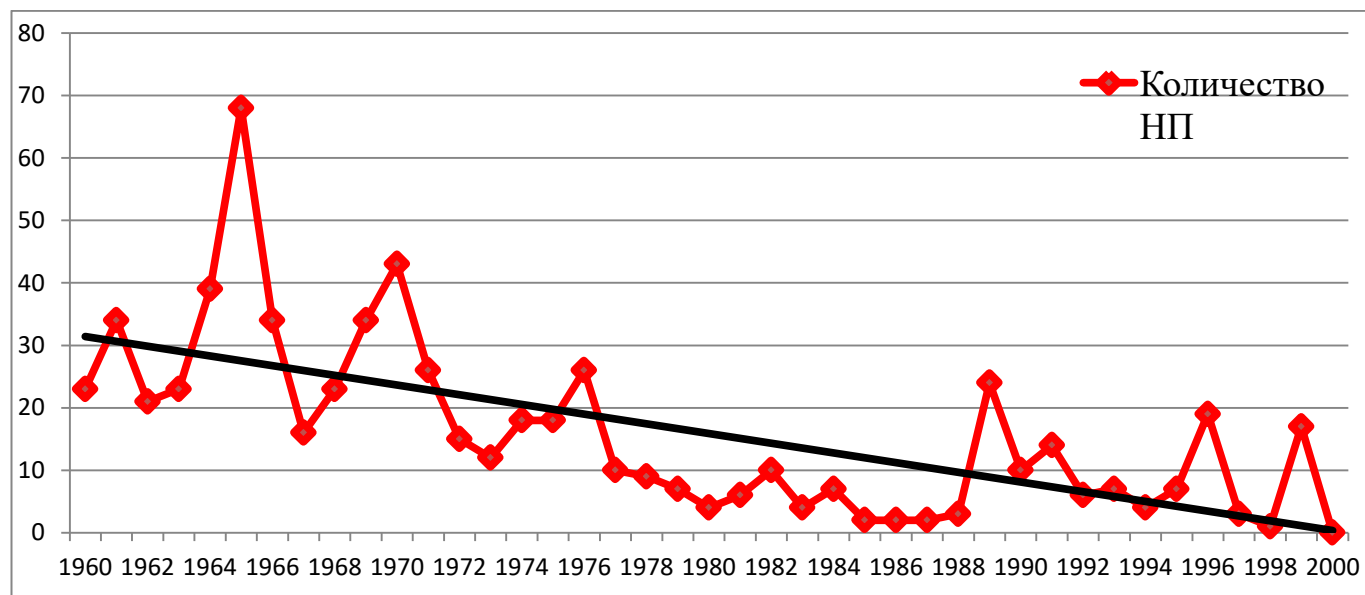


Рисунок 1 - Динамика регистрации первичных неблагополучных пунктов по туберкулезу крупного рогатого скота в РТ (1960-2000 гг.).

Как видно из рисунка 1, наблюдалась цикличность возникновения новых очагов туберкулезной инфекции, которая регистрировалась с интервалами 5-7 лет. Линия многолетнего тренда неблагополучия крупного рогатого скота по туберкулезу, т.е. общая однонаправленная тенденция изменения интенсивности эпизоотического процесса в республике, стремилась к убыванию.

Многолетние наблюдения за распространением туберкулеза крупного рогатого скота позволили прийти к выводу о недостаточной эффективности проводимых противотуберкулезных мероприятий. Эпизоотическая ситуация по туберкулезу оставалась стабильно неблагополучной, появилась проблема длительно неблагополучных хозяйств, где туберкулез регистрировался стационарно по 10-15 лет.

В период с 1995 по 2000 годы, были усилены профилактические мероприятия по охране благополучных хозяйств от заноса в них туберкулезной инфекции, строго осуществлялись мероприятия по своевременному и полному выявлению и удалению из стада больных и инфицированных животных. В результате проведенной ветеринарной службой республики работы к 2000 году были оздоровлены последние 18 неблагополучных по туберкулезу пунктов, новых пунктов в этот год выявлено не было.

В период с 2000 по 2016 годы борьба с туберкулезом крупного рогатого скота в РТ шла с переменным успехом. За 16 лет наблюдения выявлено 45 неблагополучных пунктов, из 43 районов республики туберкулез регистрировался в 16. Максимальное количество неблагополучных пунктов было зарегистрировано в 2001 и 2013 годы, в которые выявлено 11 и 12 пунктов, соответственно. За исследуемый период были годы, когда новые неблагополучные пункты по туберкулезу крупного рогатого скота не регистрировались (2000, 2003, 2006, 2011 и 2012 годы), однако и в это время оставались неблагополучные хозяйства, в которых заболевание было зарегистрировано ранее.

На основании результатов эпизоотологического мониторинга туберкулеза крупного рогатого скота в РТ, в период с 2000 по 2016 годы, нами построена эпизоотическая кривая, отображающая динамику эпизоотического процесса при данном заболевании, как отражение изменения числа новых неблагополучных пунктов за исследуемый период, рисунок 2.



Рисунок 2 - Динамика регистрации первичных неблагополучных пунктов по туберкулезу крупного рогатого скота в РТ (2000-2016 гг.).

Как видно из рисунка 2, эпизоотическая кривая за период наблюдения имеет весьма широкую амплитуду. Линия многолетнего тренда, т.е. общая однонаправленная тенденция изменения эпизоотического процесса (неблагополучия) при туберкулезе крупного рогатого скота в республике, имеет склонность к нарастанию.

В результате изучения динамики количества неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота пунктов за период с 2000 по 2016 годы, нами составлена карта территориального расположения неблагополучных по данному заболеванию пунктов, с целью определения нозоареала болезни.

В результате анализа этой картограммы, нами установлено, что неблагополучные по туберкулезу пункты территориально приурочены к определенной местности: т.е. расположились в основном на юге, и разрозненно, небольшими группами – «очагами», в центральной части республики.

Так, в районах Предволжья и Предкамья (Арский, Атнинский, Балтасинский, Высокогорский, Зеленодольский, Кукморский, Сабинский, Тюлячинский и др.) заболевание скота протекает в виде энзоотии или проявляется спорадически. Более тяжелое, по широте охвата поголовья и количеству неблагополучных пунктов, течение туберкулезной инфекции наблюдается в Заволжье и Закамье. Это Алькеевский, Алексеевский, Дрожжановский, Лениногорский, Черемшанский, Чистопольский и другие районы, именно здесь ранее имелись стационарные неблагополучные пункты и, как правило, в оздоровленных от туберкулеза хозяйствах через 3-5 лет вновь регистрировались рецидивы болезни.

## **2.3 Определение туберкулостатической активности Тубофена, изоциануратов, триазинов и $\alpha, \omega$ – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканов**

### **2.3.1 Определение туберкулостатической активности Тубофена**

Антимикобактериальная активность Тубофена была изучена *in vitro* на 3 видах микобактерий туберкулеза (музейных штаммах: *M. bovis* (штамм 14), *M. tuberculosis* (штамм H37Rv) и *M. fortuitum*) в концентрации препаратов от 10 до 0,018 мкг/мл. В качестве дополнительного контроля, исследовали также и туберкулостатик первого ряда - изониазид. Минимальную ингибирующую концентрацию Тубофена изучали, используя метод последовательных серийных разведений по общепринятой в бактериологии методике (Першин Г.Н., 1971). За титр активности изучаемого вещества принимали то его наибольшее разведение, или ту наименьшую концентрацию, которые полностью подавляли рост микобактерий туберкулеза.

Результаты исследования показали, что бактериостатическая активность Тубофена высока и не уступает таковой изониазида. Препарат оказывал полное бактериостатическое действие на штамм 14 *M. bovis* и штамм H37Rv *M. tuberculosis* в концентрации 0,075 мкг/мл, в свою очередь изониазид проявил свое бактериостатическое действие только при концентрации 0,15 мкг/мл среды.

Атипичные микобактерии (*M. fortuitum*), оказались не чувствительны к испытуемым препаратам даже в концентрациях 10 мкг/мл среды. В контрольных посевах рост тест культур был обильный, характерный для каждого вида микобактерий.

### 2.3.2 Определение туберкулостатической активности изоциануратов

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) 45 исследуемых химических соединений, относящихся к изоциануратам, в отношении микобактерий туберкулеза штамма H37Rv, проводили, используя стандартную радиометрическую ростовую систему ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson). Для этого готовили исходные растворы препаратов в диметилсульфоксиде и добавляли в пробирки MGIT в количествах, обеспечивающих получение конечных концентраций 50,0; 25,0; 10,0; 5,0; 1,0; 0,5; 0,1 и 0,05 мкг/мл среды.

Культуру микобактерий туберкулеза штамма H37Rv, соответствующую 5-му стандарту мутности (в 1 мл суспензии, соответствующей пятому стандарту оптической плотности, содержится  $5 \times 10^8$  микробных тел) добавляли в среду из расчета 0,2 мл на одну пробирку.

Пробирки инкубировали при 37°C, наличие или отсутствия роста микобактерий радиометрическая система регистрировала ежедневно в течение 11 суток. Если в указанный период роста микобактерий не отмечалось, то наблюдения проводили до 21 суток. Минимальную ингибирующую концентрацию синтезированных соединений определяли по результатам исследования на Bactec MGIT 960 как наименьшую концентрацию, которая сдерживала рост микобактерий на сутки по сравнению с контрольными пробирками.

В результате проведенного исследования установлено, что не все испытуемые соединения оказывают выраженное и продолжительное ингибирующее действие. Так, химические соединения под номерами 1, 2, 6, 8, 12, 16, 18, и 19 оказывали лишь частичное бактериостатическое действие на штамм микобактерий лишь в больших концентрациях – 50 мкг/мл среды в течение 4 суток. На 5 сутки эксперимента отмечался резкий и обильный рост микобактерий туберкулеза, схожий по уровню с таковым в контрольных пробирках на 2 сутки исследований.

Химические соединения под номерами 3, 4, 5, 13, 15, 17, 20, 21 и 24 оказывали бактериостатическое действие на микобактерии туберкулеза только при высоких концентрациях испытуемых веществ в питательной среде (50, 25 и 10 мкг/мл). В малых концентрациях (1, 0,5 и 0,1 мкг/мл) отмечался обильный рост микобактерий туберкулеза уже на 4 - 5 сутки исследований.

В свою очередь, химические соединения под номерами 9, 10, 11, 14, 22, 23, 25, 29, 31, 32, 34, 35, 40, 42, 45 и 46 оказали выраженное и продолжительное ингибирующее действие в отношении микобактерий туберкулеза даже в небольших концентрациях – 0,1 мкг/мл среды.

