

48

На правах рукописи

Дрозд

Дроздов Дмитрий Александрович

**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
РОДЕНТИЦИДНОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ
МЕТИЛФЕНАЦИНА**

16 00 04 – Ветеринарная фармакология с токсикологией

16 00 06 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук



Москва 2007

Работа выполнена в Государственном научном учреждении
Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии,
гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук
(ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии)

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
ДОРОЖКИН Василий Иванович
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

кандидат биологических наук
ПАВЛЕНКО Галина Ивановна
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук, профессор
УРАЗАЕВ Дмитрий Николаевич
(МВА им К И Скрябина)

кандидат ветеринарных наук,
заслуженный ветеринарный врач РФ
КАДИРОВ Адиль Фатулла оглы
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

Ведущая организация. Федеральное государственное учреждение
Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ)

Защита состоится «31» октября 2007 в 10⁰⁰ часов на
Заседании диссертационного совета Д 006 008 01 при Государственном
научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии
сельскохозяйственных наук (123022, Звенигородское шоссе, 5)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного
научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии
сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии)

Автореферат разослан «27» октября 2007г

Ученый секретарь диссертационного совета



Е С Майстренко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Исследования в области борьбы с синантропными грызунами обусловлены необходимостью уменьшения ущерба, наносимого ветеринарным объектам. Мышевидные грызуны являются источником, резервуаром и механическими переносчиками возбудителей зооантропонозных (чума, туляремия, лептоспироз, листериоз, сальмонеллез, трихинеллез) и зоонозных болезней (мелиоидоз, болезнь Ауески, грипп птиц), поедают и загрязняют корма и готовую продукцию, повреждают дорогостоящие устройства, системы и материалы (А.А. Поляков, 1960, В.Г. Зацепин, 1970, 1999, Д.Ф. Траханов, 1973, 1994, И.М. Козлов, 1983, А.Н. Козлов, 1985, 1991, В.С. Пуцят, 1986, А.И. Дроздов, 1997, А.М. Смирнов, 1999, А.Ф. Кадилов, 1999, Ю.М. Артеменков, 2000, В.А. Рыльников, 2007, M. Lund, 1977, R.M. Corrigan, 2001)

Использование комплекса родентицидных средств и инженерно-профилактических методов препятствует распространению грызунов на ветеринарных объектах. Вместе с тем, при регулярном профилактическом проведении дератизации отмечают избегание грызунами приманки (неофобия, аверсия) и появление резистентности к применяемым родентицидам (В.А. Быковский, 1990, Н.В. Бабич, 2005, А.Ф. Кадилов, 2006, В.А. Рыльников, 1992, 2006, С.А. Клементьева, 2006, A.D. MacNicol, 1986)

Истребление грызунов на объектах и профилактика повторных заселений освобожденных зон показывает, что лучших результатов можно добиться при смене дератизационных препаратов. Возникает необходимость изыскания новых соединений для эффективной ротации ассортимента средств борьбы с грызунами с целью предотвращения появления устойчивости (В.Г. Зацепин, 1970, С.Д. Каракотов, 2005, А.Ф. Кадилов, 2007). Необходимость исследований новых родентицидных средств также обусловлена вопросами, связанными с механизмом действия этих веществ и предотвращением развития адаптационных процессов, что оказывает влияние на эффективность родентицидного средства и позволит

прогнозировать физиологическое воздействие на организм грызунов и сельскохозяйственных животных

В этой связи, приобретают значение исследования фармако-токсикологических свойств новых средств борьбы с грызунами, оценка количественной зависимости соотношений общетоксических и специфических эффектов, а также особенностей проявления материальной и функциональной кумуляции в зависимости от режима воздействия

Цель и задачи исследований. Целью исследований явилась разработка родентицидного средства на основе метилфенацина и изучение фармако-токсикологических свойств

Для достижения цели были поставлены следующие задачи

- Разработка препаративной формы метилфенацин-0,75%, выбранного на основании результатов скрининговых исследований индан-1,3-дионовых соединений
- Изучение фармако-токсикологических свойств метилфенацина-0,75%
- Разработка методов определения метилфенацина-0,75% в препаративной форме и биологических субстратах (кормах)
- Испытание метилфенацина-0,75% в производственных условиях

Научная новизна. Разработано родентицидное средство, представляющее собой 0,75%-ный раствор метилфенацина в полиэтиленгликоле с горечью (битрекс), окрашенное водным раствором красителя

Метилфенацин-0,75% позволяет проводить дератизацию с подбором оптимальной пищевой основы и возможностью приготовления разнообразных форм (зерновые приманки, липкие массы и др)

Изучены фармако-токсикологические свойства метилфенацина-0,75% определены параметры токсичности, пороги острого и хронического действия, кожно-оральный коэффициент Изучено раздражающее, аллергическое и кожно-резорбтивное действие препарата Определена

эффективность действия метилфенацина-0,75%, разработаны режимы применения

Практическая ценность работы.

