

На правах рукописи

КАРИМОВА РУФИЯ ГАБДЕЛЬХАЕВНА

**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗОДИФУРАНА**

16.00.04 – Ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Каримова

Казань – 2003

Работа выполнена в Казанской государственной академии ветеринарной
медицины

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор
Гарипов Талгат Валирахманович

Научный консультант: доктор ветеринарных наук
Волков Али Харисович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Зимаков Юрий Андреевич

доктор ветеринарных наук,
профессор
Софронов Владимир Георгиевич

Ведущая организация: Чувашская государственная
сельскохозяйственная академия

Защита состоится «1» июня 2003 года в «10» часов на
заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при Всероссийском
научно-исследовательском ветеринарном институте (420075, г. Казань,
Научный городок – 2, ВНИВИ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан «29» июня 2003 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук

 В.И. Степанов

2003-А
10628

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время одной из актуальных проблем ветеринарии и медицины является широкое распространение кожных заболеваний микотической и саркоптоидозной этиологии (В.В. Дроздов, 1997; М.В. Шустрова и др., 1999; А.И. Ятусевич, 1999; Т.В. Соколова, 2001 и др.). Пораженность собак и кошек акарозами и дерматомикозами составляет 32-45% от общего числа больных животных (В.С. Шеховцев и др., 1997; Н.Ф. Фирсов и др., 1999; Л.Н. Скосырских др., 1999; А.М. Титаренко, 2000 и др.). Это объясняется резким снижением естественной резистентности организма и возникновением иммунодефицитов, развивающихся вследствие нарушения экологического баланса и физиологически необоснованного кормления (В.В. Дроздов, 1997; М. Щанкина и др., 1999; С.М. Федоров, М.Н. Шеклакова, 2001 и др.).

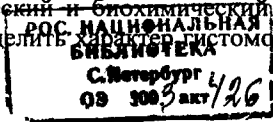
Несмотря на многообразие лекарственных средств, созданных для борьбы с саркоптоидозами и дерматомикозами, многие из них не удовлетворяют ветеринарную практику. Поэтому поиск новых эффективных лечебных средств при дерматомикозах и саркоптоидозах животных является актуальным направлением ветеринарной науки.

Замещенные бензодифуразана являются перспективным источником поиска новых фунгицидно-акарицидных препаратов. Подробное изучение биологической активности и фармако-токсических свойств замещенных бензодифуразана позволит выявить наиболее активные против возбудителей акарозов и дерматомикозов и менее токсичные для животных препараты. Кроме того, анализ зависимости биологической активности соединения от его структуры позволит в дальнейшем проводить целенаправленный синтез высокоактивных бактерицидных, фунгицидных и акарицидных соединений.

Цель и задачи исследований. Цель исследований – изучение биологической активности, фармакологических и токсикологических свойств замещенных бензодифуразана и предложение для ветеринарной практики эффективного средства для лечения дерматомикозов и саркоптоидозов животных.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить физико-химические свойства замещенных бензодифуразана.
2. Определить биологическую активность замещенных бензодифуразана и выяснить связь между их структурой и активностью, выявить наиболее перспективные соединения.
3. Определить параметры токсичности, кумулятивные свойства замещенных бензодифуразана, обладающих выраженной биологической активностью; выбрать наименее токсичное для теплокровных животных соединение.
4. Изучить влияние наиболее перспективного соединения – хлофузана на клинический статус, гематологический и биохимический состав крови лабораторных животных; определить хроническое морфоло-



гических изменений, возникающих в организме животных после его применения.

5. Изучить отдаленные последствия действия фуразанопроизводного на организм животных.
6. Установить лечебную эффективность наиболее перспективного из замещенных бензодифуразана при дерматомикозах и саркоптоидозах животных; разработать лекарственные формы, дозы и схемы его применения.

Научная новизна. Замещенные бензодифуразана – новая группа соединений, обладающих антимикробными, антимикотическими, акарицидными свойствами. Впервые выявлена зависимость их биологической активности от вида и местоположения заместителей в молекуле бензодифуразана. Определены параметры токсичности бензодифуразана, хлорбензодифуразана и хлофузана (4-хлор-6,7-фуросанобензофуразана). Впервые доказано отсутствие отрицательного влияния хлофузана на общее состояние, морфо-биохимический состав крови и гистоморфологию тканей животных при однократном и длительном введении; установлено отсутствие отдаленных последствий воздействия препарата на организм (мутagenность, эмбриотоксичность, тератогенность). Разработаны лекарственные формы, дозы и схемы применения хлофузана при дерматомикозах и саркоптоидозах животных.

Практическая ценность. Установленная зависимость биологической активности фуразанопроизводных соединений от их химической структуры позволяет проводить синтез, направленный на получение биологически высокоактивных химических соединений.

Хлофузан в виде 0,1% спиртового раствора и 0,1% мази эффективен при псороптозе кроликов, отодектозе собак и кошек, дерматомикозах плотоядных.

По результатам исследований разработано «Временное наставление по применению препарата хлофузан при акарозах и дерматомикозах животных» (Утвержденное Главным управлением ветеринарии Кабинета министров Республики Татарстан 2 апреля 2003 г.).

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждены и получили положительную оценку на: научно-практических конференциях КГАВМ (Казань, 2000; 2001; 2002), конференции ветеринарных фармакологов и токсикологов, посвященной 125-летию Н.А.Сомашевского (Казань, 2001), IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов РТ (Казань, 2001), научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии» (СПб, 2002), итоговой конференции Республиканского конкурса научных работ среди студентов и аспирантов на соискание премии имени Н.И.Лобачевского (Казань, 2002).

Настоящая работа проведена в соответствии с тематикой научных исследований Казанской государственной академии ветеринарной медицины (номер госрегистрации 0.1.98.0002094)

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- замещенные бензодифуразана обладают выраженными антимикробными, фунгицидными, акарицидными свойствами;
- бензодифуразан, хлорбензодифуразан и хлофузан малотоксичны, не проявляют кумулятивного действия;
- хлофузан в рекомендуемых концентрациях и кратности применения не оказывает отрицательного влияния на морфо-биохимический состав крови; не обладает мутагенным и эмбриотоксическим действиями;
- хлофузан при наружном применении обеспечивает высокий терапевтический эффект при болезнях кожи микозной и акарозной этиологии.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений и списка литературы. Работа иллюстрирована двумя рисунками и содержит 34 таблицы.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в 1999-2002 гг в условиях лаборатории кафедры физиологии и этологии животных Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (рис. 1), научно-производственные опыты - в ветеринарной клинике «Добрый доктор» г. Казани, в Новочебоксарской городской станции по борьбе с болезнями животных.

