

На правах рукописи

ШИНДАЛА МОХАММАД КХАЛИД

ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЯ

5,7-ДИЗАМЕЩЕННЫХ-4,6-ДИНИТРОБЕНЗОФУРОКСАНА

16.00.04 - Ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters, likely representing the author's name.

Казань-2004

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор
Гарипов Талгат Валирахманович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Тремасов Михаил Яковлевич

доктор ветеринарных наук,
профессор
Софронов Владимир Георгиевич

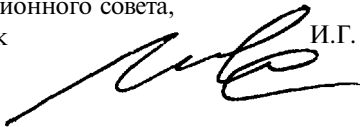
Ведущая организация: Чувашская государственная
сельскохозяйственная академия

Защита состоится «11» июня 2004 года в «13» часов на
заседании диссертационного совета Д-220.034.02 при ФГОУ ВПО
«Казанская государственная академия ветеринарной медицины им.
Н.Э. Баумана» (420074, г. Казань, Сибирский тракт, 35, ФГОУ ВПО
«КГАВМ»).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан «1» июня 2004 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук

 И.Г. Галимзянов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Микозы и саркоптоидозы широко распространены среди всех видов животных (А.И. Ятусевич, 1999; С.М. Федоров, М.Н. Шеклакова, 2001 и др.). Пораженность акарозами и дерматомикозами у собак и кошек составляет 32 - 45% от общего числа больных животных (В.С. Шеховцев, И.А. Машкей и др., 1997; Н.Ф. Фирсов, Г.А. Каратунов, 1999; Л.Н. Гордиенко, Е.В. Пильшик, 1999 и др.).

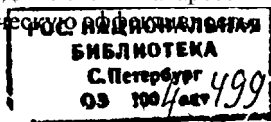
Имеющиеся средства для лечения дерматомикозов и саркоптоидозов из-за высокой токсичности для теплокровных животных, недостаточной эффективности при применении в разных климатических условиях, отрицательного действия на структуру кожи, эмбриотоксичности или иных отрицательных последствий действия не удовлетворяют отечественную ветеринарную практику. Поэтому изыскание перспективных малотоксичных и эффективных соединений для лечения и профилактики паразитарных и инфекционных болезней кожи животных на сегодняшний день остается актуальной задачей ветеринарии.

В настоящее время поиск новых акарицидов ведется на основе ранее известных соединений (фосфорорганические соединения, хлорорганические соединения, авермектины, пиретроиды и другие), а также среди бензофуруксанов - перспективных источников разработки новых фунгицидных и акарицидных препаратов.

Цель и задачи исследований. Основная цель исследований - изучение биологической активности, фармако-токсических свойств 5,7-дизамещенных-4,6-динитробензофуруксана и разработка эффективного средства для лечения дерматомикозов и саркоптоидозов животных.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить физико-химические свойства замещенных динитробензофуруксана.
2. Определить биологическую активность производных динитробензофуруксана и выявить наиболее перспективное соединение.
3. Определить параметры токсичности, кумулятивные свойства одного из производных динитробензофуруксана, обладающего выраженной биологической активностью.
4. Изучить влияние наиболее перспективного соединения на общее состояние, морфологический и биохимический состав крови, состояние центральной нервной системы лабораторных животных, определить наличие и характер гистоморфологических изменений, возникающих в организме животных после его применения
5. Определить отдаленные последствия действия производного динитробензофуруксана на организм животных.
6. Разработать лекарственные формы, дозы и схемы применения производного динитробензофуруксана для лечения акарозов и дерматомикозов животных, изучить терапевтическую эффективность



Научная новизна. Впервые установлено, что замещенные динитробензофураксана (всего 14 соединений) проявляют антимикробную, антимикотическую и акарицидную активность. Определены параметры токсичности 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана. Доказано отсутствие отрицательного влияния его на общее состояние, гематологический состав, функциональное состояние центральной нервной системы, морфологию тканей животных при однократном и длительном применении. Показано отсутствие отдаленных последствия действия (мутагенность, эмбриотоксичность) 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана на организм животных. Разработаны лекарственные формы и схемы применения замещенного динитробензофураксана при псороптозе кроликов, отодектозе и микроспории собак и кошек.