Разработано родентицидное средство на основе метилфенацина в виде концентрата

Установлены режимы и принципы обработки, позволившие получить эффективность дератизации не менее 95%

Разработаны технические условия и инструкция по применению препарата метилфенацин-0,75%

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на

- V международной научной конференции молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» (г Москва, 2006)
- VI Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2006» (г Самара, 2006)
- Заседании Ученого Совета ВНИИВСГЭ (2005-2007)
- Межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (08 06 2007)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ

Основные положения, выносимые на защиту

- Разработка родентицидного средства метилфенацин-0,75%
- Результаты фармако-токсикологических исследований метилфенацина-0,75% в опытах на лабораторных и сельскохозяйственных животных
- Результаты испытания эффективности действия метилфенацина-0,75%

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка используемой литературы и приложения

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы, 13 рисунков. Список литературы включает 212 источников отечественных и зарубежных авторов

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Экспериментальные исследования для решения поставленных задач проводились в лаборатории токсикологии и санитарии кормов и виварии ВНИИВСГЭ, производственной базе научно-производственного предприятия «Аратамус», свиногомплекса «Шувалово», на кафедре инфекционных и паразитарных болезней МГУПБ и химической лаборатории «Щелково-Агрохим» в период 2004-2007 гг

В опытах использовано шесть видов животных 450 лабораторных крыс, 30 белых мышей, 12 морских свинок и 12 кроликов, 12 кур-несушек и 9 свиней крупной белой породы Исходный вес животных колебался в пределах для крыс – 250 - 280 г, для мышей – 22-25 г, для кроликов – 2700 – 3000 г, для кур – 1700 - 2000 г, для свиней – 300-310 кг

В опыг брали клинически здоровых животных, которые предварительно выдерживались на 14-дневном карантине (ПП Сахаров, 1952, Н Харламова, 1993, С М Ланг, 1993)

Статистические группы состояли из 6 – 10 животных

Исследования проводились в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке эффективности, токсичности и опасности родентицидов» (1995), Положением о порядке токсиколого-гигиенической экспертизы и гигиенических исследований, проводимых с целью регистрации ветеринарных препаратов в РФ, «Методическими рекомендациями по токсикометрии» (1987)

Изучение острой токсичности метилфенацина-0,75% и способности *кумуляировать* в организме проводилось в условиях введения препарата в желудок, а также в условиях нанесения препарата на кожу

Токсичность средства определяли на 30 белых крысах Полученные данные использовались для определения параметров смертельного эффекта – DL_{16} , DL_{50} и DL_{84} по методу Кербера в модификации В Б Прозоровского (пробит-анализ) (В Б Прозоровский, 1965)

Для изучения кумулятивных свойств препарата метилфенацин-0,75%, использовали метод Ю С Кагана и В В Станкевича (1964) и метод Lim et al (1961)

Кожно-резорбтивное действие изучалось в опыте на 12 белых мышах, а также на белых крысах. Учитывались клиническая картина интоксикации, масса тела, ректальная температура и морфологический состав крови.

Изучение раздражающего и аллергического действия препарата на кожу проводилось на 12 кроликах породы «Шиншилла» (О Г Алексеева, 1970).

Исследовали раздражающее действие препарата на слизистые оболочки глаз кроликов (А Majda, 1973).

Эксперименты проводили в условиях подострого и субхронического воздействия препарата, оценивали изменения интегральных и специфических показателей.

В качестве *интегральных* показателей были взяты масса тела, оценка морфологического состава крови, суммационно-пороговый показатель.

Специфическими считали оценку свертывающей системы крови, функционального состояния печени и почек.

Количество гемоглобина, лейкоцитов и эритроцитов в крови оценивали с помощью общепринятых методик. Протромбиновое время определяли по Квику (И П Кондрахин, 1985, А А Козлов, 2003).

Функциональное состояние центральной нервной системы оценивали по величине суммационно-порогового показателя.

При изучении влияния средства на печень использовались показатели, характеризующие обезвреживающую (сульфгидрильные группы) и белковообразовательную (общий белок) функции органа.

Изучение функционального состояния почек проводилось по комплексу методов измерения диуреза, содержания в моче белка и хлоридов (И П Кондрахин, 1985).

Мутагенную активность изучали методом цитогенетического анализа в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению мутагенной активности ветеринарных препаратов» (1983)

Для проведения гистологических исследований отбирали пробы сердца, легких, печени, селезенки, почек, части тонкого отдела кишечника, фиксировали в 10 %-ном формалине, обезвоживали, заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Г А Меркулов, 1969, И Ф Иванов, 1976)

Апробацию родентицидного средства метилфенацин-0,75% проводили на свиноподкомплексе «Шувалово» в помещениях промышленной зоны № 6 и № 7

Экспериментальные данные обрабатывались статистически, достоверность различий оценивалась по Стьюденту

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Скрининговые исследования индан-1,3-дионовых соединений

Первоначально с целью отбора наиболее эффективного родентицидного соединения проводили изучение 13 образцов вновь синтезированных индан-1,3-дионовых соединений на основе дифенацина (рис 1)

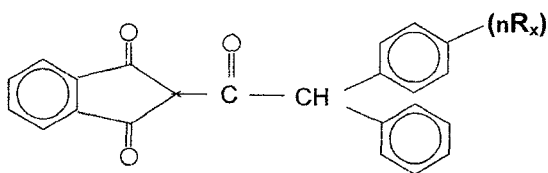


Рис 1 Общая структурная формула изученных индан-1,3-дионовых соединений, где R_x – радикалы, различные по химическому составу (CH₃ – метилфенацин), n – количество радикалов (n = 1 - 3)