Объектами исследований служили 21 соединение (замещенные бензодифуразана), синтезированное на кафедре ХТОСА КГТУ с целью поиска новых биологически активных соединений. В качестве растворителя препаратов в экспериментах использовали диметилсульфоксид (димексид, Р. 75.244.9), для приготовления суспензии в качестве эмульгатора – стеарокс-6 (ГОСТ 8980-75).

Экспериментальная часть работы выполнена в лабораторных условиях на 27 белых беспородных мышах, 300 белых беспородных крысах, 60 кроликах, 7 собаках.

Определение бактериостатической активности препаратов *in vitro* проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде при бактериальной нагрузке 300000 микробных тел в 1 мл (С.Н.Милованова, 1971). Бактерицидную активность хлофузана изучали путем воздействия его на тест объекты при комнатной температуре (19-22°C) и дальнейшего культивирования *E. coli* и *St. aureus* на МПА (С.Н.Милованова, 1971). Бактериальная нагрузка – 500000 микробных тел в 1 мл. Бактериостатические и бактерицидные свойства определяли визуально по отсутствию роста культуры в пробирках после суточной и пяти-суточной инкубации при температуре 37°C.

Антимикотическое действие замещенных бензодифуразана определяли по отношению к *Aspergillus niger* ВКМФ-1119, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton*

gipseum и *Microsporium lanosum* методом серийных разведений (С.Н.Милованова, З.Г.Степанищева, 1971).

Акарицидные свойства препаратов изучали на клещах *Psoroptes cuniculi*, выделенных из свежих соскобов по методу Алфимовой А.В.(1949). Клещей подвергали воздействию водных суспензий препаратов в различных концентрациях. Чашки с клещами помещали в термостат на 24 часа при температуре 36,5°С. Наблюдение за клещами вели тотчас же после воздействия препаратов и через 10, 30 минут, 1, 2, 4 и 24 часа. Контрольных клещей подвергали воздействию 0,5% раствора стеарокса. Об акарицидной активности препаратов судили по показателю $СК_{50}$, которую высчитывали по формуле Кербера С. (1931).



Рис. 1. – Общая схема исследований

Острую токсичность препаратов изучали на белых беспородных крысах живой массой 120-150 г, белых беспородных мышах живой массой 18-20 г. Соединения вводили однократно в различных дозах в виде 5% водной суспензии внутривентриально и в виде 20% раствора в ДМСО на кожу. Контрольным животным вводили раствор эмульгатора в дистиллированной воде или растворитель. Расчеты параметров острой токсичности проводили по методу Миллера и Тейнтера (1944).

Определение раздражающих свойств препаратов на кожу и слизистые оболочки осуществляли при однократном нанесении растворов (Методические указания, 1985).

Кумулятивные свойства препаратов определяли по методу «субхронической токсичности» (Lim R.K., Rink K.G., Glass H.G., Soaje-Echague E., 1961). Контрольным животным вводили 2% раствор эмульгатора или растворитель. Расчет коэффициента кумуляции производили по формуле, предложенной Ю.С.Каганом и В.В.Станкевичем (1970).

Изучение аллергенного действия хлофузана проводили на кроликах методом эпикутанных аппликаций (Методические указания, 1985).

Оценку мутагенного действия хлофузана изучали на примере His⁺ реверсий у ауксотрофного по гистидину штамма BA13 *Salmonella thyphimurium*, имеющего мутацию в гене hisG46 (А.М. Фонштейн и др., 1986).

Эмбриолетальное и тератогенное действие хлофузана изучали на белых беспородных крысах (Методические указания, 1986).

Для морфологических исследований патматериал фиксировали в 10% формалине. Окраску срезов проводили гематоксилин-эозином.

Влияние хлофузана на морфологический и биохимический состав периферической крови изучали по общепринятым методикам.

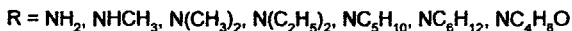
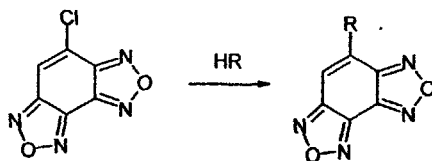
Статистическую обработку цифрового материала проводили на персональном компьютере с использованием табличного процессора Microsoft Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Физико-химические свойства замещенных бензодифуразана

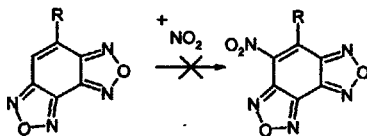
Замещенные бензодифуразана по внешнему виду представляют собой порошки белого или светло-желтого цвета, нерастворимые в воде, хорошо растворимые в органических растворителях (спирт этиловый, диметилсульфоксид, толуол, хлороформ и другие).

Как и для большинства гетероциклических структур характерными для бензодифуразанов являются реакции нуклеофильного и электрофильного замещения. При проведении реакции нуклеофильного замещения в качестве уходящих групп выступают: атом хлора, метокси- и фениламинная группы.

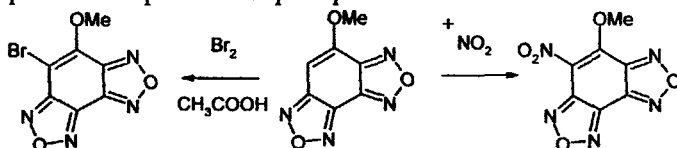


Метоксигруппа при бензодифуразановом базисе становится подвижной лишь при наличии в соседнем положении нитрогруппы. Реакции метоксинитробензодифуразана с анилинами проходят в диметилформамиде при комнатной температуре. Длительность их зависит от природы заместителя в анилине. Чем более акцепторным является заместитель в анилине, тем медленнее идут взаимодействия, что характерно для реакций нуклеофильного замещения в ароматических и гетероароматических системах.