Например, соединение № 46 – 1-[5-(карбазоилметилсульфинил)-пентил]-3,5-диметилизоцианурат (названный авторами - Линарол) проявил наиболее выраженное бактериостатическое действие на микобактерии туберкулеза в концентрации 0,1 мкг/мл среды и полностью подавил рост возбудителей туберкулеза в течение 6 суток. Изониазид, находящийся в списке под номером 7, в аналогичной концентрации (0,1 мкг/мл среды) сдерживал рост культуры возбудителя туберкулеза в течение 2 суток.

### 2.3.3 Определение туберкулостатической активности триазинов

Изучение туберкулостатической активности 3-х триазинов в отношении микобактерий туберкулеза штамма H37Rv проводили по аналогии с опытом по изучению туберкулостатической активности изоциануратов (глава 2.3.2). Для этого готовили исходные растворы трех исследуемых химических соединений в диметилсульфоксиде и добавляли в пробирки MGIT в количествах, обеспечивающих получение конечных концентраций 0,1 и 0,05 мкг/мл среды.

В результате проведенных исследований установлено, что все испытанные химические соединения, обладают выраженным бактериостатическим действием в отношении микобактерий туберкулеза в достаточно низкой концентрации – 0,1 мкг/мл среды. Однако, соединение №1, которое представляет собой 2,4-диамино-6-(карбамоилметилсульфинилметил)-1,3,5-триазин (названный авторами - Аликон) полностью подавлял рост микобактерий в течение 4 суток. Изониазид в аналогичной концентрации (0,1 мкг/мл среды) сдерживал рост культуры возбудителя лишь в течение 2 суток. В контрольных пробирках отмечался обильный рост микобактерий туберкулеза на 2 сутки исследования.

### 2.3.4 Определение туберкулостатической активности $\alpha$ , $\omega$ – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил) алканов

Изучение туберкулостатической активности 34 синтезированных  $\alpha$ ,  $\omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканов в отношении микобактерий туберкулеза штамма H37Rv проводили, используя метод вертикальной диффузии на плотной питательной среде «Новая».

Питательную среду разливали в пробирки по 5 мл, свертывая в наклонном положении таким образом, чтобы  $\frac{1}{2}$  часть дна пробирки оставалась свободной. Свернутую среду засеивали 0,2 мл взвеси микобактерий туберкулеза штамма H37Rv, разведенного по 5-му стандарту мутности, и в наклонном положении помещали в термостат на 24 часа.

Через сутки пробирки ставили в вертикальное положение и по свободному краю закапывали по 0,3 мл субстанции соединений в исследуемых концентрациях: 12,5; 6,2; 3,1; 1,5; 0,6; 0,3, 0,1 мкг/мл среды. Затем пробирки помещали в термостат при температуре 37<sup>0</sup>С и инкубировали в течение 10 суток.

Оценку роста микобактерий туберкулеза проводили по стандартной методике, где появление зон задержки роста (более 10 мм) свидетельствовало о наличии туберкулостатических свойств в исследуемой концентрации соединений.

Исследованиями установлено, что самую высокую бактериостатическую активность в отношении штамма H37Rv проявило соединение 1.3 – которое представляет собой 1,4-Бис(амидометилсульфинил)бутан (названное авторами Линарол Ф-1), минимальная ингибирующая концентрация которого составила 0,3 мкг/мл среды. Высокую бактериостатическую активность с МИК 0,6 мкг/мл проявили соединения 1.9, 1.11, 1.13, 1.15, 1.31, 1.33 и 1.34. Соединение 1.22 проявило достаточно хорошую активность с МИК 1,5 мкг/мл. Остальные соединения этого ряда задерживают рост микобактерий туберкулеза в минимальной ингибирующей концентрации 12,5 мкг/мл среды.

## 2.4 Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к Тубофену, Линаролу, Аликону и Линаролу Ф-1

Лекарственную устойчивость микобактерий определяли методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна – Йенсена без содержания в ней крахмала, согласно приказа МЗ РФ №109 от 21.03.2003 г. Чувствительность микроорганизмов к исследуемым препаратам проводили в сравнительном аспекте по отношению к уже известным и используемым в медицинской практике противотуберкулезным препаратам: изониазид, рифампицин, офлоксацин, стрептомицин, этамбутол, этионамид (таблица 1).

Таблица 1 - Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к исследуемым соединениям

Концентрации препаратов:	Рост колоний микобактерий туберкулеза					
	H37Rv	M. bovis 14	МЛУ (clin. шт.)	M.avium	M.terrae	M. bovis от КРС
Изониазид 1 мкг/мл	_*	-	+*	+	+	-
Изониазид 10 мкг/мл	-	-	+	+	+	-
Рифампицин 80 мкг/мл	-	-	+	не проводилось	не проводилось	-
Изониазид (10 мкг/мл) + рифампицин (40 мкг/мл)	-	-	-	не проводилось	не проводилось	-
Офлоксацин 10 мкг/мл	-	-	+	не проводилось	не проводилось	-
Стрептомицин 10 мкг/мл	-	-	+	не проводилось	не проводилось	-
Стрептомицин 25 мкг/мл	-	-	+	не проводилось	не проводилось	-
Этамбутол 5 мкг/мл	-	-	+	не проводилось	не проводилось	-
Этионамид 30 мкг/мл	-	-	+	не проводилось	не проводилось	-
Этионамид 50 мкг/мл	-	-	+	не проводилось	не проводилось	-
Тубофен 10мкг/мл	-	-	+	+	+	-
Линарол 10 мкг/мл	-	-	10 колоний	+	+	-
Аликон 10 мкг/мл	-	-	10 колоний	+	+	-
Линарол Ф-1 10 мкг/мл	-	-	1 - 5 колоний	+	+	-
Контроль	+	+	+	+	+	+

Примечание: «-» - отсутствие роста (менее 20 колоний);

«+» - наличие роста микобактерий (более 20 колоний).



Культуру считали чувствительной к данной концентрации препарата, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 колоний, при обильном ее росте в контроле. Культуру считали устойчивой к той концентрации препарата, которая содержится в данной пробирке, если в пробирке со средой выросло более 20 колоний, при обильном ее росте в контроле.

В результате проведенных исследований установлено, что изучаемые противотуберкулезные препараты – Линарол, Аликон и Линарол Ф-1 проявили выраженное бактериостатическое действие на микобактерии туберкулеза штаммов H37Rv, *M. bovis* 14, культуру клинического штамма микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и культуру микобактерий, выделенную от инфицированного крупного рогатого скота, в концентрациях 10 мкг/мл среды.

Тубофен в концентрации 10 мг/мл среды проявил свое бактериостатическое действие лишь в отношении референтных штаммов (H37Rv, *M. bovis* 14) и культуру микобактерий, выделенную от крупного рогатого скота. Культура клинического штамма с множественной лекарственной устойчивостью оказалась резистентной к данному препарату в исследованной дозе, так как в опытных пробирках со средой отмечали наличие роста более 35 колоний.

Концентрации изониазида, рифампицина, офлоксацина, стрептомицина, этамбутола, этионамида и их различные сочетания вели себя согласно литературным данным - штамм H37Rv и *M. bovis* 14 был чувствителен ко всем концентрациям этих препаратов при положительном контроле.

Штамм микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью проявил свою резистентность ко всем исследуемым препаратам, кроме Аликона, Линарола и Линарола Ф-1 в концентрациях 10 мкг/мл среды, а также изониазида в сочетании с рифампицином (изониазид в концентрации 10 мкг/мл и рифампицин в концентрации 40 мкг/мл среды).

Штаммы *M. avium* и *M. terrae* оказались не чувствительными к синтезированным соединениям в концентрациях 10 мкг/мл среды. Штамм, выделенный от инфицированного крупного рогатого скота, оказался чувствительным ко всем исследуемым в опыте препаратам в различных их концентрациях. В контроле, к 21 дню исследования, отмечался обильный рост микобактерий туберкулеза всех исследуемых штаммов, кроме микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота, рост которых проявился только на 40 – 50 сутки.

Таким образом, проведенное исследование показало, что новые туберкулостатики Линарол, Аликон и Линарол Ф-1 обладают выраженным бактериостатическим действием на референтные и лекарственно - устойчивый штаммы микобактерий.

## **2.5 Определение противомикробной и фунгистатической активности Тубофена, Аликона, Линарола и Линарола Ф-1**

Оценку спектра действия и степени антибактериальной и фунгистатической активности синтезированных противотуберкулезных препаратов Тубофена, Аликона, Линарола и Линарола Ф-1 проводили согласно «Руководству по

экспериментальному изучению новых фармакологических веществ» под редакцией Хабриева Р.У. (2005) (таблица 2).

По результатам исследований, отраженных в таблице 2, выяснилось, что ни одно из четырех соединений, ни в одной из использованных концентраций (5,0; 2,5; 1,25 и 0,6 мг/мл среды) не проявило выраженного антибактериального и фунгистатического действия в отношении тестируемых культур и рост их в опытных пробирках не отличался от таковых в контрольных.

Таблица 2 - Результаты изучения противомикробной и фунгистатической активности Тубофена, Аликона, Линарола и Линарола-Ф1

Препарат	Конц., мкг/мл	Культуры микроорганизмов:					
		St.aureus 209p	E.coli F50	B.cereus 8035	Candida albicans	Tr. men- tagrophytes	Asp. niger
Тубофен	5	+	+	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+
	0,6	+	+	+	+	+	+
Аликон	5	+	+	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+
	0,6	+	+	+	+	+	+
Линарол	5	+	+	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+
	0,6	+	+	+	+	+	+
Линарол Ф-1	5	+	+	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+
	0,6	+	+	+	+	+	+
Контроль	-	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - рост культуры; «-» - засеянная культура не дает роста.

На основании проведенного исследования установили, что синтезируемые препараты: Тубофен, Аликон, Линарол и Линарол Ф-1 обладают избирательным антибактериальным действием, только в отношении микобактерий туберкулеза.

## 2.6 Изучение фармако-токсикологических свойств

### 2.6.1 Изучение фармако-токсикологических свойств Тубофена

#### 2.6.1.1 Определение параметров острой токсичности Тубофена

Опыты были проведены на 24 белых мышах массой 20-25 г. Препарат вводили в желудок с помощью металлического зонда с оливой, надетого на шприц, по схеме, приведённой в таблице 3.

Параметры острой токсичности Тубофена при внутрижелудочном введении белым мышам составили: максимально переносимая доза (МПД) – 400 мг/кг; среднесмертельная доза (ЛД<sub>50</sub>) - 668±63 мг/кг; доверительный интервал генеральной (ДИГ) средней ЛД<sub>50</sub> - 668 (538÷798) мг/кг; ЛД<sub>100</sub> - 1000 мг/кг.

Таблица 3 - Результаты исследования острой токсичности Тубофена на белых мышах

Группа животных	Доза препарата, мг/кг	Количество мышей	Число мышей:		% гибели
			погибших	выживших	
1	400	6	0	6	-
2	600	6	2	4	33
3	800	6	5	1	83
4	1000	6	6	0	100

Установлено, что в соответствии с «Гигиенической классификацией пестицидов по основным параметрам вредности» Тубофен является веществом, обладающим средней токсичностью. По степени опасности III класс, опасные химические вещества (ГОСТ 12.1.007.76).