Использовался метод аналогового синтеза и сплошного скрининга (Н Н Мельников, 1993) Основным критерием отбора соединений служила эффективность, целесообразность и технологичность при использовании в целях борьбы с синантропными грызунами

Обнаружена зависимость между химическим строением изучаемой группы соединений и токсикологическими свойствами. Наибольшая токсичность в ряду соединений, отмечалась у веществ, имеющих не более 1-адикала в параположении. К ним относятся фториндан, броминдан и метилфенацин с содержанием параизомеров более 90%. Важно отметить, что синтез индан-1,3-дионов проводится по единой технологической схеме. При этом средства одной химической группы обладают схожими показателями, поэтому при обосновании, позволяет уменьшить объем исследований по метрам, уже изученным на аналогичных веществах за счет корреляции характеристик.

В результате проведенных исследований, для создания родентицидного парата был выбран метилфенацин, как наиболее перспективное средство. Одним из параметров, определяющим эффективность родентицидного средства, служила токсичность действующего вещества без учета снижения эффективности за счет инертных соединений.

Приготовление препаративной формы родентицидов

Опыты по разработке родентицидного средства в виде препаративной формы, содержащей метилфенацин, проводились на базе ООО НПП «Атамус»

Опытную партию родентицидного средства изготовили из химического метилфенацина с содержанием действующего вещества 54,0 % суммы индан-1,3-дионов. В качестве растворителя действующего вещества и испытаны растительное масло, полиэтиленгликоль-400, полипропиленгликоль и глицерин.

Учитывали степень растворимости, длительность растворения, температуру нагревания, однородность, отсутствие или наличие осадка.

Наилучшие результаты были получены при использовании полиэтиленгликоля-400. Полученный раствор коричневого цвета, прозрачный, равномерно окрашен по всему объему. Содержание

действующего вещества – 0,75% Выбор концентрации обусловлен рекомендуемым для данной группы содержанием действующего вещества 0,015% - 0,02% в готовой приманке, что достигается добавлением 2,0 % препарата метилфенацина-0,75% к пищевой основе (А Ф Кадилов, 2005) При этом реакции на изменение органолептических характеристик кормов в опытах отмечено не было, что оказывает значительное влияние на поедаемость приманки синантропными грызунами

В соответствии с требованиями «Методических рекомендаций по оценке эффективности, токсичности и опасности родентицидов» (1995) проводили цветовую маркировку родентицидных средств В качестве сигнальной окраски выбран красный цвет, который достигался добавлением пищевого красителя кармуазина Поскольку ПЭГ-400 плохо окрашивается большинством растворителей, в рецептуру при разработке формы было добавлено 20,0 % воды, что позволило использовать водорастворимые красители и способствовало снижению температуры кристаллизации препаративной формы Для предотвращения использования формы не по назначению в препаративную форму добавляли битрекс (горечь)

Таким образом, была получена препаративная форма (в виде концентрата) зооцидного средства с выраженными родентицидными свойствами на основе вновь синтезированного соединения индан-1,3-дионовой группы – метилфенацин-0,75%

Приготовленные формы хранились согласно СП 3 5 3 1129-02 и ежемесячно исследовались на стабильность в течение всего срока хранения Определение действующего вещества в препаративной форме проводили по методике, общей для определения содержания индан-1,3-дионовых соединений в препаративной форме Метод основан на взаимодействии растворенного в диоксане метилфенацина с хлорным железом при этом образуется окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого отражает концентрацию метилфенацина в растворе Оптическую плотность измеряли при помощи фотоколориметра

Токсикологические свойства метилфенамина-0,75%

Изучение острой токсичности метилфенамина-0,75% Проведено изучение биологического действия препарата метилфенамин-0,75% в опытах на разных видах животных белых крысах, мышах, морских свинках, кроликах, свиньях и курах

Среднее время гибели (TE_{50}), которое определялось по результатам острого опыта, составило 7 суток, что позволило уже по данным однократного опыта прогнозировать высокие кумулятивные свойства препарата

Среднелетальная доза препарата при внутрижелудочном введении (DL_{50}) составила 250 мг/кг Патологоанатомические изменения отмечали в печени (анемия), селезенке (гиперплазия фолликулов), кишечнике (катаральное воспаление) В органах и полостях тела крыс кровоизлияния различных видов и размеров

Токсичность метилфенамина-0,75% при нанесении на кожу Токсичность при нанесении на кожу (DL_{50cut}) составила 550 мг/кг, что соответствует III классу опасности

Клиническая картина интоксикации при введении в желудок и нанесении на кожу проявлялась на 4-6 сутки после поступления метилфенамина-0,75% в организм в виде угнетения, взъерошенности шерсти, петехий и гематом Механизм действия метилфенамина схож с действием других родентицидов индан-1,3-дионовой группы, что обусловлено конкурентным ингибированием метилфенамином предшественников витамин К-зависимых факторов свертывания Это приводит к нарушению механизма свертывания крови в связи с высокой скоростью обмена и возникновением дефицита постепенно уменьшающегося количества факторов

Кожно-резорбтивное, раздражающее и аллергическое действие препарата Кожно-оральный коэффициент ($K_{ко}$) составил 2,2, что свидетельствует о выраженной способности препарата проникать через кожу Нанесение 10%-ного раствора метилфенамина-0,75% при 20-кратных аппликациях на кожу

морских свинок не выявило аллергического действия. Покраснения кожи, раздражения, расчесов у животных не наблюдалось

Определение порогов острого действия метилфенацина-0,75%. В опыте испытаны дозы 1/2, 1/10, 1/25 и 1/50 DL₅₀, что соответствует 125, 25, 10 и 5 мг/кг

В результате, в группах животных, 1-кратно получивших метилфенацин в дозах 1/2, 1/10 и 1/25 DL₅₀, наблюдалось достоверное увеличение протромбинового времени, снижение уровня эритроцитов, гемоглобина в крови (табл 1).