Суммарная электроноакцепторность двух фуразановых циклов затрудняет реакции электрофильного замещения. Так БДФ и хлорБДФ не нитруются различными нитрующими средствами (нитрат калия в серной кислоте, 80%-ная азотная кислота).



Замена объемного акцепторного атома хлора на донорную метокси-группу позволяет провести нитрование и бромирование:



3.2. Биологическая активность замещенных бензодифуразана

3.2.1. Антибактериальная активность

Антибактериальную активность замещенных бензодифуразана изучали на патогенных штаммах *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Показателем бактериостатической активности служила минимальная бактериостатическая концентрация (МБСК).

Бензодифуразан обладает выраженным антимикробным действием. Его МБСК в отношении золотистого стафилококка составила 0,1%. Хлорпроизводное бензодифуразана обладает аналогичной активностью. Следовательно, замена атома водорода в молекуле на атом хлора не приводит к увеличению анти-

бактериальной активности. Замена атома хлора на алкиламинные группы (метильная, диметильная, пиперидиновая, морфолиновая) снижает антибактериальную активность соединений (МБСК равна или более 0,5%). При замене атома хлора на аминогруппу бактериостатическая активность увеличивается в 2 раза по сравнению с активностью хлорбензодифуразана. Включение нитрогруппы в орто-положение к аминогруппе приводит к снижению антибактериальной активности в 5 раз. Замена атома водорода в первичной аминогруппе фенильным радикалом не повышает биологическую активность соединения. Антибактериальная активность повышается до 0,05% при введении в пароположение фенильного ядра атома хлора, карбоксильной или сульфаниламидной групп, а в случае введения сульфанилгуанидиновой группы – до 0,025%. Такая же активность (МБСК – 0,025%) достигается и при замене первичной аминогруппы на метоксильную. Однако, аналогичная замена у аминобензодифуразана приводит к противоположному эффекту – значительному снижению бактериостатического действия. Такое различие, возможно, обусловлено поляризующим влиянием нитрогруппы на двойную связь, что повышает электрофильность углеродного атома (в орто-положении) – вероятного реакционного центра взаимодействия с ферментами или белками бактерий. Гидроксинитробензодифуразан обладает самой высокой бактериостатической активностью среди замещенных бензодифуразана. МБСК этого соединения по отношению к *St. aureus* составляет 0,000156%, по отношению к *E. coli* – 0,0003125%. Увеличение антибактериальной активности этого соединения связано с повышением электрофильности углеродного атома при гидроксильной группе, но объяснять столь резкое изменение только этим фактором явно не достаточно. Более важным фактором, по-видимому, является повышенная по сравнению с фенолом кислотность гидроксильной группы, обусловленная сильным совместным влиянием трех электроноакцепторов: нитрогруппы и двух фуразановых циклов.

Моно-N-окиси бензодифуразана (производные фуроксанобензофуразана) обладают более высокой бактериостатической активностью, чем аналогичные бензодифуразанильные производные. Незамещенный фуроксанобензофуразан и его хлорпроизводное задерживают рост *St. aureus* в 0,025% концентрации, *E. coli* – 0,01%. Введение нитро- или метоксигруппы в орто-положение к фуразановому фрагменту приводит к снижению антибактериальной активности. Такая же тенденция наблюдается и в отношении соответствующих бензодифуразанильных производных.

У 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразана (хлофузана) изучена бактерицидная активность. Установлено, что хлофузан проявляет *in vitro* стабильную бактерицидную активность в отношении *St. aureus* и *E. coli* при экспозиции 30 минут в концентрациях 0,125-0,25%.

3.2.2. Антигрибная активность

Фунгистатическое действие замещенных бензодифуразана определяли на патогенных штаммах *Aspergillus niger* ВКМФ-1119. Чувствительность к препаратам определяли их минимальной концентрацией (МФСК).

Фунгистатическая активность производных фуроксанобензофуразана значительно выше, чем у дезоксидных замещенных бензодифуразана. Фуроксанобензофуразан задерживает рост *Aspergillus niger* в 0,05% концентрации. Введение нитрогруппы в орто-положение к фуразану приводит к снижению фунгистатической активности в 2,5 раза (МФСК – 0,125%), введение метоксильной группы – в 5 раз (МФСК – 0,25%). В то же время введение атома хлора в молекулу фуроксанобензофуразана повышает антимикотическую активность в 4 раза (МФСК – 0,0125%). Среди изученных препаратов самой высокой фунгистатической активностью по отношению к *Aspergillus niger* обладает 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразан (МФСК – 0,0125%). У этого соединения изучили фунгистатические и фунгицидные свойства по отношению к возбудителям дерматомикозов животных и человека (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton gypseum*, *Microsporum lanosum*). МФСК хлофузана по отношению к *Tr. rubrum* составила 0,002%, *Tr. gypseum* – 0,004%, *M. lanosum* – 0,0156%.

Фунгицидную активность хлофузана изучали на *Tr. rubrum*, *Tr. gypseum*, *M. lanosum*. Хлофузан *in vitro* проявляет стабильную фунгицидную активность при 30 минутной экспозиции. Минимальная фунгицидная концентрация при указанной экспозиции составила для *T. gypseum* и *T. rubrum* 0,0156%, а для *M. lanosum* – 0,0625%.

3.2.3. Акарицидная активность

Акарицидную активность замещенных бензодифуразана изучали на клещах *Psoroptes cuniculi*. Большинство исследованных препаратов обладает выраженным акарицидным действием. Так, СК₅₀ для бензодифуразана составляет 0,01%, его хлорпроизводного – 0,014%. Замена атома хлора на аминогруппу приводит к снижению акарицидной активности в 2 раза (СК₅₀ – 0,028%). При введении в молекулу бензодифуразана диметиламинной группы акарицидная активность снижается в 9 раз (СК₅₀ – 0,09%).