Практическая ценность. Результаты исследований могут быть использованы для целенаправленного синтеза новых биологических активных соединений в ряду динитробензоураканов. Практические разработки диссертации рекомендуются использовать в учебной работе при чтении лекций, по химии биологических активных соединений. В ветеринарную практику рекомендован новый препарат «Эктоцид», обладающий широким спектром действия в отношении возбудителей кожных болезней животных. «Эктоцид» в виде 0,1% мази обеспечивает полное выздоровление животных при псороптозе, отодектозе и микроспории.

. Апробация работы. Материалы диссертации обсуждены и получили положительную оценку на международной научно-производственной конференции по актуальным проблемам агропромышленного комплекса (Казань, 2003), международной конференции «Химия и биологическая активность кислорода- и серосодержащие гетероциклы» (Черноголовка, 2003).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- 5,7-дизамещенные-4,6-динитробензофураксана проявляют выраженную антимикробную, антимикотическую и акарицидную активность;
- 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксан малотоксичен, не кумулируется в организме животных при длительном применении;
- 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксан в рекомендуемой концентрации и кратности применения не оказывает отрицательного действия на общее состояние, состав крови, морфологию тканей, состояние центральной нервной системы животных, не обладает мутагенным, эмбриотоксическим действием;
- 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана в виде 0,1% мази обеспечивает высокий терапевтический эффект при псороптозе кроликов, отодектозе и микроспории собак и кошек.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на ... страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических предложений и списка литературы. Работа иллюстрирована 5 рисунками и содержит 10 таблиц.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в 2001-2004 гг в условиях лаборатории кафедры физиологии и этологии животных ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» согласно плану научных исследований по прилагаемой схеме (рис.1).

Объектами исследований служили 14 соединений (5,7-дизамещенные-4,6-динитробензофураксана), направленно синтезированные на кафедре ХТО-СА КГТУ с целью поиска новых биологически активных соединений. В качестве растворителя соединений в экспериментах использовали диметилсульфоксид (димексид, Р.75.244.9), для приготовления суспензии — стеарокс-6 (ГОСТ 8980-75).

Экспериментальная часть работы выполнена на 30 белых беспородных мышах, 200 белых беспородных крысах, 36 кроликах.

Определение бактериостатической активности препаратов *in vitro* проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде (С.Н.Милованова, 1971). Бактерицидную активность 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана 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). Бактериостатические и бактерицидные свойства определяли визуально по отсутствию роста культуры в пробирках после суточной и пятисуточной инкубации при температуре 37°C.

Антимикотическое действие 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана определяли по отношению к *Trichophyton gypseum* и *Microsporum lanosum* методом серийных разведений (С.Н.Милованова, З.Г.Степанищева, 1971).

Акарицидную активность препаратов определяли на клещах *Psoroptes cuniculi*, выделенных из свежих соскобов по методу Алфимовой А. В. (1949). Клещей подвергали воздействию водных суспензий препаратов в концентрациях от 0,00025% до 0,5%, контрольных - 0,5 % раствора стеарокса.

Об акарицидной активности препаратов судили по показателю $СК_{50}$, которую высчитывали по формуле Кербера С. (1931).

Острую токсичность 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана («Эктоцида») изучали на белых беспородных крысах живой массой 150-200 г, белых беспородных мышах живой массой 18-25 г. Соединения вводили однократно в различных дозах в виде 10 % водной суспензии внутривентрально. Контрольным животным вводили раствор эмульгатора в дистиллированной воде или растворитель. Расчеты параметров острой токсичности проводили по методу Миллера и Тейнтера (1944).

Определение раздражающих свойств «Эктоцида» на кожу и слизистые оболочки осуществляли при ежедневном нанесении препарата в течение 25 дней методом (Методические указания, 1985).