Таблица 1

Динамика изменения по интегральным и специфическим показателям у крыс в остром эксперименте

Группы Поступившая доза	Сутки обслед	Нб (г%)	Эритр (млн /мм ³)	Т св, (с)
125 мг/кг (1 / 2 DL ₅₀)	0	11,3±0,1	6,05±0,28	23,7±1,8
	5	10,4±0,36*	5,93±0,08	28±2,1*
	8	9,9±0,6*	5,2±0,1*	33±2,5*
25 мг/кг (1/10 DL ₅₀)	0	11,2±0,28	6,35±0,2	23,5±1,95
	5	11,2±0,25	6,3±0,13	26±1,6*
	8	8,7±0,53*	5,6±0,06*	31±2,8*
Контроль 1 (1/2, 1/10 DL ₅₀)	0	11,2±0,28	6,11±0,18	19,2±1,7
	5	11,5±0,14	6,16±0,16	20,2±1,3
	8	10,6±0,22	5,97±0,06	19,6±0,84
10 мг/кг (1/25 DL ₅₀)	0	11,1±0,23	6,5±0,19	21,5±2,2
	5	10,7±0,29*	6,45±0,28	26,5±1,6*
	8	11,0±0,12	6,0±0,18	25±1,85
5 мг/кг (1/50 DL ₅₀)	0	11,4±0,24	6,4±0,12	21±3,0
	5	11,0±0,5	6,28±0,29	22,5±2,5
	8	11,2±0,28	6,2±0,16	26,0±2,5
Контроль 2 (1/25, 1/50 DL ₅₀)	0	11,2±0,18	6,3±0,22	20,5±1,4
	5	11,4±0,2	6,2±0,24	21,4±0,94
	8	11,5±0,29	6,5±0,3	19,8±1,2

* - при P<0,05

В группе животных, которым вводили метилфенацин-0,75% в количестве 1/50 DL₅₀ в течение 8 суток, достоверных изменений не отмечали ни по одному из учитываемых показателей. На основании данных

исследований порогом острого действия (Lim_{ac}) была определена доза 10 мг/кг ($1/25 DL_{50}$)

Кумулятивные свойства метилфенамина-0,75%. Сравнение выраженности кумулятивных свойств препарата при разных режимах проведено в условиях введения нарастающих доз (метод Lim и др., 1961) и при введении постоянной дозировки по методу Кагана (табл. 2)

Таблица 2
Результаты изучения кумулятивности метилфенамина-0,75%

Группы	Длительность введения (сут.)	Уровень 1-кратного введения (мг/кг)	Σ поступившая доза (мг/кг)	В пересчете на DL_{50}	% гибели животных	K_{cum}
IA	5	1/10	125	0,5 DL_{50}	80,0	< 0,5
IB	8	1/10	250	1,0 DL_{50}	100,0	
IIA	20	1/20	250	1,0 DL_{50}	0,0	-
IIB	30	1/20	375	1,5 DL_{50}	50,0	1,5

Ввиду высокой кумулятивности препарата уже на 5 сутки после начала введения по методу Lim et al., наблюдались характерные для антикоагулянтов признаки отравления. Поэтому часть животных (группа IA), получившая суммарную дозу 125 мг/кг ($1/2 DL_{50}$), перестала получать препарат. Это было вызвано тем, что, как правило, при появлении симптомов клинической интоксикации антикоагулянтными родентицидами, гибель животных наступает на 6-10 сутки. Вторая часть животных продолжала участвовать в опыте 8 дней (группа IB). Причем первоначальная доза была увеличена через 4 дня в 1,5 раза. Суммарно эта группа получила дозу близкую к уровню одной DL_{50} .

Гибель животных отмечали только после прекращения введения. На основании данных, представленных в таблице 2, можно предположить, что DL_{50n} подострого эксперимента менее 125 мг/кг, а значит коэффициент кумуляции (K_{cum}) ($< 125/250$) будет составлять $< 0,5$, что свидетельствует о чрезвычайной степени опасности кумулятивного действия метилфенамина-0,75% при данном режиме воздействия.

Группе ПА, задавали метилфенацин-0,75% по методу Кагана в дозе, составляющей $1/20 \text{ DL}_{50}$ в течение 20 суток, ПВ группе вводили препарат в том же количестве, но в течение 30 суток. III группа служила контролем.

Группа ПА получила суммарно дозу 250 мг/кг, т.е. уровень $1,0 \text{ DL}_{50}$, а группа ПВ - дозу 375 мг/кг (т.е. $1,5 \text{ DL}_{50}$). При этом в ПА-группе не было гибели животных как на протяжении опыта, так и в последующие дни после опыта. В данном случае наблюдалось проявление адаптационных механизмов по отношению к данному режиму воздействия метилфенацина-0,75%.