Акарицидные свойства фуроксанобензофуразана и его хлорзамещенного на порядок превосходят таковые для соответствующих бензодифуразанильных производных. Так, фуроксанобензофуразан превосходит бензодифуразана в 2,8 раза, а 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразан превосходит акарицидную активность хлорбензодифуразана в 3,14 раза. У метоксильных производных наблюдается обратная картина. Метоксибензодифуразан активнее соответствующего фуроксаносодержащего (4-метокси-6,7-фуроксанобензофуразан) в 1,9 раз. Нитропроизводные бензодифуразана, а также 4-нитро-6,7-фуроксанобензофуразан обладают более слабым акарицидным действием, чем другие исследованные соединения. Исключением является лишь аминонитробензодифуразан (СК₅₀ – 0,17%). Среди изученных соединений самой высокой акарицидной активностью обла-

дают фуроксанобензофуразан ($СК_{50} - 0,0032\%$) и 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразан ($СК_{50} - 0,0041\%$).

В результате проведенных исследований выявлены пять соединений, обладающих одновременно выраженным бактериостатическим, фунгистатическим и акарицидным действием. Это бензодифуразан, хлорбензодифуразан, аминобензодифуразан, фуроксанобензофуразан, 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразан.

3.3. Определение параметров острой токсичности замещенных бензодифуразана

Острую токсичность бензодифуразана, хлорбензодифуразана и 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразана (хлофузана) изучали на двух видах животных (белых крысах и мышах) при внутрижелудочном и накожном (у хлофузана) путях введения.

Однократное пероральное введение хлофузана в дозе 300 мг/кг (белым мышам) и в дозе 500 мг/кг (белым крысам) не вызывало у животных внешних признаков отравления. Эти дозы мы приняли за максимально переносимые (МПД). В течение 14 суток после введения препарата животные оставались живыми, были подвижны, активны, хорошо поедали корм.

Более высокие дозы препарата (700-900 мг/кг) вызывали возбуждение и общее беспокойство животных. Мыши и крысы активно двигались по клетке, часто вставали на задние лапы. У них отмечали потирание лапами мордочки, встряхивание головой, появление слюноотделения, что может быть вызвано раздражением рецепторов слизистой желудка. Через 30-40 минут наступали угнетение, вялость, пониженная реакция животных на болевые и звуковые раздражители, затем возникали клонические судороги, непроизвольное мочеиспускание. Гибель белых крыс наступала через 3-24 часа после затравки, гибель белых мышей – через 2-18 часов.

За максимально переносимую дозу бензодифуразана была принята доза 150 мг/кг, хлорбензодифуразана - 300 мг/кг.

При введении более высоких доз (250-400 мг/кг и 400-800 мг/кг соответственно) указанных препаратов у белых крыс отмечали угнетение, отсутствие аппетита, замедленное и затрудненное дыхание. Эти признаки проявлялись через 4-16 часов после введения бензодифуразана и через 3-9 часов после введения хлорбензодифуразана. Гибель белых крыс наступала через 12-72 часа после введения бензодифуразана и через 6-48 часов после введения хлорбензодифуразана.

При патолого-анатомическом исследовании павших животных визуально отмечали кровенаполненность сосудов печени, гиперемиию слизистой желудка, отеки легких. У мышей и крыс опытной группы органы соответствовали норме.

После установления числа животных, павших за все время наблюдения, рассчитывали $ЛД_{50}$ (табл. 1) по методу Миллера и Тейнера (1944).

Таблица 1

Параметры острой токсичности замещенных бензодифуразана
при введении в желудок

Параметры	Вид животных	Препараты		
		бензодифуразан	хлорбензодифуразан	хлофузан
ЛД ₁₆ , мг/кг	белые крысы	220	349	631
ЛД ₅₀ , мг/кг	белые крысы	330±47,8	547±79,9	763 ± 50,4
ЛД ₈₄ , мг/кг	белые крысы	482	867	907
ЛД ₁₆ , мг/кг	белые мыши	—	—	529
ЛД ₅₀ , мг/кг	белые мыши	—	—	745±54,2
ЛД ₈₄ , мг/кг	белые мыши	—	—	905
Коэффициент вариабельности летальных доз		2,2	2,48	1,44

Согласно ГОСТ 12.1.007-76, бензодифуразан, хлорбензодифуразан и хлофузан относятся к веществам III класса токсичности.

Острую токсичность хлофузана при накожном применении изучали на 24 беспородных белых крысах живой массой 150-180г.

Однократное накожное применение хлофузана в дозе 900мг/кг не вызывало у белых крыс внешних признаков отравления. 20% раствор хлофузана в указанной дозе вызывал незначительное раздражающее действие на кожу животных. Более высокие дозы препарата вызывали общее беспокойство животных. Крысы интенсивно двигались по клетке, часто вставали на тазовые конечности. Через 12-14 часов наступали угнетение, вялость, пониженная реакция животных на болевые и звуковые раздражители, перед гибелью возникали клонические судороги, непроизвольное мочеиспускание. Гибель белых крыс наступала через 36-72 часа после затравки.

При паталого-анатомическом исследовании павших животных визуально отмечали кровенаполненность сосудов печени, отек легких. На месте нанесения препарата отмечалась незначительная отечность и гиперемия кожи и подкожной клетчатки. У крыс опытной группы органы соответствовали норме.

ЛД₅₀ хлофузана при накожном применении составила 1600 ± 50,4 мг/кг, кожно-оральный коэффициент – 2,1.

Согласно классификации пестицидов по кожно-резорбтивной токсичности хлофузан относится к препаратам со слабовыраженной токсичностью (ЛД₅₀ > 1000 мг/кг).

3.4. Определение раздражающего действия замещенных бензодифуразана

Раздражающее действие бензодифуразана, хлорбензодифуразана и 4-хлор-6,7-фуорксанобензофуразана на кожу изучали на 43 белых беспородных крысах живой массой 150-160 г, 25 цуриках живой массой 2,5-3 кг, 7 собаках живой

массой 4,5-5 кг. Изучали действие 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,25 и 0,1 % суспензий препаратов, растворов в ДМСО аналогичной концентрации, а также 0,5; 0,25 и 0,1% растворов хлофузана в 70% спирте этиловом. Наблюдение за животными вели в течение первых 6 часов после нанесения препарата, а затем один раз в день в течение 10 суток.

Хлофузан в виде 10% суспензии оказывал сильное раздражающее действие на кожу белых крыс. В течение первых 6 часов после нанесения препарата у животных отмечали выраженную гиперемию, в более поздние сроки - отек, гипертермию, расчесы, выпадение волос, образование корочки. Рост волос восстанавливался через 14-16 дней. Суспензия, содержащая 1-2% хлофузана вызывала незначительную гиперемию кожи на месте нанесения, а 0,25 и 0,1% суспензии не оказывали раздражающего действия.