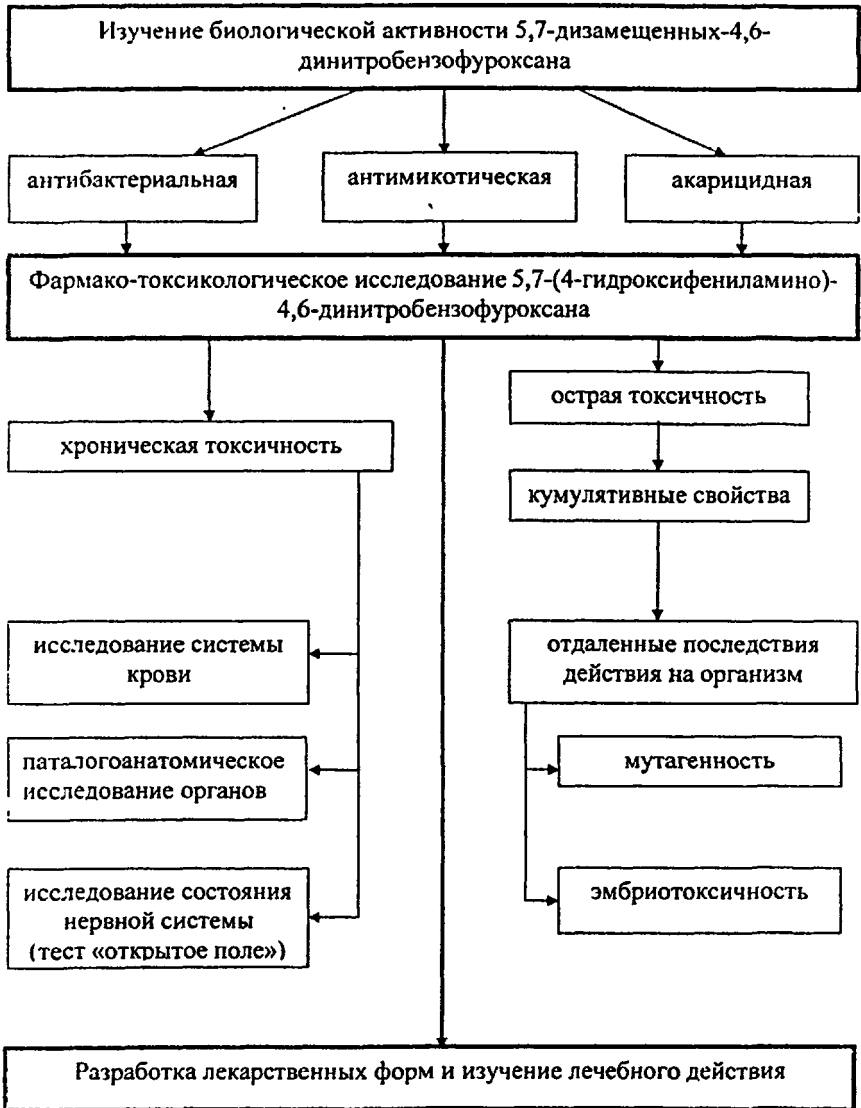


Рис. 1. Общая схема исследований

Кумулятивные свойства определяли по методу «субхронической токсичности» (Lim R.K., Rink K.G., Glass H.G., Soaje-Echague E., 1961). Контрольным животным вводили 2 % раствор эмульгатора. Расчет коэффициента

кумуляции производили по формуле, предложенной Ю.С. Каганом и П.В.Станкевичем (1970).

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

Оценку мутагенного действия замещенного динитробензофураксана изучали на примере **His⁺** реверсий у ауксотрофного по гистидину штамма *Вa 13 Salmonella thymphimurium*, имеющего мутацию в гене *hisG46*.

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

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

Влияние замещенного динитробензофураксана на морфологический и биохимический состав периферической крови изучали по общепринятым методикам. Изучение влияния «Эктоцида» на функциональное состояние нервной системы осуществляли тест-методом «открытое поле» на белых крысах.

Клинические испытания препарата проводили в условиях учебно-опытного хозяйства ФГОУ ВПО «КГАВМ» и ветеринарных клиник районов г. Казани.

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Физико-химические свойства 5,7-дизамещенных-4,6-динитробензофураксана.

5,7-дизамещенные-4,6-динитробензофураксана по внешнему виду представляют собой порошки оранжевого или темно-красного цвета, не растворимые в воде, хорошо растворимые в органических растворителях (диметилсульфоксид, изопропиловый спирт и др.). 5,7-бис(4-гидрокси-фениламино)-4,6-динитробензофураксан - твердое кристаллическое вещество темно-красного цвета, с температурой плавления 195-196°C. Соединение хорошо растворяется в диполярном растворителе - диметилсульфоксиде, в полярных растворителях — ацетонитриле, диоксане, а также в ацетоне. Плохо растворяется в изопропиловом спирте, этиловом спирте, не растворяется в воде.