Результаты исследования острой токсичности Тубофена на белых крысах отражены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты исследования острой токсичности Тубофена на белых крысах

Группа животных	Доза препарата, мг/кг	Количество крыс	Число крыс		% гибели
			погибших	выживших	
1	4500	6	0	6	-
2	5000	6	1	5	16
3	5500	6	3	3	50
4	6000	6	4	2	66
5	6500	6	5	1	83
6	7000	6	6	0	100

Установлено, что параметры токсичности препарата для белых крыс составили: максимально переносимая доза – 4500 мг/кг; среднесмертельная доза (ЛД<sub>50</sub>) - 5675±245 мг/кг; доверительный интервал генеральной средней ЛД<sub>50</sub> - 5675 (5195÷6155) мг/кг; ЛД<sub>100</sub> - 7000 мг/кг.

В соответствии с «Гигиенической классификацией пестицидов по основным параметрам вредности Тубофен, является малотоксичным соединением. По степени опасности IV класс, незначительно опасные химические вещества (ГОСТ 12.1.007.76).

### 2.6.1.2 Изучение субхронической токсичности и кумулятивных свойств Тубофена

Субхроническую токсичность изучали на 20 белых крысах живой массой 150 г, которых поделили на 2 группы по 10 животных в каждой. Животным первой опытной группы в течение 26 дней ежедневно задавали препарат. Для этого, в течение первых четырёх суток внутрижелудочно, атравматическим металлическим зондом, вводили исследуемый препарат в дозе 1/20 от ранее установленной однократной дозы ЛД<sub>50</sub> – 283 мг/кг массы тела. Затем, через каждые 4 дня, прежнюю дозу препарата увеличивали в 1,5 раза, и так до окончания опыта, т.е. до гибели всех

опытных крыс. Животным контрольной группы в аналогичных дозах вводили дистиллированную воду (таблица 5).

Установлено, что в течение первых 17 суток введения Тубофена клинические признаки проявления интоксикации организма белых крыс отсутствовали и слабое их проявление, в виде незначительного угнетения общего состояния и частичного отказа от корма, отмечалось после 18 суток с начала опыта. На 21 сутки с момента введения препарата у 2 из 10 животных опытной группы отмечалось полное угнетение общего состояния и 1 крыса погибла. На 25 сутки с момента введения препарата все животные опытной группы погибли.

Таблица 5 - Результаты исследования по определению кумулятивных свойств Тубофена

Длительность наблюдения, сут.	Ежедневно вводимая доза, мг/кг	Суммарная доза за 4 сут., мг/кг	Суммарная доза, мг/кг
1-4	283,75	1135	1135
5-8	425,6	1702,5	2837,5
9-12	638,4	2553,6	5391,1
13-16	957,6	3830,4	9221,4
17-20	1436,4	5745,6	14967
21-24	2154,6	8618,4	23585,4
25	3231,9	-	26617,3

Согласно проведенным подсчетам установлено, что среднесмертельная доза испытуемого препарата при многократном введении составила 26817,3 мг/кг живой массы. Коэффициент кумуляции Тубофена - 4,72. По принятой в настоящее время классификации, препарат соответствует веществам, обладающим умеренной кумуляцией.

### 2.6.1.3 Оценка потенциальной опасности проявления эмбриотоксических и тератогенных свойств Тубофена

Изучение эмбриотоксических и тератогенных свойств Тубофена было проведено на 20 беспородных самках белых крыс половозрелого возраста, массой тела 180 – 230 г. Животные были разделены на 2 группы, по 10 крыс в каждой. Первая опытная группа получала препарат внутрижелудочно, в дозе составляющей 1/20 от среднесмертельной дозы – 283 мг/кг массы тела, в течение 20 дней. Вторая, контрольная группа в аналогичных дозах получала дистиллированную воду.

На 20 сутки беременности подвергали эвтаназии по 5 крыс из каждой группы для исследования эмбрионального материала. Остальных животных содержали до появления потомства.

Анализ проведенных исследований показал, что Тубофен не влияет на репродуктивные качества крыс. Показатели пред- и постимплантационной гибели у опытных и контрольных животных практически не отличались. При этом количество жёлтых тел и мест имплантации в группах, примерно было равным и не отличалось более чем на 5,8%. Вскрытие самок белых крыс на 20 сутки беременности, показало практически равное количество живых и мертвых плодов в обеих группах.

Изучение нарушений эмбрионального развития проявляющихся в постнатальном периоде, проводили на 5 крысах, от которых было получено потомство.

Установлено, что Тубофен не влияет на массу тела и продолжительность беременности самок опытной группы. Также существенно не менялись показатели постнатальной смертности и прироста массы тела крысят за первые 4 недели их жизни. Анализируя полученные результаты, можно констатировать, что изучаемое химическое соединение не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действиями.

## **2.6.2 Изучение фармако-токсикологических свойств Аликона**

### **2.6.2.1 Определение параметров острой токсичности Аликона**

Острую токсичность препарата определяли на 70 белых нелинейных мышах массой тела 18-20 г и 70 белых нелинейных крысах, массой тела 180-200 г, подобранных по принципу аналогов. Препарат испытывали в дозах 1000,1200,1400,1600,1800 и 2000 мг/кг массы тела, с шагом дозы 200 мг, при однократном введении в желудок в виде суспензии с дистиллированной водой с помощью металлического зонда с оливой надетого на шприц.

Установлено, что однократное внутрижелудочное введение исследуемого вещества в вышеуказанных дозах не вызвало гибели белых мышей и крыс в течение 14 суток. При диагностическом вскрытии животных на 14 сутки видимых изменений в органах и тканях не обнаружено. В дозах, более вышеуказанных, введение препарата было невозможно, ввиду его нерастворимости в воде. В связи с тем, что гибели опытных животных за период наблюдения не отмечалось, расчет среднесмертельной дозы не представлялся возможным. Исследуемое химическое соединение, согласно ГОСТ 12.1.007.76, относится к IV классу (незначительно опасные химические вещества).

Однако дальнейшие токсикологические и бактериологические исследования химических соединений относящихся к триазинам были прекращены, по 3-м основным причинам:

1. Трудности синтеза производных триазина в больших количествах.
2. Плохая растворимость синтезированных соединений в воде, что ухудшает биодоступность.
3. Относительная дороговизна реактивов используемых для синтеза препарата.

## **2.6.3 Изучение фармако-токсикологических свойств Линарола**

### **2.6.3.1 Определение параметров острой токсичности Линарола**

Острую токсичность определяли на белых нелинейных мышах массой тела 18-20 г и белых нелинейных крысах массой тела 180-200 г, подобранных по принципу аналогов. Для этого было сформировано 7 групп животных (6 опытных и 1 контрольная), по 10 особей в каждой.

Линарол испытывали в дозах 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 и 4000 мг/кг массы тела, с шагом дозы 500 мг, при однократном введении в желудок в виде суспензии с дистиллированной водой с помощью атравматичного зонда.

Результаты изучения острой токсичности на белых мышах и крысах показали, что ни одна испытуемая доза Линарола не вызвала гибели животных. В дозах, более вышеуказанных, введение оказалось невозможно, ввиду нерастворимости препарата в воде, расчет среднесмертельной дозы не представлялся возможным и для дальнейших исследований, была использована доза - 4000 мг/кг массы тела, как максимально возможная для введения. Исследуемый препарат Линарол, согласно ГОСТ 12.1.007.76, относится к IV классу (незначительно опасные химические вещества).

### 2.6.3.2 Изучение субхронической токсичности и кумулятивных свойств Линарола

Для проведения эксперимента было сформировано 2 группы белых крыс по 10 особей (5 самок и 5 самцов) в каждой. Первой группе животных вводили Линарол внутрижелудочно с помощью атравматичного зонда в дозе 1/10 от максимально вводимой (400 мг/кг массы тела). Контрольной группе вводили внутрижелудочно аналогичное количество дистиллированной воды. Введение препарата проводили ежедневно, каждые 4 дня дозу увеличивали в 1,5 раза. Опыт продолжался 28 дней.

Установлено, что за весь период исследования гибели подопытных крыс не наблюдалось. Применение рекомендуемой формулы для подсчета коэффициента кумуляции, согласно методике, не представлялось возможным, в связи с чем, Линарол относится к препаратам со слабовыраженными кумулятивными свойствами.

### 2.6.3.3 Изучение влияния Линарола на антитоксическую функцию печени

Для проведения эксперимента было отобрано 5 групп белых крыс, 4 опытные и 1 контрольная, по 10 животных в каждой. Четирем опытным группам животных перед началом исследования внутрижелудочно, с помощью атравматического зонда, вводили Линарол в дозе 1/10 от максимально вводимой (400 мг/кг массы), а крысам контрольной группы внутрижелудочно вводили дистиллированную воду. Раствор гексенала инъецировали внутрибрюшинно в дозе 60 мг/кг массы тела через 1, 2, 5 и 24 часа после введения Линарола (таблица 6).

Таблица 6 - Продолжительность гексеналового сна белых крыс (в минутах) при внутрижелудочном введении Линарола

Группа животных	Доза препарата, мг/кг	Продолжительность интервала (в часах), через который вводили гексенал			
		1	2	5	24
Опытная	400	26,75±3,76	27,57±3,74*	25,5±2,55	24,75±3,69
Контрольная	-	26,29±4,61	26,29±4,61	26,29±4,61	26,29±4,61

Примечание: \* -  $p > 0,05$ .

Из данных таблицы видно, что инъекция гексенала после внутрижелудочного введения Линарола через 1, 2, 5 и 24 часа не приводила к достоверному увеличению продолжительности сна подопытных крыс, по сравнению с контрольными животными. На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что исследуемый препарат не влияет на антитоксическую функцию печени.

## 2.6.4 Изучение фармако-токсикологических свойств Линарола Ф-1

### 2.6.4.1 Определение параметров острой токсичности Линарола Ф-1

Опыты были проведены на 30 белых мышах массой 17-20 г. Препарат вводили в желудок с помощью металлического зонда с оливой, надетого на шприц, по схеме, приведённой в таблице 7.

В результате проведенного исследования установлено, что максимально переносимая доза Линарола Ф-1 для белых мышей составила 500 мг/кг массы тела, ЛД<sub>50</sub> препарата равна 800 мг/кг, ЛД<sub>100</sub> - 1100 мг/кг массы тела. По принятой в настоящее время классификации, Линарол Ф-1 является веществом, обладающим средней токсичностью. По степени опасности III класс, опасные химические вещества (ГОСТ 12.1.007.76).