В группе ПВ гибель животных наступала только на 4-6 сутки после окончания введения препарата и составила 50%, несмотря на то, что суммарная доза в 1,5 раза больше однократной DL_{50} . Таким образом, результаты более длительного воздействия низких доз свидетельствуют о сохранении адаптационных процессов, хотя и в меньшей степени. На это указывает и коэффициент кумуляции, рассчитанный по данным, полученным в этом опыте, который в первом случае составил 0,5, во втором 1,5. Таким образом, выявлена зависимость изменения кумулятивных свойств родентицидного препарата на основе метилфенацина от поступающей дозы и режима поступления в организм белых крыс.

Определение порогов хронического действия метилфенацина-0,75%. В целях определения реакции организма на длительное поступление метилфенацина-0,75% в организм, был проведен субхронический двухмесячный эксперимент (табл. 3). На уровне $1/250$ и $1/500 \text{ DL}_{50}$ наблюдались изменения целого ряда показателей: снижение количества эритроцитов, гемоглобина, сульфгидрильных групп и суммационно-порогового показателя, увеличение времени свертывания крови. На уровне $1/1000 \text{ DL}_{50}$ (0,25 мг/кг) наблюдалось достоверное снижение СПП и повышение белка в моче, увеличение протромбинового времени.

Таблица 3

Динамика изменения по интегральным и специфическим показателям у крыс в
субхроническом эксперименте

Группы	Сутки исслед	Эритро (млн/мкл)	Гемогл (г%)	Протромб время (с)	SH- группы (ммоль/л)	СПП	Белок в моче (мг/л)
1/250 DL ₅₀ (1 мг/кг)	14	5,2±0,21*	9,8±0,21*	38,4±2,2*	11,4±1,2	4,3±0,5	60±3,1*
	28	5,8±0,12	9,4±0,92	33,2±1,5*	11,1±1,3	2,5±0,18*	69±5,7*
	42	6,5±0,11	11,1±0,23*	25,8±1,1	10,3±0,9*	3,7±0,42	41±1,9*
	56	6,0±0,06	11,2±0,34	28,0±1,6*	9,8±1,1*	3,2±0,18*	77±7,8
1/500 DL ₅₀ (0,5 мг/кг)	14	6,1±0,26	10,4±0,16	31,7±2,4*	12,1±0,8	4,0±0,4	83±5,1*
	28	5,8±0,06*	10,3±0,42	33,0±1,7*	10,3±0,9*	3,0±0,36*	75,5±1,1*
	42	6,36±0,23	11,5±0,45	25,0±1,5	12,8±1,1	4,5±0,56	35±10,4
	56	6,15±0,11	11,5±0,34	25,5±2,0	13,9±0,85	3,0±0,36*	94±6,0*
1/1000 DL ₅₀ (0,25 мг/кг)	14	6,1±0,21	10,8±0,11	29,2±2,4*	12,5±1,3	4,0±0,4	62±4,0*
	28	6,35±0,21	10,4±0,17	30,4±1,2*	11,1±0,6	3,6±0,18*	60±3,4*
	42	6,59±0,03	11,0±0,61	23,0±1,7	13,1±0,9	4,0±0,42	89±8,2
	56	5,87±0,13	10,9±0,17	24,5±1,5	14,0±0,8	3,0±0,36*	90±5,2*
1/3500 DL ₅₀ (0,07 мг/кг)	14	6,0±0,28	10,7±0,22	24,8±2,4	13,1±0,9	3,8±0,24	6,0±0,28
	28	6,1±0,22	10,2±0,12	26,4±1,8*	12,6±1,2	4,0±0,18	6,1±0,22
	42	6,5±0,12	11,5±0,18	24,6±3,1	12,9±0,9	4,2±0,3	6,5±0,12
	56	5,9±0,16	11,4±0,3	25,0±2,5	14,2±1,3	4,0±0,18	5,9±0,16
Контроль	14	5,8±0,14	10,7±0,14	21,0±2,7	13,5±0,7	3,8±0,2	***
	28	6,1±0,11	9,9±0,25	20,0±1,6	12,8±0,8	4,2±0,18	индивиду
	42	6,43±0,17	12,0±0,06	22,0±2,2	13,0±0,9	4,3±0,28	альный,
	56	6,0±0,08	11,3±0,37	20,5±2,1	14,3±1,1	4,2±0,18	для каждой пробы

* - при P<0,05

В более низкой дозе 1/3500 DL₅₀ (0,07 мг/кг) выявлено лишь увеличение протромбинового времени, которое является специфическим показателем действия данной группы соединений. Таким образом, дозу препарата 0,25 мг/кг можно считать порогом интегрального действия (L_{int}), а дозу 0,07 мг/кг – близкой к порогу специфического действия (L_{sp}).

Наличие адаптивных процессов в организме в условиях повторного действия метилфенамина-0,75% оценивалось по окончании эксперимента путем «нагрузки» тем же веществом в дозе, составляющей уровень DL₅₀.