Нами совместно с Спатловой Л.В. изучено действие 0,4% соляной кислоты и 5% раствора бикарбоната натрия на структуру 5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана. Реакция с 0,4% соляной кислотой протекала с образованием осадка темно-красного цвета, при действии на 5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксан щелочным раствором при комнатной температуре наблюдалось мгновенная реакция, которая протекала с образованием осадка ярко красного цвета. Осадки представляют собой твердые кристаллические вещества с соответствующей окраской.

Для установления структуры полученных осадков нами была использована ИК-спектроскопия. ИК - спектры записывали на двухлучевом спектрометре UR-20 в области 400 - 4000 см⁻¹.

В литературе есть сведения о том, что при действии кислот и щелочей реакция протекает с нарушением фуруксанового цикла. Полученные нами результаты подтверждают это утверждение. Предположительно происходит размыкание фуруксанового кольца по слабой внутрициклической связи N(0)-O и в зависимости от природы второго реагента размыкание заканчивается образованием продуктов разных типов. В случае 5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофукурксана, по-видимому, происходит реакция гидролиза.

3.2. Биологическая активность замещенных динитробензофукурксана

3.2.1. Антибактериальная активность

Антибактериальную активность замещенных динитробензофукурксана изучали на патогенных штаммах *E.coli* и *St. aureus*. Показателем бактериостатической активности служила минимальная бактериостатическая концентрация (МБСК).

Замещенные динитробензофукурксана обладают выраженным антимикробным действием. Введение атома хлора к ароматическому ядру замещающего амина приводит к увеличению антибактериальной активности (МБСК - 0,03 %) по сравнению с метоксильными производными, а введение второго атома хлора в мета-положение к первому повышает антибактериальную активность в 15 раз (МБСК - 0,002 %). Если второй атом хлора введен в орто-положение к первому, бактериальная активность повышается не столь значительно (МБСК - 0,004 %). Такая же активность (МБСК - 0,004 %) достигается при введении в качестве заместителей гидроксильных групп, как в орто-, так и в пара- положении.

Введение в пара-положение атома брома к ароматическому ядру замещающего амина приводит к снижению антибактериальной активности по сравнению с хлорпроизводными (МБСК - 0,06 %). Такая же активность (МБСК - 0,06 %) достигается и при введении 4- карбоксиэтилфениламинной группы. Минимальная бактериостатическая концентрация составляет 0,5 % при введении в ароматическое ядро замещающего амина 2-аменидифенильной группы, а в случае введения групп аминоксизобензола, 4-аминодифенила, 2-метил-5-хлоранилина увеличивается до 0,25 %, при введении метоксильной группы - до 0,125%.

Наиболее активным бактериостатиком среди изученных соединений является 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофукурксан, который задерживает рост *St. aureus* и *E .coli* в концентрации 0,004 %.

У 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофукурксана была изучена бактерицидная активность. Установлено, что замещенное динитробензофукурксана *in vitro* проявляет стабильную бактерицидную активность в от-

ношении использованных тест микробов при экспозиции 60 минут в концентрации 0,5 %.

3.2.2. Антимикотическая активность

Фунгистатическую активность замещенных динитробензофураксана определяли на *Microsporium lanosum* и *Trichophyton gypseum*.

Установлено, что фунгистатическая активность производных бензофураксана зависит от положения заместителей в ароматическом ядре замещающего амина динитробензофураксана. Так, при наличии в пара - положении метоксильной группы производные динитробензофураксана проявляют высокую фунгистатическую активность (МФСК - 0,006%). При введении метоксильной группы в орто - положение фунгистатическая активность снижается в 10 раз (МФСК — 0,06%). При введении атома хлора в орто - положение в ароматическом ядре замещающего амина динитробензофураксана минимальная фунгистатическая концентрация составляет 0,002%. Такая же активность (МФСК - 0,002%) достигается и при замене атома хлора на гидроксильную группу в орто - положении, а в случае введения второго атома хлора в орто - положение к существующему приводит к снижению фунгистатической активности в 2 раза (МФСК — 0,004 %). Однако, введение второго атома хлора в мета - положение приводит к снижению фунгистатической активности в 3 раза (МФСК - 0,006 %). Замена атома хлора на атом брома в пара - положении снижает фунгистатическую активность в 6,25 раза (МФСК - 0,0125%). Минимальная фунгистатическая концентрация составляет 0,003% при введении в ароматическое ядро замещающего амина динитробензофураксана 4-карбосиэтилфенильной или 4-аминодифенильной групп, а в случае введения аминоксобензольной группы - 0,015%. Однако, при замене аминоксобензольной группы на 2-аминодифенильную фунгистатическая активность снижается в 8,4 раза (МФСК - 0,025%).