Таблица 7 - Результаты исследования острой токсичности Линарола Ф-1 на белых мышах

Группа животных	Доза препарата, мг/кг	Количество мышей	Число мышей:		% гибели
			погибших	выживших	
1	300	5	0	5	0
2	500	5	0	5	0
3	700	5	2	3	40
4	900	5	3	2	60
5	1100	5	5	0	100
Контроль	дист. вода	5	-	5	0

Результаты исследования параметров острой токсичности препарата на белых крысах показали, что при дозах 2000, 2500, 3000, 3500 и 4000 мг/кг массы тела, гибель животных опытных групп не происходила, клинические признаки отравления не наблюдались. Вводить соединение в больших дозах больше, чем 4000 мг/кг массы тела, не представлялось возможным, поскольку более высокая концентрация препарата не растворялась в растворителе (дистиллированной воде). Установлена максимально вводимая доза препарата для белых крыс – 4000 мг/кг массы тела. По принятой в настоящее время классификации Линарол Ф-1, является малотоксичным соединением для белых крыс. По степени опасности IV класс, незначительно опасные химические вещества (ГОСТ 12.1.007.76).

### 2.6.4.2 Изучение хронической токсичности Линарола Ф-1

Хроническую токсичность препарата изучали в трех дозах. При выборе доз руководствовались результатами, полученными при исследовании острой токсичности. Высшая доза – 200 мг/кг массы тела, рассчитана с учетом ЛД<sub>50</sub> (1/20 от ЛД<sub>50</sub>), минимальная доза - 10 мг/кг, близка к терапевтической, третья доза – 100 мг/кг, являлась промежуточной.

Эксперимент проводился на самцах белых нелинейных крыс массой 250-300 г. Были сформированы четыре группы животных – три опытные и одна контрольная, по 5 особей в каждой. Животным опытных групп, препарат вводили в желудок с помощью металлического зонда с оливой, присоединенного к шприцу ежедневно, в

течение 60 суток, причем: 1-ой опытной группе Линарол Ф-1 вводили в дозе 10 мг/кг массы тела; 2-ой опытной группе, в дозе 100 мг/кг массы тела; 3-й опытной группе, в дозе 200 мг/кг массы тела; 4-ой контрольной группе в аналогичных дозах вводили дистиллированную воду.

Проведенные экспериментальные исследования Линарола Ф-1 показали, что внутрижелудочное, ежедневное введение препарата, в дозах 10, 100 и 200 мг/кг массы тела, в течение 60 суток, ни в одном случае не привело к гибели подопытных животных, однако вес белых крыс получавших препарат в дозе 200 мг/кг массы, к окончанию эксперимента снизился на 7%.

Исследования периферической крови животных получавших препарат в дозах 10, 100 и 200 мг/кг массы тела, в течение 60 суток, показало, что Линарол Ф-1 не влияет на гематологические показатели белых крыс. Введение препарата в дозах 10 и 100 мг/кг массы тела, в течение 60 суток не повлияло на биохимические показатели сыворотки крови опытных животных и они практически не отличались от таковых контрольной группы. В то же время, введение препарата в дозе 200 мг/кг массы тела, в течение 60 суток привело к достоверному увеличению количества АЛТ, общего белка и  $\beta$ -глобулинов, что свидетельствует о наличии ряда отклонений, связанных с нарушением работы печени и обмена веществ в организме.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что препарат не обладает выраженной хронической токсичностью в дозах 10 и 100 мг/кг массы тела, при ежедневном введении, в течение 60 суток.

#### **2.6.4.3 Оценка потенциальной опасности проявления эмбриотоксических и тератогенных свойств Линарола Ф-1**

Опыты проведены на 20 половозрелых самках белых крыс, массой 190 - 250 грамм, которые были разделены на 2 группы, по 10 животных в каждой. Первая опытная группа получала препарат внутрижелудочно, в дозе 1/10 от максимально вводимой (400 мг/кг массы тела), в течение всей беременности, а вторая - контрольная группа в аналогичных дозах дистиллированную воду.

Анализ проведённых исследований показал, что Линарол Ф-1 не влияет на репродуктивные качества крыс. Показатели пред- и постимплантационной гибели у опытных и контрольных животных практически не отличались. При этом количество жёлтых тел и мест имплантации в группах, примерно было равным и не отличалось более чем на 1%. Вскрытие самок белых крыс на 20 сутки беременности, показало практически равное количество живых и мертвых плодов в обеих группах.

Изучение нарушений эмбрионального развития проявляющихся в постнатальном периоде, проводили на 5 крысах, от которых было получено потомство. Установлено, что препарат не влияет на массу тела и продолжительность беременности самок опытной группы. Мертворожденных крыс в опытной группе не наблюдалось. Показатели динамики массы тела новорожденных крысят от опытных животных на 1, 3, 5, 14, 20 и 28 сутки жизни не имели значительных изменений по отношению к группе биологического контроля. Также существенно не отличались от контроля такие показатели как срок отлипания ушей, сроки прозрения и прорезывания резцов.



Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что препарат Линарол Ф-1, при внутрижелудочном введении, в дозе 1/10 от максимально (400 мг/кг массы тела), в течение всей беременности белым крысам, не обладает эмбриотоксическим и тератогенным свойствами.

## **2.7 Изучение противотуберкулезной активности Тубофена in vivo**

### **2.7.1 Изучение профилактической активности Тубофена на экспериментальной модели туберкулеза морских свинок**

Для проведения эксперимента использовали 56 морских свинок, весом 350-400 грамм, которых разделили на 8 групп. Из них 6 групп опытные, по 8 животных в каждой, и 2 контрольные, по 4 животных в каждой. Животных 6-ти опытных и одной контрольной групп заражали 20 дневной оттитрованной культурой возбудителя туберкулеза бычьего вида (штамм 14). Бактериальную массу, из расчета 0,1 мг на животное вводили под кожу правой паховой области в 0,5 мл физиологического раствора. Химиопрофилактику туберкулеза морских свинок начали производить на следующий день после заражения. Животным шести контрольных групп, перорально, с помощью атравматического зонда с оливой, ежедневно, в течение 60 суток вводили растворы Тубофена и изониазида. Причем, морские свинки первой подопытной группы получали Тубофен в дозе 20 мг/кг массы, второй – 10 мг/кг массы, третьей – 5 мг/кг массы, четвертой – 2,5 мг/кг массы, пятой – 1 мг/кг массы и животные шестой группы получали изониазид в дозе – 10 мг/кг массы. Животные 7 и 8 контрольных групп получали ежедневно, перорально дистиллированную воду.

За животными вели клинические наблюдения и аллергические исследования на туберкулез (таблица 8). Установлено, что за время проведения опыта все животные 1, 2, 3, 4 и 6 опытных групп выжили, в то время как 3 морские свинки из 5-ой опытной, получавшие Тубофен в дозе 1 мг/кг массы, и все животные 7-ой контрольной группы погибли.

В результате проведенных аллергических исследований морских свинок установлено, что животные 1, 2, 3 и 6 опытных групп не реагировали на введение туберкулина ни через 30 дней, ни через 60 дней после заражения их микобактериями туберкулеза бычьего вида. Отрицательный результат аллергических исследований также отмечался у животных 8 группы (интактные). У морских свинок 4 и 5 групп, получавших Тубофен в дозах 2,5 и 1 мг/кг массы, а также у животных 7-ой контрольной группы, через 30 и 60 дней после заражения наблюдалось резко выраженная аллергическая реакция в местах введения туберкулина.

Всех животных контрольных и опытных групп, прошедших курс химиопрофилактики (60 дней), подвергали эвтаназии. На основании патологоанатомических и бактериологических исследований установили средний общий индекс поражения органов и высеваемости микобактерий.

У первых трех подопытных групп, получавших Тубофен в дозах 5, 10 и 20 мг/кг массы, а также у 8-ой контрольной (интактной) группы, этот индекс равнялся 0/0.

Таблица 8 - Результаты испытания химиофилактической активности Тубофена при экспериментальном туберкулезе морских свинок

Группы животных	Препарат	Суточная доза, мг/кг	Исход		Результат аллергического исследования			Средний индекс поражения органов и высеваемости микобактерий
			погибло	выжило	до заражения	После заражения (сутки)		
						30	60	
I	Тубофен	20	-	8	-	-	-	0 <sup>1</sup> /0 <sup>2</sup>
II	Тубофен	10	-	8	-	-	-	0/0
III	Тубофен	5	-	8	-	-	-	0/0
IV	Тубофен	2,5	-	8	-	+	+	6,45/6,65
V	Тубофен	1	3	5	-	+	+	17,06/12,46
VI	Изониазид	10	-	8	-	-	-	0,37/0
VII	Контроль (зараженные)	-	4	-	-	+	+	20,2/12,8
VIII	Контроль, (интактные)	-	-	4	-	-	-	0/0

Примечание: <sup>1</sup> – индекс поражения органов;  
<sup>2</sup> – индекс высеваемости микобактерий.

При исследовании патологического материала от 4-ой опытной группы животных, получавших Тубофен в дозе 2,5 мг/кг массы, средний общий индекс поражения органов и высеваемости микобактерий составил 6,45/6,65, у 5-ой подопытной группы животных, при использовании Тубофена в дозе 1 мг/кг массы, этот показатель оказался выше (17,06/12,46) и практически достигал значений 7-ой контрольной группы (20,2/12,8).

При исследовании патологического материала от 6-ой опытной группы морских свинок, получавших изониазид в дозе 10 мг/кг массы средний общий индекс поражения органов и высеваемости микобактерий у морских свинок данной группы составил 0,37/0.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что Тубофен проявил достаточно высокий профилактический эффект и обладает выраженными туберкулостатическими свойствами в дозах 5, 10 и 20 мг/кг массы животного.

### 2.7.2 Патоморфологическое изучение профилактического действия Тубофена на экспериментальной модели туберкулеза

Для оценки структурных изменений, возникающих в органах и тканях зараженных лабораторных животных, использовали 56 морских свинок, которые находились в эксперименте по изучению профилактической активности Тубофена при экспериментальной модели туберкулеза у морских свинок. При вскрытии

павших больных туберкулезом морских свинок контрольной группы через 47 – 52 сутки после заражения, отмечали наиболее выраженные патологические изменения в печени, селезенки, регионарных к месту заражения лимфатических узлах и легких. У больных туберкулезом морских свинок контрольной группы в органах и тканях отмечали патологические изменения характерные для прогрессирующего первичного туберкулеза с генерализацией процесса. В печени, селезенке, легких и других органах неравномерно располагались мелкие и средних размеров некрозы и гранулемы со слабо выраженной специфической зоной клеточной демаркации, что отражало активное течение инфекционного процесса в организме больных животных.

В органах и тканях зараженных *M. bovis* морских свинок, по окончании 60-дневного курса применения изониазида в дозе 10 мг/кг массы тела, патоморфологических изменений характерных для туберкулеза не обнаруживали. Длительное применение изониазида привело к развитию у подопытных животных гепатоциллюлярной патологии различной степени выраженности, осложненной деструктивными васкулитами и застойными явлениями в желчных путях.