В контрольной группе гибель крыс при введении DL_{50} соответствует уровню среднелетальной дозы. При ежедневном введении крысам дозы метилфенамина на уровне $1/3500$ и $1/1000$ DL_{50} отмечали аналогичную картину. При введении DL_{50} крысам, ежедневно получавшим метилфенамин-0,75% на уровне $1/500$ DL_{50} , отмечали более высокий уровень гибели, чем в остальных группах. Наибольшее отличие результатов при введении среднесмертельной дозы наблюдали в группе $1/250$ DL_{50} , где гибели крыс не отмечали.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что степень устойчивости животных зависит от дробности повторного введения.

При определении степени опасности препарата, зона хронического интегрального действия ($Z_{ch\ int} = Lim_{ac\ int} / Lim_{ch\ int}$) составила 40, а зона хронического специфического действия ($Z_{ch\ sp} = Lim_{ch\ int} / Lim_{ch\ sp}$) – 3,5. Значения зон биологического действия свидетельствуют о высокой степени опасности препарата в условиях хронического воздействия.

Мутагенная активность. Оценка мутагенной активности метилфенамина-0,75% проводилась с помощью анализа клеток костного мозга белых беспородных крыс на стадии ана-телофазы.

Мутагенная активность метилфенамина определялась на животных, подвергавшихся однократному и хроническому воздействию. При сравнении, количество истинных перестроек хромосом, а также количество слияний и отставаний в опытных группах достоверно не отличалось от тех же показателей контроля и не выходило за границу физиологической нормы для данного вида животных.

На основании результатов проведенных исследований, получены токсикологические характеристики средства метилфенамин-0,75%, которые указывают на возможность использования полученной формы в целях борьбы с грызунами (табл. 4).

Таблица 4

Параметры токсичности метилфенацина-0,75%

Показатели	Результаты	Заключение
DL ₅₀ в желудок, мг/кг	250	III Класс опасности
Козфф корреляции, r	1,0	Отс Комбинир действ
DL ₅₀ на кожу, мг/кг	550	III Класс опасности
K _{к/о}	2,2	Выраженное кожно-резорбт действ
TE ₅₀ гибели, ч	168	<I Класса опасности
Аллергическое, раздражающее действие	Отсутствует	-
Lim _{ac}	10 мг/кг	Порог острого действия
K _{кум}	<0,5 (Lim et all) 1,5 (Каган)	I Класс опасности II Класс опасности
Lim _{ch}	0,25 мг/кг 0,07 мг/кг	Порог интегрального действия Порог специфич Действия
Стабильность при хранении, мес	>12	-
Козфф избирательной токсичности (K _{ит})	>7,0	> II класс опасности
Z _{ch}	40 (int) 3,5 (sp)	Высокая степень опасности по общетоксич и специфич пок-лям
Козфф запаса (K _s)	10	Соединения, не представляющие непосредственной опасности
ОДУ	0,01 мг/кг	Безвредный уровень воздействия

Гистологические изменения органов крыс при воздействии летальных доз препарата метилфенацин-0,75%

При исследовании легкого крыс были обнаружены признаки острой застойной гиперемии коллагеновые волокна периваскулярной соединительной ткани утолщены, полости альвеол и бронхиол частично заполнены гомогенной массой

В печени выявляли нарушение балочной структуры, центральные вены и внутридольковые капилляры не имели выраженных границ, были расширены и заполнены кровью

В селезенке отмечали гиперплазию и деструктивные изменения клеточных элементов фолликулов. Наблюдала гиперемия и реактивное изменение состава белой и красной пульпы, а также соединительной ткани стромы.

В почках крыс выявляли нечеткую границу между корковым и мозговым веществом. Отмечали нарушения структур канальцев, расширение межканальцевых прослоек соединительной ткани. Обнаружены скопления эритроцитов между прямыми канальцами собирательных трубочек.

При исследовании тонкого отдела кишечника наблюдали десквамацию покровного эпителия ворсинок слизистой оболочки, а также увеличение количества бокаловидных клеток, в подслизистой основе выявляли отек и кровенаполнение сосудов.

В целом, при поступлении метилфенацина-0,75% в летальных дозах наблюдалось комплексное нарушение структуры различных систем органов, вызванное нарушением гомеостаза в организме.

Результаты исследования метилфенацина-0,75% на сельскохозяйственных животных

С целью использования препарата метилфенацин-0,75% на объектах животноводства, проведено изучение возможности отравления родентицидным средством сельскохозяйственных животных (свиней) (табл. 5).

Разовое поступление метилфенацина-0,75% в организм свиней в количестве до 1785 мг/кг не вызывает клинических признаков отравления и гибели. Важно отметить, что эта доза соответствует 7 DL_{50} для крыс. Таким образом, коэффициент избирательной токсичности ($K_{ит}$) для свиней превышает значение 7,0.

Гибель свиней вызывает безальтернативное кормление в течение 8 суток готовой отравленной приманкой, приготовленной на основе метилфенацина-0,75%, в количестве 115 мг/кг в сутки.