При нанесении 10% раствора хлофузана в ДМСО отмечалась гиперемия и небольшая инфильтрация участка кожи, 5% раствора - незначительная гиперемия. Растворы в более низких концентрациях не оказывали отрицательного действия на кожу животных.

Спиртовые растворы хлофузана в изученных концентрациях не оказывали выраженного раздражающего действия на кожу белых крыс и кроликов. Они вызывали незначительную гиперемию участка кожи, что объясняется раздражающим действием спирта этилового.

Бензодифуразан оказывает менее выраженное раздражающее действие на кожу белых крыс и кроликов по сравнению с хлофузаном. Так, бензодифуразан в виде 10% суспензии вызывает отек и инфильтрацию кожи на месте нанесения, 5% суспензии - только гиперемию. Через 24-72 часа внешний вид участка кожи, подвергнутой воздействию препарата, не отличался от контрольного. При нанесении 10% раствора бензодифуразана в ДМСО отмечали выраженную гиперемию участка кожи. 5% раствор вызывал незначительную гиперемию, более низкие концентрации не оказывали раздражающего действия на кожу животных.

Хлорбензодифуразан в виде 5-10% суспензии и растворов оказывает выраженное раздражающее действие на кожу белых крыс. Реакции кожи на хлорбензодифуразан аналогичны реакциям на хлофузан.

Результаты исследований показывают, что бензодифуразан, хлорбензодифуразан и хлофузан в суспензиях оказывают более выраженное раздражающее действие, чем в растворах. Также установлена зависимость силы проявления раздражающего действия от вида животных, кожа кроликов более чувствительна к изученным препаратам, чем кожа белых крыс и собак.

Установлено, что 0,25; 0,1% суспензии хлофузана, 0,5; 0,25% суспензии бензодифуразана, 0,1% суспензии хлорбензодифуразана, а также 0,5; 0,25; 0,1% растворы их в ДМСО и этиловом спирте (для хлофузана) не оказывают раздражающего действия на кожу животных.

Действие хлофузана на слизистые оболочки определяли путем однократного нанесения 2 капель 0,1 и 0,5% суспензии на конъюнктиву глаза кроликов. Животным опытных групп на конъюнктиву правого глаза закапывали суспензии исследуемого препарата, а контрольным – раствор стеарокса (эмульгатора). Состояние животных оценивали через 5, 30, 60 минут после нанесения препарата и ежедневно в течение 5 дней. Установлено, что 0,1% суспензия хлофузана вызывает слезотечение, прекращающееся через 30-40 минут, незначительную гиперемию, сохраняющуюся 12-14 часов.

Хлофузан в виде 0,5% суспензии вызывает раздражение слизистой оболочки глаза, которое проявлялось слезотечением, продолжающимся в течение 2-3 часов, гиперемией, кровенаполненностью сосудов склеры и роговицы. В последующие дни отмечались признаки асептического гнойного конъюнктивита, проходящие в течение 5-6 дней.

У контрольной группы животных, подвергнутых воздействию раствора стеарокса, также отмечалась небольшая гиперемия, которая исчезала через 5-6 часов после нанесения.

3.5. Выявление кумулятивных свойств бензодифуразана и хлофузана

Исследования проводили на 65 белых беспородных крысах живой массой 120-150 г. Бензодифуразан и хлофузан вводили перорально в виде 5% суспензии и накожно (хлофузан) в виде 20% раствора в ДМСО.

Первые признаки токсического действия хлофузана регистрировали на 5-й день эксперимента, бензодифуразана – на 9 день. Крысы проявляли беспокойство, пытались зарыться в подстилку. В последующие дни у крыс регистрировали угнетение, малую подвижность, взъерошенность шерстного покрова, снижение аппетита. Длительное введение хлофузана и бензодифуразана в возрастающих дозах приводило к достоверному снижению массы тела опытных животных ($P < 0,001$). Первая крыса пала после введения хлофузана на 8 день, получив суммарную дозу 543, 1 мг/кг; после введения бензодифуразана – на 15 день (суммарная доза – 955,3 мг/кг). При патолого-анатомическом исследовании павших животных визуально отмечали гиперемию слизистой желудка и тонкого кишечника, полнокровие печени. У крыс опытной группы органы соответствовали норме.

Коэффициент кумуляции для хлофузана составил 3,2, для бензодифуразана – 9,3. При накожном применении хлофузан не кумулируется в организме животных, но при длительном применении в возрастающих дозах приводит к достоверному снижению массы тела опытных животных ($P < 0,001$).

Согласно гигиенической классификации Л.И.Медведа (1969) бензодифуразан при оральном введении относится к веществам со слабовыраженной кумуляцией, хлофузан – с умеренной.

3.6. Определение аллергенных свойств хлофузана

Аллергенные свойства хлофузана изучали на 15 кроликах обоего пола массой 2-2,5 кг. Перед опытом оценивали первично-раздражающее действие препарата путем однократных кожных аппликаций различных его разведений с целью определения концентрации, которая не вызывает реакцию кожи животных. В нашем опыте такой концентрацией является 0,1%.

Затем животных сенсибилизировали путем многократных аппликаций вещества на один и тот же участок кожи в 0,1 % концентрации. Первые признаки развивающегося дерматоза появились после десятикратной аппликации хлофузана и нанесение раствора было прекращено. Через 21 день после последней аппликации на кожу свежесстриженного участка спины наносили разрешающую дозу (1 мл) препарата в той же концентрации. Через 24 часа у 3 кроликов (20%) наблюдали слабую аллергическую реакцию в виде эритемы.

Результаты эксперимента показали, что хлофузан относится к слабым аллергенам.

3.7. Изучение отдаленных последствий действия хлофузана

Оценку мутагенного действия хлофузана изучали на примере His⁺ реверсий у ауксотрофного по гистидину штамма BA13 *Salmonella thyphimurium*, имеющего мутацию в гене hisG46. На первом этапе исследований определяли минимальную концентрацию, при которой полностью подавляется рост используемого штамма *Salmonella thiphimurium*. Для изучаемого препарата эта концентрация составила 200 мкг/мл.