Профилактическая обработка зараженных морских свинок Тубофеном в дозе 20 мг/кг массы эффективно подавляла развитие патологических изменений вызываемых микобактериями туберкулеза. Действие препарата в исследованных органах вызвало только умеренное проявление дистрофических процессов обратимого характера, без вазопатогенных осложнений.

Продолжительное применение Тубофена в дозе 10 мг/кг массы эффективно предотвращает развитие инфекционного процесса. В печени по истечении 60-дневного курса химиопрофилактики полностью сохранялась структура балочного строения органа, в том числе популяционный состав эпителиальных клеток был без признаков нарушения обмена веществ. Увеличивалось количество клеток ретикулоэндотелия. Отмечено благоприятное влияние препарата на процесс восстановления клеточных механизмов иммунной реактивности зараженного организма.

Введение Тубофена инфицированным морским свинкам в дозе 5 мг/кг массы подавляло проявление признаков инфекционного процесса. Несмотря на обнаруженные дистрофические процессы обратимого характера и гемодинамические нарушения в системе микроциркуляции сосудов печени и селезенки, выявить специфические реакции свойственные туберкулезному процессу не удалось. После применения Тубофена в дозах 2,5 и особенно 1 мг/кг массы в исследованных органах животных отмечали малочисленные мелкие гранулемы.

Таким образом, Тубофен в дозе 10 мг/кг массы тела оказывает выраженный бактерицидный эффект по отношению к микобактериям туберкулеза бычьего вида и не вызывает повреждения паренхиматозных и мезенхимальных структур в исследованных органах, не обладает вазопатогенным и иммунодепрессивным действиями, свойственных для изониазида.

## 2.8 Изучение противотуберкулезной активности Линарола *in vivo*

### 2.8.1 Изучение профилактической активности Линарола на экспериментальной модели туберкулеза морских свинок

Для проведения эксперимента использовали 28 морских свинок, весом 350-400 грамм, которых разделили на 5 групп. Из них 4 группы опытные, по 6 животных в каждой, и 1 контрольная, состоящая из 4 животных. Животных 4 опытных и одной контрольной групп заражали 20 дневной оттитрованной культурой возбудителя туберкулеза бычьего вида (штамм 14). Бактериальную массу, из расчета 0,1 мг на животное, вводили под кожу правой паховой области в 0,5 мл физиологического раствора. Химиопрофилактику туберкулеза морских свинок начали проводить на следующий день после заражения. Животным четырех опытных групп перорально, с помощью атравматического зонда с оливой, ежедневно вводили растворы Линарола. Морские свинки первой опытной группы получали Линарол в дозе 10 мг/кг массы, второй – 5 мг/кг массы, третьей – 2,5 мг/кг массы, четвертой – 1 мг/кг массы. Животные 5 контрольной группы ежедневно перорально получали дистиллированную воду.

Опыт продолжался 60 суток. За животными вели клинические наблюдения и проводили аллергические исследования на туберкулез. По окончании срока химиопрофилактики провели эвтаназию морских свинок, патологический материал использовали для проведения патоморфологических и бактериологических исследований (таблица 9).

Таблица 9 - Результаты испытания химиопрофилактической активности Линарола при экспериментальном туберкулезе морских свинок

Группы животных	Препарат	Суточная доза, мг/кг	Исход		Результат аллергического исследования			Средний индекс поражения органов и высеваемости микобактерий
			погибло	выжило	До заражения	После заражения (сутки)		
						30	60	
I	Линарол	10	-	6	-	-	-	0 <sup>1</sup> /0 <sup>2</sup>
II	Линарол	5	-	6	-	-	-	0/0
III	Линарол	2,5	-	6	-	+	+	1,66/1,5
IV	Линарол	1	1	5	-	+	+	9,32/6,15
V	Контроль (зараженные)	-	1	3	-	+	+	14,25/12,5

Примечание: <sup>1</sup> – индекс поражения органов;  
<sup>2</sup> – индекс высеваемости микобактерий.

За время проведения опыта все животные 1, 2 и 3 опытных групп выжили, в то время как 1 морская свинка из 4-ой опытной группы, получавшая Линарол в дозе 1 мг/кг массы и 1 морская свинка из 5-ой контрольной группы погибли.

В результате проведенных аллергических исследований морских свинок установлено, что животные 1 и 2 опытных групп не реагировали на введение туберкулина ни через 30, ни через 60 суток после заражения их микобактериями туберкулеза. У морских свинок 3 и 4 групп, получавших Линарол в дозах 2,5 и 1 мг/кг массы, а также у животных 5-ой контрольной группы, через 30 и 60 дней после заражения наблюдалось резко выраженная аллергическая реакция в местах введения туберкулина.

На основании патологоанатомических и бактериологических исследований установили средний общий индекс поражения органов и высеваемости микобактерий туберкулеза. У первых двух подопытных групп, получавших Линарол в дозах 5 и 10 мг/кг массы, этот индекс равнялся 0/0. При исследовании патологического материала от 3 подопытной группы животных, получавших препарат в дозе 2,5 мг/кг массы, средний общий индекс поражения органов и высеваемости микобактерий составил 1,66/1,5, у 4-ой подопытной группы животных, получавших Линарол в дозе 1 мг/кг массы, этот показатель оказался выше и составил - 9,32/6,15. У 5-ой контрольной группы животных общий индекс поражения органов и высеваемости микобактерий туберкулеза составил 14,25/12,5 соответственно.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что Линарол проявил достаточно высокий профилактический эффект и обладает выраженными туберкулостатическими свойствами в дозах 5 и 10 мг/кг массы животного.

### **2.8.2 Патоморфологическое изучение профилактического действия Линарола на экспериментальной модели туберкулёза**

Для оценки структурных изменений, возникающих в органах и тканях заражённых лабораторных животных, использовали 28 морских свинок, которые находились в эксперименте по изучению профилактической активности Линарола при экспериментальной модели туберкулеза у морских свинок.

Осмотр органов и тканей морских свинок контрольной группы показал, что наиболее характерные для туберкулеза патологоанатомические изменения обнаруживались в регионарных, к месту заражения, паховых лимфатических узлах, печени и селезенке.

При гистологическом исследовании в регионарном, к месту заражения, лимфатическом узле обнаруживались очажки некрозов. В центральной части находилась эозинофильная масса, содержащая единичные некротизированные клетки, по периферии были лимфоидные клетки, часть которых с признаками кариорексиса. Встречались единичные многоядерные клетки типа Лангханса. Лимфатические узелки селезенки имели незначительно расширенные герминативные центры, местами отмечали скопление некротизированных клеток без выраженных признаков клеточной реакции по периферии. В печени отмечали наличие ареактивных некрозов, периваскулярные зоны содержали скопления лимфоидно-гистиоцитарных клеток.

Вскрытие животных 1-ой опытной группы, получавших Линарол в дозе 10 мг/кг массы, видимых макроскопических изменений не выявило. При

гистологическом исследовании патологического материала, изменений специфичных для туберкулезного процесса, не обнаружено.

При гистологическом исследовании регионарных, к месту заражения, лимфатических узлов морских свинок 2-й опытной группы получавших перорально Линарол в дозе 5 мг/кг массы тела, в корковом веществе выявляли незначительные скопления эпителиоидных клеток, среди которых выявлялись единичные гигантские клетки. Рисунок фолликулярного строения селезенки был хорошо выражен, фолликулы имели расширенные реактивные центры. В печени и почках обнаруживались признаки зернистой дистрофии паренхиматозных клеток и умеренно выраженная пролиферация лимфоидно-гистиоцитарных клеток в периваскулярных пространствах. В легких отмечали умеренно выраженную инфильтрацию межальвеолярных перегородок лимфоидно-гистиоцитарными клетками.

Вскрытие животных 3-ей опытной группы, получавших в течение 60 суток с профилактической целью Линарол в дозе 2,5 мг/кг массы, показало, что макроскопические изменения характерные для туберкулеза выявлялись лишь в регионарных к месту заражения лимфатических узлах. В селезенке был хорошо выражен рисунок фолликулярного строения. Фолликулы имели слабо выраженные герминативные центры. В печени, почках отмечалась паренхиматозная дистрофия и умеренно выраженные периваскулярные скопления лимфоидно-гистиоцитарных клеток. Легкие были воздушны, межальвеолярные перегородки слабо инфильтрированы лимфоидно-гистиоцитарными клетками. У одной из морских свинок обнаруживали небольшие участки ареактивного некроза.

При вскрытии морских свинок 4-ой опытной группы, получавших с профилактической целью Линарол в дозе 1 мг/кг массы, изменения в органах были схожи с таковыми у 5-ой контрольной группы, но менее выражены по интенсивности.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что препарат Линарол способен оказывать профилактическое действие, сдерживающее развитие туберкулезного процесса в органах и тканях зараженных морских свинок. Причем это действие начинается уже с дозы 2,5 мг/кг массы. Наиболее выраженным профилактическим действием обладает доза 10 мг/кг массы, при котором в органах и тканях зараженных животных туберкулезный процесс не проявляется.

### **2.8.3 Изучение терапевтической противотуберкулезной активности Линарола на модели острого экссудативно-некротического туберкулеза мышей**

Изучение терапевтической противотуберкулезной активности Линарола в системе *in vivo* проводили на 16 самцах инбредных мышей линии I/St. Все животные были разделены на три группы, две опытные и одну контрольную. Животные первой опытной группы (6 мышей) получали ежедневно перорально Линарол, в дозе 50 мг/кг массы тела; животные второй опытной группы (5 мышей) - изониазид, в дозе 50 мг/кг массы тела; животные контрольной группы (5 мышей) – растворитель (дистиллированную воду). Предварительно всех животных заражали внутривенным введением *M. tuberculosis* штамма H37Rv в латеральную хвостовую вену в летальной дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь.

Испытуемые препараты вводили через неделю после заражения, ежедневно, внутрижелудочно, с помощью металлического зонда с оливой, в течение 5 суток, предварительно растворив их в дистиллированной воде. Объем вводимых препаратов составлял 0,5 мл/мышь.

Через 14 суток после инфицирования животных опытных и контрольной групп выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации для определения количества колониеобразующих единиц (КОЕ) *M. tuberculosis* в легких и селезенке мышей (таблица 10).

Таблица 10 - Количество КОЕ МБТ в легком и селезенке мышей через 14 суток после инфицирования в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь

Группы животных	КОЕ МБТ (легкое)	КОЕ МБТ (селезенка)
Линарол (50 мг/кг)	$(2,3 \pm 0,46) \times 10^{7*}$	$(3,73 \pm 0,23) \times 10^{7*}$
Изониазид (50 мг/кг)	$(2,7 \pm 1,5) \times 10^{5*}$	$(1,075 \pm 0,25) \times 10^{7*}$
Контрольная	$(6,99 \pm 0,9) \times 10^7$	$(3,99 \pm 0,29) \times 10^8$

Примечание: \* -  $p \leq 0,06$ .