Таблица 5

Изменение гематологических показателей у свиней под действием
метилфенацина-0,75%

Доза	Показатели						
	1 сут	3 сут.	5 сут	7 сут	9 сут.	11сут	30сут.
Эритроциты (млн/мм³)							
1785 мг/кг (1-кратн)	7,1±0,42	7,05±0,42	-	7,2±0,42	7,3±0,27	-	7,2±0,6
115 мг/кг (8-кратн)	-	7,3±0,12	7,2±0,08	-	6,75±0,42	6,95*	7,1*
Контроль	7,2±0,42	7,2±0,28	7,2±0,28	7,3±0,18	7,05±0,33	7,05±0,33	7,05±0,15
Гемоглобин (г%)							
1785 мг/кг (1-кратн)	9,9±1,0	9,9±1,1	-	9,7±0,1	9,5±0,59	-	9,8±0,3
115 мг/кг (8-кратн)	-	9,9±0,3	9,8±0,34	-	9,6±1,2	9,95*	10,7*
Контроль	9,9±0,42	9,8±0,28	9,8±0,28	10,2±0,28	10,6±0,33	10,6±0,33	9,8±0,15
Протромбиновое время (с)							
1785 мг/кг (1-кратн)	24,0±1,5	60,0±21,0	-	21,0±1,0	23,0±1,0	-	20,5±1,0
115 мг/кг (8-кратн)	-	36,5±9,5	54,5±16,0	-	57,5±21,0	60,5*	21,75*
Контроль	24,5±1,5	22,5±0,5	22,5±0,5	20,0±0,5	21,0±0,5	21,0±0,5	19,5±1,5

* - среднее значение по результатам исследования двух животных

Куры менее чувствительны к метилфенацину. Кормление птицы в течение 14 суток при ежедневном поступлении 820 - 930 мг/кг препарата не вызывало гибели и клинических признаков отравления метилфенацином.

На основании полученных данных, был определен коэффициент запаса (K_s) и безвредный уровень воздействия на организм сельскохозяйственных животных ($Lim_{ch\ sp}/K_s$). K_s согласно классификации по Z_{sp} составил 10. В качестве Lim_{ch} брали значение 0,07 мг/кг (1/3500 DL_{50}) в виду выраженного воздействия метилфенацина-0,75% на организм животных по специфическим показателям ($Lim_{ch\ sp}$).

Таким образом, безвредный уровень воздействия на организм сельскохозяйственных животных метилфенацина-0,75% равен 0,01 мг/кг, что дает возможность использовать полученное родентицидное средство, в соответствии с требованиями санитарных и ветеринарно-санитарных правил.

Испытание различных форм метилфенадина-0,75% в условиях производства

Эффективность родентицидного действия рабочих форм препарата метилфенадин-0,75% изучали на объектах (№ 6, № 7) промышленной зоны свинокомплекса «Шувалово» Костромской области. На основании обследования мест обитания грызунов, изучения поедаемости контрольных проб неотравленной приманки был сделан вывод о высокой степени заселенности (22 крысы на 100 кв м) и проведена дератизация объектов площадью 2600 кв м.

Комплексная обработка включала в себя раскладку и ежедневный контроль поедаемости приманки на основе препарата метилфенадин-0,75% в помещениях промышленной зоны, прилегающей территории, галереях, обработку нор и мест миграции грызунов. В качестве пищевой основы использовали зерновую основу (комбикорм, дробленую пшеницу), которую смешивали с метилфенадином-0,75% согласно инструкции по применению и раскладывали в проходах и бытовых помещениях, вдоль стен и в пустых клетках. В случае полной поедаемости приманки, количество приманочных точек и раскладываемой приманки пропорционально увеличивали. Испорченную приманку заменяли на новую, использовали приманочные ящики и меняли место расположения приманочной точки, с целью предотвращения повторного загрязнения. Жилые норы и пути миграции грызунов обрабатывали ядовитой пастой на основе вазелина, содержащего метилфенадин-0,75% в местах, недоступных для контакта с сельскохозяйственными животными. Высокую поедаемость отмечали в первые 3-4 дня обработки. В последующие 10 суток дератизационных мероприятий отмечали снижение поедаемости, вплоть до полного прекращения.

В результате ежедневного проведения дератизации на обрабатываемых объектах отмечали снижение числа грызунов. В дневное и вечернее время живых особей не наблюдалось, уменьшилось количество жилых нор,

признаков жизнедеятельности грызунов на объекте (помет, следы) не отмечали. Эффективность проведенных мероприятий составила 95%.

С целью сравнения эффективности действия метилфенацина-0,75%, на объектах № 1-5 промышленной зоны и на объектах № 1, 2 племенного сектора, проводили дератизацию с использованием Аратамус-М - аналогичного препарата индан-1,3-дионовой группы на основе этилфенацина. В зависимости от первоначальной заселенности объектов крысами, возможности миграции и общего санитарного состояния, эффективность дератизации составила 90 - 98%.

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о эффективности и целесообразности использования препарата метилфенацин-0,75% в качестве родентицидного средства.

Выводы

- 1 Исследование 13 образцов индан-1,3-дионовых соединений показали, что наибольшая биологическая активность в ряду соединений отмечена у химически чистых веществ, имеющих не более 1-го радикала в *пара*-положении. При этом, метилфенацин, броминдан и фториндан обладали выраженными рагитицидными свойствами и перспективны для производства родентицидных средств.
- 2 Разработана препаративная форма родентицидного средства метилфенацин-0,75%. В качестве растворителя использован полиэтиленгликоль-400, окрашенный водным раствором кармуазина.
- 3 Среднелетальная доза препарата метилфенацин-0,75% составила 250 мг/кг при внутрижелудочном введении (III класс по ГОСТ 12 1 007-76), при поступлении через кожу - 550 мг/кг. Кожно-оральный коэффициент составил 2,2, что свидетельствует о выраженном кожно-резорбтивном действии.
- 4 Показано, что признаки отравления метилфенацином проявляются на 3-5 сутки в виде угнетения, взъерошенности шерсти, петехий и гематом.