На втором этапе проводили полуколичественное определение генных мутаций с внесением растворов препарата в слой полужидкого агара с метаболической активацией *in vitro*. Учет результатов проводили через 48 часов инкубации, подсчитывая число колоний ревертантов. При концентрациях хлофузана в минимально-глюкозной среде выше 0,5 мкг/мл наблюдается более низкое число мутантов в сравнении с контролем, что связано с превалированием токсичности препарата. При снижении концентрации число колоний ревертантов начинает расти с пиком при концентрации 0,1 мкг/мл. При дальнейшем снижении концентрации снижается и мутагенная активность.

Количество мутаций в опытных и контрольных чашках не различалось более чем в 2,5 раза, а, следовательно, хлофузан на использованной мутационной модели не проявляет мутагенного действия.

Согласно методике эмбриотоксического действия хлофузана определяли в два этапа. На первом этапе исследований выявляли эмбриолетальное и тератогенное действие терапевтической и высшей дозы хлофузана в виде 0,1% раствора в ДМСО на 30 беременных самках белых беспородных крыс. В качестве высшей принимали максимальную дозу, при которой не отмечается гибель и развитие видимых признаков интоксикации животных при длительном введении препарата. Для хлофузана высшая доза составляет 1/25 от установленной

ранее LD₅₀ или 64 мг/кг. Терапевтическая доза для различных животных не превышает 1/50 от LD₅₀ или 32 мг/кг.

Крысам четырех опытных групп (по 5 особей в каждой) наносили 0,1% раствор хлофузана накожно. Различным группам животных вводили препарат с 1-го по 6-й день, с 6-го по 16-й день и с 16-го по 19-й день беременности. При этом с 6-го по 16-й день беременности хлофузан наносили в высшей и терапевтической дозах, а в остальные сроки – в высшей дозе. Крысам 1-й контрольной группы вводили растворитель (ДМСО) в соответствующей дозе, а 2-я группа состояла из интактных беременных самок.

В течение беременности клиническое состояние животных опытных групп не отличалось от таковых контрольной группы. Результаты действия оценивали после эвтаназии и вскрытия самок на 20-й день беременности. При этом подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации в матке и количество живых, мертвых и резорбированных плодов. Плоды осматривали на наличие кровоизлияний и анатомических аномалий, взвешивали и определяли их кранио-каудальные размеры. Показателем эмбриолетальности служили пред- и постимплантационная эмбриональная смертность, показателем тератогенности – морфологические (анатомические) пороки развития, а также общая задержка развития плодов.

Введение 0,1% раствора хлофузана в высшей дозе (64 мг/кг) с шестого по шестнадцатый дни беременности приводит к достоверному снижению ($P < 0,001$) количества плодов у белых крыс по сравнению с контролем. Масса и кранио-каудальные размеры плодов этой группы также ниже, чем аналогичные показатели у крыс контрольной группы.

Введение раствора хлофузана в высшей дозе в первые шесть дней беременности не оказало отрицательного влияния на рост и развитие плодов. Их количество, а также масса и размеры были даже незначительно выше, чем у крыс контрольной группы (изменение не достоверно). Аналогичная картина наблюдается и при введении хлофузана в высшей дозе в последнюю треть беременности. Нанесение на кожу крыс раствора хлофузана в терапевтической дозе во вторую треть беременности не вызвало достоверного изменения в количестве плодов, а также в их массе и кранио-каудальных размерах.

При осмотре ни в одной опытной группе морфологических пороков развития плодов не выявлено, что позволяет сделать вывод об отсутствии тератогенного действия хлофузана. «Критическим» сроком, исходя из результатов вышеизложенного эксперимента, является вторая треть беременности. Согласно установленной схеме оценки выраженности эмбриотоксического действия препарата хлофузан не проявляет эмбриотоксического действия.

Целью второго этапа исследований является выявление нарушений эмбрионального развития, проявляющихся в постнатальном периоде жизни.

Десяти беременным самкам 1 раз в сутки наносили 0,1% раствор хлофузана в высшей дозе на кожу в течение всего периода беременности. Контрольная группа крыс получала растворитель (ДМСО).

В течение беременности клиническое состояние опытных животных не отличалось от контрольных. Продолжительность беременности колебалась от 20 до 22 дней вне зависимости от группы. Количество приплода, а также масса новорожденных крысят в опытной группе не отличались от аналогичных показателей в контрольной.

Для изучения скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания проводили специальные исследования (табл. 2).

Таблица 2

Результаты изучения созревания сенсорно-двигательных рефлексов

Дни наблюдений	Показатели	Дни формирования рефлексов в группах	
		контрольной	опытной
Со 2-го	Переворачивание на плоскости	8,3±0,39	8,5±0,32
С 5-го	Отрицательный геотаксис	7,4±0,36	7,3±0,35
С 6-го	«Избегание» обрыва	9,2±0,31	8,8±0,31
8-9	Поднимание головы и передних ног	8,9±0,25	8,6±0,17
9-11	Ползание	10,2±0,34	9,7±0,35
13-15	Опора на задние конечности, подъем всего тела	14,1±0,37	13,9±0,25

Результаты таблицы 2 свидетельствуют об отсутствии достоверного изменения скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов у крысят, получавших препарат в антенатальном периоде жизни по сравнению с крысками контрольной группы.

Подводя общий итог вышеизложенным исследованиям, делаем заключение об отсутствии нарушений эмбрионального развития, проявляющихся в постнатальном периоде жизни у крыс, получавших терапевтическую концентрацию хлофузана в высшей дозе.

3.8. Изучение влияния хлофузана на клинический статус, гематологические и биохимические показатели крови животных

Хлофузан в виде 0,1% раствора наносили на кожу опытных животных в течение 30 суток. Способ введения препарата соответствовал способу, рекомендованному для клинического применения. При выборе доз руководствовались результатами, полученными при исследовании острой токсичности препарата, а также максимальными суточными дозами, в которых препарат рекомендован для клинического применения. Высшую дозу препарата рассчитывали с учетом

параметров острой токсичности. Она составила 0,1 от LD₅₀ или 160 мг/кг. Минимальная доза соответствовала максимальной терапевтической дозе и составила 1/50 от LD₅₀ (32 мг/кг). Третья доза была промежуточной – 1/25 от LD₅₀ (64 мг/кг). Для контроля создавали две группы животных, одна из которых получала растворитель (ДМСО), вторая – воду.