Представленные в таблице 10 данные показывают, что по сравнению с контрольной группой, количество КОЕ микобактерий туберкулеза в легком у мышей, получавших Линарол, уменьшилось примерно в 3,5 раза. В селезенке этой группы мышей, количество КОЕ микобактерий по сравнению с контрольной группой, сократилось в 10 раз. В группе мышей, получавших изониазид, КОЕ МБТ в легком сократилось более чем в 100 раз, а в селезенке более чем в 10 раз.

На основании полученных данных можно заключить, что препарат Линарол обладает противотуберкулезной активностью, в отношении *M. tuberculosis* штамма H37Rv, которая в исследуемой дозе при краткосрочном введении была в 100 раз ниже в легком экспериментальных животных, чем препарата стандарта изониазид в аналогичной дозе и сроках введения. В селезенке противотуберкулезная активность Линарола и препарата стандарта изониазид была практически одинаковой.

## 2.9 Изучение противотуберкулезной активности Линарола Ф-1 in vivo

### 2.9.1 Изучение терапевтической противотуберкулезной активности Линарола Ф-1 на экспериментальной модели туберкулеза

Для проведения опыта морские свинки были разделены на пять групп: две опытные (зараженные животные получали лечение Линаролом Ф-1 в дозах 5 и 10 мг/кг массы тела) и три контрольные (зараженные животные, получавшие изониазид в дозе 10 мг/кг массы тела; зараженные животные, не получавшие никакого лечения; интактные животные).

Морских свинок двух опытных и двух контрольных групп заражали 0,01 мг культуры *M. bovis* (штамм 14). Лечение животных начиналось через две недели после их заражения и продолжалось 60 суток, при ежедневном пероральном введении препаратов (Линарола Ф-1 и изониазида), растворенных в дистиллированной воде (таблица 11).

Таблица 11 - Результаты испытания терапевтической активности Линарола Ф-1 при экспериментальном туберкулезе морских свинок

Группы животных	Препарат	Суточная доза, мг/кг	Исход		Средний индекс поражения органов и высеваемости микобактерий
			погибло	выжило	
I	Линарол Ф-1	10	0	7	0,3 <sup>1</sup> /0 <sup>2</sup>
II	Линарол Ф-1	5	0	7	1,6/1,2
III	Изониазид	10	0	7	0,3/0
IV	Контроль (зараженные)	-	5	2	9,7/6,7
V	Контроль (интактные)	-	0	7	0/0

Примечание: <sup>1</sup> – индекс поражения органов;  
<sup>2</sup> – индекс высеваемости микобактерий.

По окончании лечения животных подвергали эвтаназии, после чего проводили макроскопическое исследование патологического материала и определяли индекс поражения органов и высеваемости микобактерий. В четвертой контрольной группе (не леченые животные) в течение двух месяцев от генерализованного туберкулеза погибло 5 морских свинок. Средний общий индекс поражения и высеваемости микобактерий на одну морскую свинку составил 9,7/6,7.

У животных первой опытной (Линарол Ф-1 в дозе 10 мг/кг) и третьей контрольной (изониазид в дозе 10 мг/кг) групп макроскопических туберкулезных поражений в легких, печени, селезенке не было выявлено. Средний общий индекс поражения и высеваемости микобактерий на одну морскую свинку в этих группах составил 0,3/0.

На вскрытии у животных второй опытной группы, леченых Линаролом Ф-1 в дозе 5 мг/кг массы тела, макроскопически были выявлены единичные туберкулезные изменения в регионарных лимфатических узлах, печени и селезенке. Средний общий индекс поражения и высеваемости микобактерий на одну морскую свинку во второй опытной группе составил 1,6/1,2.

В результате проведенных исследований установлено высокое терапевтическое действие Линарола Ф-1 в дозе 10 мг/кг массы тела, т.к. индекс поражения внутренних органов и высеваемости микобактерий равен таковому при лечении животных туберкулостатиком первого ряда - изониазидом.

### 2.9.2 Влияние Линарола Ф-1 на гематологические и биохимические показатели крови морских свинок при лечении экспериментального туберкулеза

Для проведения опыта использовали животных, находящихся в опыте по изучению терапевтической противотуберкулезной активности Линарола Ф-1. Результаты исследования сравнивали с показателями животных 5-ой контрольной группы (таблица 12).



Таблица 12 - Гематологические показатели крови зараженных микобактериями туберкулеза морских свинок на 60 сутки после терапии Линаролом Ф-1

Показатели	Контроль (интактные)	Линарол Ф-1 (10 мг/кг)	Линарол Ф-1 (5 мг/кг)
Эритроциты ( $\times 10^{12}/л$ )	4,61 $\pm$ 0,02	4,47 $\pm$ 0,34	4,29 $\pm$ 0,14
Гемоглобин (г/л)	132 $\pm$ 8,49	137 $\pm$ 9,12	133 $\pm$ 9,02
СОЭ (мм/ч)	13 $\pm$ 7,45	7,42 $\pm$ 0,84	5,3 $\pm$ 0,91
Лейкоциты ( $\times 10^9/л$ )	4,12 $\pm$ 0,5	5,44 $\pm$ 0,71	7,05 $\pm$ 0,51**
Базофилы (%)	0,8 $\pm$ 0,12	0,64 $\pm$ 0,45	0,8 $\pm$ 0,2
Эозинофилы (%)	2,2 $\pm$ 0,39	2,21 $\pm$ 0,49	2,8 $\pm$ 0,58
Палочкоядерные (%)	1,44 $\pm$ 0,17	0,9 $\pm$ 0,001	0,46 $\pm$ 0,07*
Сегментоядерные (%)	15 $\pm$ 1,94	20,64 $\pm$ 5,89	32,75 $\pm$ 3,43*
Лимфоциты (%)	74,1 $\pm$ 1,49	68,91 $\pm$ 6,03	57,4 $\pm$ 3,73**
Моноциты (%)	6,46 $\pm$ 1,28	6,68 $\pm$ 1,03	5,82 $\pm$ 0,74

Примечание: \* -  $p \leq 0,01$ , \*\* -  $p \leq 0,001$ .

Из таблицы видно, что введение Линарола Ф-1 в дозе 10 мг/кг массы тела сопровождалось менее значимыми изменениями по содержанию количества эритроцитов, уровня гемоглобина и недостоверным снижением показателя СОЭ по отношению к аналогичным значениям животных контрольной группы. Лейкоцитарная формула также была не достоверно различима между сравниваемыми группами. В то же время, при использовании препарата в дозе 5 мг/кг массы, установлены выраженный лейкоцитоз и увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов более, чем в 2 раза при  $p \leq 0,001$ , лимфоцитопению ( $p \leq 0,001$ ) и снижение количества незрелых форм нейтрофилов при  $p \leq 0,01$ .

При изучении биохимических показателей крови животных опытных групп установлено, что нормализация количества альбумина и восстановление нормального альбумино-глобулинового соотношения в группе животных, леченных Линаролом Ф-1 в дозе 10 мг/кг массы тела, значительно опережала таковое в группе животных, леченных препаратом в дозе 5 мг/кг массы. В группах животных, где проводилась терапия противотуберкулезными препаратами (изониазид и Линарол) концентрации мочевины в сыворотке крови достоверно не менялись. Линарол в дозе 10 мг/кг массы тела не оказывал токсического действия на почки и поджелудочную железу. Достоверного изменения количества общего билирубина не наблюдалась.

## 2.10 Изучение профилактической противотуберкулезной активности Тубофена в производственных условиях

Опыт поставлен в условия хозяйства Агрофирма «Теньковская», филиала «Большие Салтыки» Камско-Устьинского района Республики Татарстан. На момент эксперимента хозяйство являлось неблагополучным по туберкулезу крупного рогатого скота.

Наблюдения проводились над 52 телятами в возрасте от 3 до 7 дней полученных от реагирующих на туберкулин коров. Телята были разделены на 4

группы: 3 опытные и одну контрольную, по 13 голов в каждой. Телята первой группы получали Тубофен в дозе 5 мг/кг массы, телята второй группы – Тубофен в дозе 10 мг/кг массы, телята третьей группы изониазид в дозе – 10 мг/кг массы и телята 4-ой контрольной группы – физиологический раствор. Препараты задавали перорально, групповым методом, в течение 60 дней, в смеси с молоком. По результатам контрольного взвешивания животных, один раз в 2 недели проводили коррекцию дозы препаратов. В течение 2-х месяцев за животными вели клиническое наблюдение и ежемесячно исследовали аллергическим методом на туберкулез.

Результаты аллергических исследований показали, что в течение 2-х месяцев применения различных доз Тубофена и изониазида ни одно животное из опытных групп не реагировало на введение туберкулина. Отрицательная реакция на введения туберкулина, также отмечалась и в контрольной группе.

По истечению всего курса химиофилактики (60 дней) произвели контрольный убой пяти телят из каждой группы, при этом во внутренних органах и тканях животных опытных и контрольной групп изменений, характерных для туберкулеза, не обнаружено.

Результаты лабораторного исследования противотуберкулезной эффективности Тубофена и изониазида у телят длительно неблагополучного по туберкулезу хозяйства показали, что при проведении бактериоскопических и гистологических исследований не удалось выделить микобактерии туберкулеза ни в опытных, ни контрольной группах. Однако при проведении бактериологического исследования и проведении биологической пробы на морских свинках, у трех телят из контрольной группы была выделена культура микобактерий туберкулеза бычьего вида.

Таким образом, применение Тубофена, как химиофилактического средства в комплексе оздоровительных мероприятий, позволило в опытных группах вырастить свободных от возбудителя туберкулеза, здоровых телят.

## **2.11 Изучение профилактической противотуберкулезной активности Линарала в производственных условиях**

Опыт поставлен в условиях хозяйств ООО СХП «Золотой Колос» МТФ «Сокуры» Лаишевского муниципального района и ООО «Агроспецстрой» МТФ «Монашево» Менделеевского муниципального района Республики Татарстан. На период испытаний хозяйства являлись неблагополучными по туберкулезу крупного рогатого скота. В опыте находилось 28 телят в возрасте от 3 до 10 дней, которых отбирали по принципу аналогов как от реагирующих на туберкулин коров, так и от не реагирующих (условно здоровых) животных.

В ООО СХП «Золотой Колос», МТФ «Сокуры» опыты проведены на 18 телятах, которые по принципу аналогов были сформированы в 3 группы, по 6 голов в каждой. Животным первой опытной группы групповым методом в смеси с молоком в течение 60 дней задавали перорально Линарол в дозе 10 мг/кг, второй – Линарол в дозе 5 мг/кг массы. Телята контрольной группы получали в аналогичных дозах физиологический раствор.