- Патологоанатомические изменения отмечены в печени и почках (анемия), селезенке (гиперплазия), кишечнике (катаральное воспаление) В органах и полостях тела множественные кровоизлияния
- 5 По результатам острого опыта установлено среднее время гибели (TE_{50}) белых крыс 168 часов, что позволило прогнозировать высокую степень кумуляции метилфенацина в организме животных
 - 6 Порог острого действия Lm_{ac} препарата метилфенацин-0,75% составил 10 мг/кг ($1/25 DL_{50}$), порог хронического интегрального действия ($Lm_{ch\ int}$) - 0,25 мг/кг, специфического ($Lm_{ch\ sp}$) - 0,07 мг/кг (по протромбиновому времени) Зона хронического интегрального действия ($Z_{ch\ int}$) составила 40, специфического действия ($Z_{ch\ sp}$) - 3,5, что свидетельствует о высокой степени опасности препарата для крыс в условиях хронического воздействия
 - 7 Установлено, что введение препарата метилфенацин-0,75% в конъюнктивальный мешок глаза кроликов вызывало слабое раздражающее действие на слизистую оболочку
 - 8 Установлено, что метилфенацин-0,75% не обладает аллергенным и мутагенным действием Нанесение 20-кратных аппликаций 10%-ного раствора метилфенацин-0,75% на кожу морских свинок не выявило аллергического действия Ана-телофазный метод оценки мутагенной активности на клетках костного мозга крыс показал, что воздействие доз ниже общетоксического уровня при однократном введении ($1/2 DL_{50}$) не вызывало достоверного повышения уровня хромосомных aberrаций
 - 9 Показано, что кумулятивные свойства метилфенацина зависят от режима поступления в организм Коэффициент кумуляции (K_{cum}) при поступлении метилфенацина-0,75% на уровне 25 мг/кг ($1/10 DL_{50}$), составил $<0,5$ (сверхкумулятивное вещество), а на уровне 12,5 мг/кг ($1/20 DL_{50}$) - 1,5 (вещество с выраженными кумулятивными свойствами)
 - 10 При ежедневном 2-месячном введении метилфенацина в организм крыс в сублетальных дозах на уровне $1/250 DL_{50}$, у животных происходит

развитие адаптации, что выражается уменьшением чувствительности при введении среднетелальной дозы

- 11 Установлено, что для сельскохозяйственных животных и птицы метилфенацин-0,75% в форме приманки малоопасен. Однократное введение препарата в дозе 1785 мг/кг не вызывало клинических признаков отравления свиней. Кормление в течение 8 суток приманкой, в дозе 115 мг/кг метилфенацина-0,75%, вызывает падеж свиней. Кормление кур приманкой содержащей 820-930 мг/кг препарата в течение 14 суток не вызывало признаков отравления.

Предложения для практики

Для борьбы с синантропными грызунами разработано родентицидное средство метилфенацин-0,75%

Разработаны инструкция по применению препарата и технические условия, содержащие показатели качества и методы аналитического контроля

Список опубликованных работ

- 1 Д.А. Дроздов. Определение токсичности родентицидов и их влияние на морфологию органов и тканей мышевидных грызунов / Материалы II международной научной конференции молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» – Москва – 2003 - С 145 – 146
- 2 Д.А. Дроздов. Влияние химической «чистоты» на токсикологические характеристики индандионов / Материалы V международной научной конференции молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» – Москва – 2006 - С 213 – 214
- 3 Д.А. Дроздов, Г.И. Павленко. Определение содержания метилфенацина в объектах окружающей среды / Материалы VI Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2006» - Самара - 2006 - С 139

- 4 Д А Дроздов Влияние метилфенацина на процессы формирования устойчивости к антикоагулянтным родентицидам // Сб трудов научно-практической конференции «Качество продукции, технологий и образования» - Магнитогорск – 2007 - С 108-109
- 5 Д А Дроздов, И В Самсонов, А Н Лебедев, С Л Кузнецов, Г И Павленко, Н М Бочаров Степень опасности метилфенацина для животных // Ветеринария – Москва – 2007 - № 7 – С 53-55
- 6 С Д Каракотов, А В Желонкин, В В Шапилова, А Л Чимишкян, В А Колесова, Д А Дроздов, Е М Ленченко Проблемы дератизации в России Синтез родентицидов в ряду производных индан-1,3-диона и их сравнительная характеристика // Химия России – Москва - 2004 - С 17 – 19
- 7 Г И Павленко, Д А Дроздов Влияние режимов воздействия родентицидных средств на процесс возникновения устойчивости у грызунов // Материалы 1 съезда ветеринарных фармакологов России - Воронеж – 2007 - С 500-504

ГНУ ВНИИВСГЭ, 2007 г., Москва, Звенигородское шоссе, д. 5
Заказ 247/2, тираж 80 экз