В течение эксперимента клиническое состояние и масса тела крыс, получавших раствор хлофузана в дозах 32 мг/кг и 64 мг/кг не отличались от таковых контрольных животных. В контрольной группе масса тела к 30-му дню эксперимента увеличилась до 124,5±2,0 г (на 26,4%), в опытных группах – до 123,5±2,23 г (на 27,3%) и до 124,0±1,89 г (на 20,3%) соответственно.

У белых крыс, получавших раствор хлофузана в дозе 160 мг/кг масса тела на 30-й день эксперимента была ниже, чем у животных контрольной группы (P<0,05). Привес крыс в этой группе составил 16,5 г (16,2%), а в контрольной группе – 26 г (26,4%).

Влияние хлофузана на гематологический и биохимический состав периферической крови изучали на 20 кроликах живой массой 2-2,5 кг. Препарат наносили на кожу в виде 0,1% раствора (терапевтическая концентрация) в дозах 32 мг/кг и 64 мг/кг. Контрольным животным наносили диметилсульфоксид и воду.

Хлофузан при длительном накожном применении не вызывает достоверных изменений гематологических и биохимических показателей.

Для изучения патоморфологических изменений в органах и тканях белых крыс при длительном применении хлофузана животным первой и второй групп препарат наносили на кожу в виде 0,1% раствора в дозах 64 мг/кг и 32 мг/кг, животным третьей группы – в виде 20 % раствора в дозе 400 мг/кг. Контрольные животные получали дистиллированную воду.

Достоверных изменений относительной массы внутренних органов опытных животных по сравнению с контролем не обнаружено.

При гистологическом исследовании органов у белых крыс, получавших хлофузан в дозе 400 мг/кг (1/4 от LD₅₀) выявлены следующие изменения. В печени внутридольковые капилляры расширены, заполнены кровью. Встречаются гепатоциты с ядрами в состоянии пикноза. В почках отмечается застойная гиперемия, некроз эпителия отдельных извитых канальцев. В участке кожи, контактировавшем с препаратом, кровеносные сосуды расширены и переполнены кровью.

Гистологическое исследование органов у белых крыс, получавших хлофузан в дозе 32 мг/кг и 64 мг/кг, не выявило каких-либо изменений во внутренних органах.

Таким образом, хлофузан в дозах 32 мг/кг (средняя терапевтическая доза) и 64 мг/кг при длительном применении (30 суток) не вызывает морфологических изменений во внутренних органах у белых крыс.

3.9. Разработка лекарственных форм и изучение лечебной эффективности хлофузана при кожных болезнях животных

Для лечения кожных болезней акарозной и микотической этиологии разработаны лекарственные формы: 0,1% спиртовой раствор хлофузана, 0,1% суспензия хлофузана, 0,1% мазь хлофузана.

При разработке стойких суспензий в качестве поверхностно-активного вещества нами использовались ПЭО-400 и стеарокс-6. Для приготовления суспензии навеску исследуемого вещества растирали в ступке с эмульгатором в различных соотношениях и по каплям добавляли дистиллированную воду. Установлено, что хлофузан образует стабильную суспензию при использовании в качестве эмульгатора стеарокса-6 в соотношении 1:0,5 (1 часть хлофузана и 0,5 части стеарокса-6). С ПЭГ-400 суспензии получаются менее стабильными.

Для разработки мазевых форм в качестве основы использовали ПЭО-400. Для приготовления мази навеску хлофузана растворяли в спирте этиловом в соотношении 1:1 и доливали полиэтиленоксид до необходимого объема.

Кроме того, для лечения отодектоза плотоядных животных были разработаны ушные капли – раствор хлофузана в 70% спирте этиловом.

Терапевтическая эффективность хлофузана изучена при псороптозе кроликов, отодектозе и микроспории кошек.

Диагноз на псороптоз, отодектоз, микроспорию и трихофитию ставили на основании эпизоотологических данных, клинических признаков и результатов исследования соскобов, взятых с мест поражения. Предварительный анализ на микроспорию ставили на основании люминесцентного анализа.

Для изучения лечебной эффективности хлофузана при псороптозе больные кролики были разделены на четыре группы: в первой группе животных обрабатывали 0,5% спиртовым раствором исследуемого вещества, во второй – 0,25%, в третьей – 0,1%, а в четвертой – 0,05% раствором.

Изучаемый препарат применяли на участки поражения без предварительной подготовки по одному разу в день, двух-трехкратно с интервалом в 3 дня. Интервал применения выбирался исходя из срока созревания яиц. Для клещей рода *Psoroptes* он составляет от 3,5-4,5 суток (для яиц, в которых формируются самки) до 5-6,5 суток (для яиц, в которых формируются самцы). На следующий день после применения препарата подсохшие корочки удаляли и просматривали под микроскопом на наличие клещей. Через 15-20 суток после первой обработки проводили повторное взятие и исследование соскобов.

Полное выздоровление кроликов наступало на 4-5-й день, в случаях осложнения течения псороптоза гнойным отитом – на 7-8-й день. В четвертой группе полного выздоровления не наступало даже после трехкратного применения препарата (в соскобах обнаруживались клещи).

Следовательно, 0,1% спиртовой раствор хлофузана при двух-трехкратной обработке с интервалом в три дня не оказывает отрицательного влияния на об-

шее состояние кроликов и обеспечивает полное выздоровление животных в течение 5-8 дней.

Собакам применяли 0,1% спиртовой раствор хлофузана 1 раз в день, который наносили на внутреннюю поверхность ушных раковин с последующим массажем их основания. Отторжение корочек, прилипших к поверхности ушных раковин, начиналось на 1-2 сутки лечения. После отторжения корочек внутренняя поверхность ушных раковин становилась розовой, влажной и безболезненной. Выздоровление животных наступало после 3-4 кратной обработки на 5-7 день после первого применения препарата. Хлофузан не раздражал кожу и не вызывал побочных местных и общих эффектов.

При отодектозе кошек препарат применяли аналогично. На 2-4 день после первого применения препарата внутренняя поверхность ушных раковин становилась влажной и безболезненной. Выздоровление животных наступало после 2-3 кратной обработки.