В ООО «Агроспецстрой» опыты проведены на 10 телятах, которые по принципу аналогов были сформированы в 2 группы, по 5 голов в каждой.

Животным опытной группы групповым методом в смеси с молоком в течение 60 дней задавали перорально Линарол в дозе 10 мг/кг массы тела. Телята контрольной группы получали в аналогичных дозах физиологический раствор. Ход эксперимента, был построен по аналогии с опытом по изучению противотуберкулезной активности Тубофена в производственных условиях (раздел 2.10).

Результаты аллергических исследований телят показали, что через месяц ни одно животное из опытных и контрольных групп на введение туберкулина не реагировало. При проведении аллергического исследования через 2 месяца, после начала эксперимента, реакция на туберкулин отмечалась у 2 телят контрольной группы в хозяйстве «Золотой Колос» и у 1 теленка контрольной группы в хозяйстве «Агороспецстрой». Животные опытных групп на введение туберкулина не реагировали.

По истечении курса химиопрофилактики (60 дней) провели контрольно - диагностический убой телят из каждой группы. Установлено, что при контрольно-диагностическом убое (2 телят из каждой группы в МТФ «Сокуры» и 3 телят из каждой группы в МТФ «Монашево») во внутренних органах и тканях животных опытных и контрольных групп изменений, характерных для туберкулеза, не обнаружено. В результате проведенных лабораторных исследований патологического материала, взятого от убитых животных, у двух телят из контрольной группы МТФ «Сокуры» и 1 животного из контрольной группы в МТФ «Монашево» была выделена культура микобактерий туберкулеза бычьего вида.

Таким образом, применение Линарола по описанной схеме в комплексе оздоровительных мероприятий позволило в опытных группах вырастить свободных от возбудителя туберкулеза, здоровых телят. В контрольных группах животных, не подвергавшихся курсу химиопрофилактики Линаролом, инфицированность поголовья молодняка крупного рогатого скота была в пределах от 20 до 30%.

## **2.12 Изучение профилактической противотуберкулезной активности Линарола Ф-1 в производственных условиях**

Опыты по изучению профилактической противотуберкулезной активности Линарола Ф-1 проведены в условиях трех хозяйств: ООО «Агроспецстрой» МТФ «Монашево» Менделеевского муниципального района РТ, ОАО «Красный Восток-Агро» ЖК «Челны» Алькеевского муниципального района РТ и ООО «Черемшан Агроуслуги», МТФ «Туймет» Черемшанского муниципального района РТ. На период испытаний вышеперечисленные хозяйства являлись неблагополучными по туберкулезу крупного рогатого скота.

В опыте находилось 49 телят в возрасте от 3 до 12 дней, которых отбирали по принципу аналогов как от реагирующих, так и от не реагирующих на туберкулин коров, неблагополучного по туберкулезу стада (таблица 13).

Ход эксперимента, был построен по аналогии с опытом по изучению противотуберкулезной активности Тубофена в производственных условиях (глава 2.10). Результаты аллергических исследований на 30 сутки исследования показали, что ни одно животное опытных и контрольных групп на введение туберкулина не реагировало. При проведении аллергического исследования через 2 месяца после

начала эксперимента реакция на туберкулин отмечалась у одного теленка контрольной группы в сельскохозяйственном предприятии «Агороспецстрой» и у трех животных контрольной группы в хозяйстве «Черемшан-Агроуслуги». Животные опытных и одной контрольной группы в ООО «Красный Восток-Агро» на введение туберкулина не реагировали.

По окончании курса химиопрофилактики (60 суток) по три теленка из каждой группы были подвергнуты контрольно-диагностическому убою, полученный патологический материал подвергнут лабораторным исследованиям.

Таблица 13 - Производственные испытания Линарола Ф-1

Название хозяйства	Группы животных	Линарол Ф-1, мг/кг	Количество телят в группе
ООО «Агороспецстрой» МТФ «Монашево»	1 опытная	10	5
	2 опытная	5	5
	контрольная	-	5
ОАО «Красный Восток-Агро» ЖК «Челны»	1 опытная	10	6
	2 опытная	5	6
	контрольная	-	6
ООО «Черемшан Агроуслуги» МТФ «Туймет»	опытная	10	8
	контрольная	-	8

Установлено, что при контрольно-диагностическом убое животных опытных и контрольной групп во внутренних органах и тканях изменений, характерных для туберкулеза, не обнаружено. При гистологическом исследовании патологического материала первоначальное формирование туберкулезных узелков отмечали только в бронхиальных лимфатических узлах, полученных от теленка контрольной группы из ООО «Агороспецстрой».

В результате проведенных лабораторных исследований культура микобактерий туберкулеза бычьего вида была выделена у одного теленка из контрольной группы в МТФ «Монашево», у двух телят из контрольной группы ЖК «Челны» и у одного из трех телят контрольной группы в МТФ «Туймет».

Таким образом, в результате проведенных исследований, установлено, что пероральное введение Линарола Ф-1, телятам, в течение молочного периода, в дозе 5 и 10 мг/кг массы тела, обеспечивает 100% защиту их от инфицирования микобактериями туберкулеза и позволяет провести гарантированное выращивание на внутривладельческих фермах здоровых животных, полученных от коров неблагополучных стад, в том числе и от больных туберкулезом.

### 3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Туберкулез крупного рогатого скота в Республике Татарстан носит стационарный характер, линия многолетнего тренда имеет тенденцию к нарастанию:

- за 40 лет (1960-2000 годы) было оздоровлено 726 неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота пунктов;
- в период с 2000 по 2016 годы выявлено 45 новых эпизоотических очагов в 16 из 43 районов республики;
- большая часть неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота пунктов регистрируется на юге республики, в центральной же части – их немного и располагаются они разрозненно;
- в районах Предволжья и Предкамья инфекция протекает в виде энзоотии или проявляется спорадически;
- более интенсивное по широте охвата поголовья и количеству неблагополучных пунктов течение эпизоотического процесса наблюдается в районах Заволжья и Закамья, именно здесь ранее имелись стационарные неблагополучные пункты и, как правило, в оздоровленных от туберкулеза хозяйствах через 3-5 лет вновь регистрировались рецидивы болезни.

2. Соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты с гидразидом изоникотиновой кислоты (Тубофен), 45 химических соединений относящихся к изоциануратам, 3 соединения относящиеся к триазидам и 34 соединения относящиеся к  $\alpha,\omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканам обладают выраженными бактериостатическими свойствами в отношении микобактерий туберкулеза штамма H37Rv и оказывают свое ингибирующее действие в концентрациях от 0,075 до 50 мкг/мл среды.

3. В результате комплексных испытаний туберкулостатической активности исследуемых синтетических препаратов из каждой группы выбраны наиболее эффективные в отношении микобактерий туберкулеза «соединения – лидеры»: Тубофен (соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты с гидразидом изоникотиновой кислоты) с МИК – 0,075 мкг/мл среды; Линарол (1-5-(карбазоилметилсульфинил)-пентил)-3,5-диметилизоцианурат) с МИК – 0,1 мкг/мл среды; Аликон (2,4-диамино-6-(карбамоилметилсульфинил-метил)-1,3,5-триазин) с МИК – 0,1 мкг/мл среды и Линарол Ф-1 (1,4-бис(амидометилсульфинил)бутан) с МИК – 0,3 мкг/мл среды.

4. Химические соединения Линарол, Аликон и Линарол Ф-1 проявили выраженное бактериостатическое действие на микобактерии туберкулеза референтных штаммов H37Rv, M. bovis 14 и культуру клинического штамма микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в концентрациях 10 мкг/мл среды. Тубофен в концентрации 10 мкг/мл среды проявил бактериостатическое действие лишь в отношении референтных штаммов, культура клинического штамма с множественной лекарственной устойчивостью оказалась резистентной к данному препарату в исследованной дозе.

5. Тубофен, Линарол, Аликон и Линарол Ф-1 в концентрациях 5,0; 2,5; 1,25 и 0,6 мкг/мл среды обладают избирательным антибактериальным действием лишь в отношении микобактерий туберкулеза и не проявили выраженного

антибактериального и фунгистатического действия на тестируемые культуры (*Staphylococcus aureus* 209p, *Escherichia coli* F-50, *Bacillus cereus* 8035, *Candida albicans* 855-653, *Trichophyton mentagrophytes* - 1773, *Aspergillus niger* ВКМФ-1119).

6. Химиофилактические туберкулостатические препараты: Тубофен, Линарол, Аликон и Линарол Ф-1 являются малотоксичными соединениями, не обладают кумулятивным, эмбриотоксическим, тератогенным и местно-раздражающим действиями. Длительное (в течение 30-60 суток) их введение лабораторным животным в дозе 10 мг/кг массы тела не влияло на изменение гематологических и биохимических показателей крови. Однако препарат Аликон оказался бесперспективным для дальнейших исследований в связи с трудностью его синтеза в промышленных масштабах и дороговизной исходных реактивов, а также плохой растворимостью в воде, что ухудшает его биодоступность.

7. При экспериментальном туберкулезе морских свинок Тубофен и Линарол проявляют высокий химиофилактический эффект и в дозах 10 мг/кг массы предотвращают развитие в тканях и органах структурных изменений, характерных для туберкулезного процесса. Пероральное применение Тубофена и Линарола в течение 2-х месяцев, в сравнении с изониазидом, не вызывает развития токсической гепатоцеллюлярной патологии, деструктивных васкулитов и не угнетает лимфопролиферативные процессы в селезенке.

8. Туберкулостатический препарат Линарол Ф-1 в дозе 10 мг/кг массы тела животного обладает высокой терапевтической активностью при лечении экспериментального туберкулеза у морских свинок в течение 60 суток. Препарат Линарол также проявил противотуберкулезную терапевтическую активность в отношении микобактерий туберкулеза, однако эта активность на два порядка меньше в тканях легкого экспериментальных животных ( $(2,3 \pm 0,46) \times 10^7$  КОЕ МБТ), чем у препарата изониазид в аналогичной дозе и сроках введения ( $(2,7 \pm 1,5) \times 10^5$  КОЕ МБТ). В тканях селезенки противотуберкулезная активность Линарола и препарата изониазид была практически одинаковой.

9. Пероральное назначение Тубофена, Линарола и Линарола Ф-1 телятам, полученных от коров неблагополучных стад, в молочный период в дозе 10 мг/кг массы тела, обеспечивает 100% защиту от развития у них инфекционного процесса, вызванного микобактериями туберкулеза, и позволяет провести гарантированное выращивание на таких фермах здоровых животных.

10. Наиболее перспективным (из тестируемых химических соединений) оказался Линарол Ф-1, который наряду с низкой токсичностью, обладает выраженными туберкулостатическими свойствами, в том числе и по отношению к микобактериям туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, протективными свойствами для телят молочного периода развития, что позволяет профилактировать болезнь и в более поздние сроки, а также переход скрытой инфекции в тяжелые формы заболевания.

11. Разработанный комплексный метод химиофилактики туберкулеза у телят молочного периода с использованием синтезированных препаратов, позволяет обеспечить их защиту от туберкулеза и способствует оздоровлению длительно неблагополучных хозяйств.

## ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Инструкция по применению нового противотуберкулезного средства «Линарол» в ветеринарии (в порядке производственных испытаний), утвержденное Главным управлением ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан от 18 июня 2010 года;

2. Временные ветеринарные правила по применению нового противотуберкулезного средства «Линарол Ф-1» в ветеринарии (в порядке производственных испытаний), утвержденные Главным управлением ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан от 8 декабря 2015 года.

Полученные результаты исследований необходимо учитывать при оздоровлении неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйств. В качестве средств химиопрофилактики туберкулеза у телят, рекомендуется применять туберкулостатические препараты (Тубофен, Линарол, Линарол Ф-1) перорально, групповым методом, в дозе 10 мг/кг массы тела, в течение молочного периода развития, с первого дня после рождения (60 суток).

Основные положения и выводы диссертации предлагаем использовать в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно - практических занятий в профильных ВУЗах, при написании соответствующих разделов учебных и справочных руководств и пособий по инфекционной патологии животных.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. **Мингалеев, Д.Н.** Определение острой токсичности, изучение кумулятивных и местно-раздражающих свойств нового противотуберкулезного препарата – Линарола / Д.Н. Мингалеев, Р.В. Честнова, Н.И. Садыков // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2010. – Т.201. – С. 266 – 271.
2. **Мингалеев, Д.Н.** Профилактика туберкулеза у молодняка крупного рогатого скота в длительно неблагополучном по данному заболеванию хозяйстве / Д.Н. Мингалеев // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2010. – Т.204. – С. 155 – 159.
3. **Мингалеев, Д.Н.** Возможности ускоренного определения бактериостатической активности некоторых химических соединений в отношении *M. tuberculosis* с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT-960 / Д.Н. Мингалеев, Р.Ш. Валиев, Р.В. Честнова, Н.И. Садыков // Туберкулез и болезни легких. - 2011. - №5. - С. 46 – 47.
4. **Мингалеев, Д.Н.** Изучение профилактической активности нового противотуберкулезного препарата Линарола в опытах на морских свинках / Д.Н. Мингалеев, Р.Ш. Валиев, С.Г. Фаттахов, М.М. Шулаева // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т.205. – С. 140 – 145.
5. **Мингалеев, Д.Н.** Сравнительное изучение некоторых свойств нового противотуберкулезного препарата – Линарола и туберкулостатика первого ряда

- изониазида / Д.Н. Мингалеев, Р.Ш. Валиев, Р.В. Честнова, Н.И. Садыков // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т.207. – С. 335 – 340.
6. **Мингалеев, Д.Н.** Изучение чувствительности различных штаммов микобактерий туберкулеза к новым туберкулостатикам / Д.Н. Мингалеев, Р.В. Честнова, Р.А. Хамзин, Н.И. Садыков // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т.211. – С. 108 – 113.
  7. **Мингалеев, Д.Н.** Изучение эмбриотоксических и тератогенных свойств нового противотуберкулёзного препарата – Линарол Ф-1 на белых крысах / Д.Н. Мингалеев, С.Г. Фаттахов, М.М. Шулаева, М.Я. Трemasов // Ветеринарный врач. - 2012. - №4. - С. 13 – 16.
  8. **Мингалеев, Д.Н.** Гематологические и биохимические показатели у белых крыс после длительного применения нового туберкулостатика – Линарол / Д.Н. Мингалеев, М.С. Лосева, Р.Ш. Валиев, М.М. Шулаева // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т.213. – С. 139 – 143.
  9. **Мингалеев, Д.Н.** Патоморфологическое изучение профилактического действия туберкулостатика – Линарола / Д.Н. Мингалеев, Н.И. Садыков // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т.216. – С. 205 – 210.
  10. **Мингалеев, Д.Н.** Усовершенствование специфической профилактики и диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Д.Н. Мингалеев, Р.А. Хамзин, В.Г. Ощепков, Н.Н. Кощев // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т.215. – С. 276 – 281.
  11. **Мингалеев, Д.Н.** Химиопрофилактика туберкулеза у телят молочного периода с использованием Линарола / Д.Н. Мингалеев, Р.А. Хамзин // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т.218. – С. 171 – 176.
  12. Шулаева, М.М. Синтез и антимиkobактериальная активность некоторых производных бензил- и метилизоциануратов / М.М. Шулаева, С.Г. Фаттахов, **Д.Н. Мингалеев** и др. // Известия Академии наук. – 2015. - №9. – С.2215 – 2222.
  13. **Мингалеев, Д.Н.** Изучение терапевтической активности нового противотуберкулёзного препарата – Линарола / Д.Н. Мингалеев // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2017. – Т.229 (1). – С. 24 – 27.
  14. **Мингалеев, Д.Н.** Изучение фармакокинетики противотуберкулёзного препарата Линарол Ф-1 / Д.Н. Мингалеев, М.М. Шулаева, Н.М. Василевский, А.М. Идрисов // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. - 2017. - №4. – С. 46 – 53.
  15. **Мингалеев, Д.Н.** Изучение бактериостатической активности  $\alpha$ ,  $\omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканов в отношении микобактерий туберкулеза штамма H37Rv / Д.Н. Мингалеев, К.А. Турилина, М.М. Шулаева //



Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2017. – Т.230. – С. 149 – 152.

### Статьи, в научных изданиях, входящих в базу данных Scopus

16. Shulaeva M.M., Fattakhov S.G., **Mingaleev D.N.** et al. Sintesis and antimycobacterial activity of novel 1,3-dimethylisocyanurate derivatives // European Journal of Medicinal Chemistry. – 53. - 2012. – P. 300-307.

### Патенты и инструкции

17. Патент на изобретение № 2281939 «Соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты с гидрозидом изоникотиновой кислоты (тубофен) обладающая противотуберкулезным действием, и способ ее получения» / С.Г. Фаттахов, **Д.Н. Мингалеев**, М.А. Сафин, В.С. Резник, И.Н. Залялов, М.Я. Тремасов, А.И. Коновалов, А.А. Визель; заявка 2005108467, 25.03.2005; опубликовано 20.08.2006, Бюл. 23. – 13 с.
18. Патент на изобретение № 2424235 «Изоцианураты, обладающие противотуберкулезной активностью» / С.Г. Фаттахов, Р.Ш. Валиев, М.М. Шулаева, Л.Ф. Сайфина, Р.В. Честнова, **Д.Н. Мингалеев**, М.Я. Тремасов, М.А. Сафин, В.С. Резник, О.Г. Синяшин; заявка 2009148531, 25.12.2009; опубликовано 20.07.2011, Бюл. 20. – 57 с.
19. Патент на изобретение № 2431633 «Триазины, обладающие противотуберкулезной активностью» / С.Г. Фаттахов, Р.Ш. Валиев, М.М. Шулаева, Л.Ф. Сайфина, Р.В. Честнова, **Д.Н. Мингалеев**, М.Я. Тремасов, Р.Х. Равилов, В.С. Резник; заявка 2010125483, 26.06.2010; опубликовано 20.10.2011, Бюл. 29. – 10 с.
20. Патент на изобретение № 2591256 « $\alpha$ ,  $\omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканы, обладающие противотуберкулезной активностью, и  $\alpha$ ,  $\omega$  – бис(метоксикарбонилметилсульфинил или сульфонил)алканы для их получения» / С.Г. Фаттахов, М.М. Шулаева, М.А. Кравченко, **Д.Н. Мингалеев**, С.Н. Скорняков, О.Г. Синяшин; заявка 2015101008, 12.01.2015; опубликовано 20.07.2016, Бюл. 20. – 16 с.
21. Инструкция по применению нового противотуберкулезного средства «Линарол» в ветеринарии (в порядке производственных испытаний) / **Д.Н. Мингалеев**, С.Г. Фаттахов, М.М. Шулаева. - Главное управление ветеринарии КМ РТ. – Казань, 2010. – 2 с.
22. Временные ветеринарные правила по применению нового противотуберкулезного средства «Линарол Ф-1» в ветеринарии **Д.Н. Мингалеев**, Р.Х. Равилов, С.Г. Фаттахов, М.М. Шулаева. - Главное управление ветеринарии КМ РТ. – Казань, 2015. – 2 с.

### Монографии

1. Сафин, М.А. Современные методы диагностики и меры борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота / М.А. Сафин, Г.З. Идрисов, **Д.Н. Мингалеев** // Казань, 2010. – 117 с.
2. Сафина, Ч.М. Туберкулез у собак и кошек и меры борьбы с ним / Ч.М. Сафина, **Д.Н. Мингалеев**, Р.А. Хамзин // Казань, 2012. – 105 с.

**Публикации в других изданиях**

1. **Мингалеев, Д.Н.** Изучение свойств новых противотуберкулезных препаратов / Д.Н. Мингалеев, Р.В. Честнова, Н.И. Садыков // Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2009. – Вып. 6. – С. 119-121.
2. **Мингалеев, Д.Н.** Ускоренное определение бактериостатической активности химических соединений с помощью системы ВАСТЕК MGIT 960 / Д.Н. Мингалеев, Р.В. Честнова, Н.И. Садыков // Труды Московского международного ветеринарного конгресса. – Москва, 2010. - С. 311-312.
3. **Мингалеев, Д.Н.** Эффективность действия нового противотуберкулезного препарата Линарола на лекарственно устойчивые штаммы микобактерий туберкулеза / Д.Н. Мингалеев, Р.В. Честнова, С.Г. Фаттахов, М.М. Шулаева // Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2010. – Вып. 7. - С. 196-198.
4. Shulaeva M.M., Fattakhov S.G., **Mingaleev D.N.** et al. Synthesis and antimycobacterial activity of isocyanurate derivatives // Antimicrobial Drug Discjvery Conference. – Madrid, Spain. - 2013. – P. 65-66.
5. **Mingaleev D.N.**, Ravilov R.Ch., Trubkin A.I. Application of the new tuberculostatics-Linarol to prevent tuberculosis young cattle under farm // Eastern European Scientific Journal.-Dusseldorf, Germany. - 1-2015.-P. 17-20.
6. **Мингалеев, Д.Н.** Туберкулостатическая активность  $\alpha$ ,  $\omega$  – бис(амидо- и гидразидометилсульфинил- и сульфонил)алканов / Д.Н. Мингалеев, Д.Н. Мингалеев, К.А. Турилина, М.М. Шулаева // Матер. Междунар. научно-практ. конф. «Инновационные решения в ветеринарной медицине, зоотехнии и биотехнологии в интересах развития агропромышленного комплекса». - Казань, 2017. – С.40 – 42.