Следовательно, 0,1% спиртовой раствор хлофузана при 2-4 кратном применении обеспечивает выздоровление животных от отодектоза, не вызывая при этом местных и общих побочных действий.

При микроспории кошек на пораженные и прилегающие участки кожи наносили 0,1% мазь хлофузана один раз в день через день. В зависимости от степени поражения кратность применения препарата составила от 3-4-х до 6. После применения хлофузана отмечается слабая гиперемия обработанных участков кожи. При повторных применениях восстанавливается эластичность кожи, отмечается отторжение корочек, а на 7-11 дни восстанавливался рост волос. Хлофузан не раздражал кожу и не вызывал побочных местных и общих эффектов.

Таким образом, хлофузан является эффективным средством для лечения микроспории кошек при 3-6-кратном применении с интервалом в один день, не вызывая при этом местных и общих побочных действий.

4. ВЫВОДЫ

1. Замещенные бензодифуразана обладают выраженными антимикробными, антимикотическими, акарицидными свойствами. Наиболее активными соединениями являются бензодифуразан ($СК_{50}$ – 0,0125%; МБСК – 0,1%; МФСК – 0,125%), хлорбензодифуразан ($СК_{50}$ – 0,03%; МБСК – 0,1%; МФСК – 0,1%), аминокбензодифуразан ($СК_{50}$ – 0,125%; МБСК – 0,05%; МФСК – 0,25%), фуросанобензофуразан ($СК_{50}$ – 0,004%; МБСК – 0,025%; МФСК – 0,05%), хлофузан ($СК_{50}$ – 0,0063%; МБСК – 0,05%; МФСК – 0,0125%).
- 1.1. Моно-N-окиси бензодифуразана (фуросанобензофуразан, хлофузан и др.) проявляют более выраженную антимикробную и противопаразитарную активность, чем их бескислородные аналоги.

- 1.2. Наличие нитро-группы в молекуле бензодифуразана снижает акарицидную активность производных.
2. Бензодифуразан, хлорбензодифуразан, хлофузан относятся к соединениям III класса токсичности. Их ЛД₅₀ для белых крыс при пероральном введении составляют 330±47,8 мг/кг, 547±79,9 мг/кг и 763 ± 50,4 мг/кг. При накожном применении ЛД₅₀ хлофузана равна 1600 мг/кг. Коэффициент кумуляции хлофузана при пероральном введении - 3,2, при накожном применении кумулятивное действие отсутствует.
3. Хлофузан не обладает аллергенным и мутагенным действием (тест Эймса), не оказывает раздражающего действия на кожу.
4. При накожном применении хлофузан в дозах 32 и 64 мг/кг не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия.
5. Хлофузан при накожном применении в дозе 64 мг/кг (0,1% раствор в диметилсульфоксиде) не оказывает отрицательного влияния на живую массу, морфологический и биохимический состав крови кроликов.
6. Хлофузан в виде 0,1% спиртового раствора является эффективным средством для лечения псороптоза кроликов, отодектоза собак и кошек.
 - 6.1. Оптимальной схемой лечения кроликов при псороптозе является двух-трех кратная с интервалом в три дня обработка пораженных участков кожи 0,1% спиртовым раствором хлофузана, а при отодектозе интервал между обработками – не более 24 часов.
7. Четырех-пяти кратное применение 0,1% мази хлофузана на пораженные участки кожи с интервалом в 24 часа обеспечивает полное выздоровление кошек при микроспории.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. При синтезе новых соединений – производных бензодифуразана и бензофуросана с целью получения новых биологически высокоактивных препаратов рекомендуется учитывать влияние вводимых в молекулу радикалов на антимикробные, антигрибные и акарицидные свойства.
2. Для лечения псороптоза кроликов рекомендуется применять 0,1% спиртовой раствор хлофузана 2-3 раза с интервалом в три дня.
3. Разработано «Временное наставление по применению препарата хлофузан при акарозах и дерматомикозах животных» (Утвержденное Главным управлением ветеринарии Кабинета министров Республики Татарстан 2 апреля 2003 г.).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Каримова Р.Г., Гарипов Т.В., Ефимов С.И. Акарицидная активность 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразана и его производных. // Незаразные болезни животных: Материалы науч. конф., посвящ. 70-летию образования зооинженерного факультета. - Казань, 2000. - С. 274.
2. Каримова Р.Г. Бактериостатическая активность бензодифуразанов. // Материалы науч.-производ. конф. по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. - Казань, 2001. - С.43.
3. Каримова Р.Г., Гарипов Т.В. Токсикологическая оценка замещенных бензодифуразана. // Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии: Материалы науч.-практ. конф., посвященной 55-летию ГУ Краснодарской НИВС. - Краснодар, 2001. - С.89.
4. Каримова Р.Г., Гарипов Т.В. Бензодифуразан и его кумулятивные свойства. // Материалы конф. ветеринарных фармакологов и токсикологов, посвященной 125-летию Н.А. Сощественского. - Казань, 2001. - С.53-54.
5. Каримова Р.Г. Хлорфуроксанопроизводное бензодифуразана и его кумулятивные свойства. // Материалы IV науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов РТ. - Казань, 2001. - С. 76.
6. Каримова Р.Г. Острая токсичность производных бензодифуразана. // Материалы итоговой конф. республиканского конкурса на соискание премии имени Н.И. Лобачевского. - Казань, 2002. - С. 171-172.
7. Каримова Р.Г., Гарипов Т.В., Рахимова Р.М. Острая токсичность хлорпроизводного фуоксанобензофуразана. // Материалы науч.-производ. конф. по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. - Казань, 2002. - С.102-103.
8. Каримова Р.Г., Гарипов Т.В. Токсические свойства хлорпроизводного фуоксанобензофуразана. // Новые фармакологические средства в ветеринарии: Материалы науч.-практ. конф. - СПб.: СПбГАВМ, 2002.

Подписано к печати 28.05.03
Заказ 43 Тираж 100 экз.
Бумага офсетная

Формат 60x84/16
Усл.-печ. л. 1,0
Печать RISO

{
f
}

2

-

{
}

{
}

2
3

1

f

1

{
}

1

10628

2003-A

10628