5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксан обладает самой высокой фунгистатической активностью среди замещенных динитробензофураксана. МФСК этого соединения по отношению к *Microsporium lanosum* составляет 0,00075 %, к *Trichophyton gypseum* - 0,003%.

У этого соединения была изучена фунгицидная активность. 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксан *in vitro* проявляет стабильную фунгицидную активность при 15 минутной экспозиции. Минимальная фунгицидная концентрация при указанной экспозиции составила для *M. lanosum* - 0,0015%, для *T. gypseum* - 0,025%.

3.2.3. Акарицидная активность

Изученные соединения обладают выраженным акарицидным действием. При введении атома хлора в орто-положение в ароматическом ядре замещающего амина динитробензофураксана $СК_{50}$ составляет 0,004%, а в случае введения второго атома хлора в орто-положение к первому акарицидная активность снижается в 3,5 раза ($СК_{50}$ - 0,014%). Однако, введение атома хлора относительно метильной группы в пара - положение приводит к снижению акарицидной активности в 7,5 раза ($СК_{50}$ - 0,03). Замена атома хлора на атом брома в пара-положение снижает акарицидную активность в 11,5

раз ($СК_{50} - 0,046$). Среднесмертельная концентрация для клещей *Psoroptes cuniculi* составляет 0,1% при введении в ароматическое ядро замещающего амина динитробензофураксана 2-метоксифениламинной, 4-метил-3-хлорфениламинной, 4-карбосиэтилфенильной, 3,5-дихлорфениламинной. 2-аминодифенильной групп, а в случае введения аминоксизольной группы акарицидная активность снижается в 2 раза ($СК_{50} - 0,2\%$). Однако, при замене аминоксизольной группы на 4-метоксифениламинную акарицидная активность снижается в 5 раз ($СК_{50} - 0,5\%$).

Таким образом, замещенные динитробензофураксана обладают выраженным акарицидным действием. Среди изученных соединений самой высокой акарицидной активностью обладают 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксан ($СК_{50} - 0,0009\%$) и 5,7-(2-гидрокси-фениламино)-4,6-динитробензофураксан ($СК_{50} - 0,0013\%$).

Таким образом, самая высокая биологическая активность характерна для гидроксильных производных динитробензофураксана. Фармакотоксические свойства 5,7-(2-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксана («Эктоцида») были изучены подробно.

3.3. Определение параметров острой токсичности «Эктоцида»

Острую токсичность «Эктоцида» изучали на 30 беспородных белых мышах обоего пола живой массой 18-25 г путем однократного введения в желудок 10% водной суспензии исследуемого соединения в дозах от 1000 до 5000 мг/кг, контрольным животным - 1 % раствор эмульгатора.

Однократное пероральное введение исследуемого препарата в дозе до 3000 мг/кг не вызывало изменений в поведении и общем состоянии животных. Эту дозу мы приняли за максимально переносимую (МПД). В течение 10 суток после введения препарата животные оставались подвижными, активными, хорошо поедали корм.

По мере увеличения доз исследуемого препарата (3500-5000 мг/кг) отмечалось общее угнетение животных. Мыши забивались в угол, потирали лапами мордочку, встряхивали головой, выгибали спину. Последнее может быть вызвано раздражением рецепторов слизистой желудка. Гибель животных наступала через 8-36 часов после введения препарата.

При патологоанатомическом исследовании погибших животных были отмечены асфиксическое сердце, гиперемия и отек легких, полнокровие слизистых оболочек желудка и тонкого отдела кишечника, печени и почек.

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

Таблица 1. Параметры острой токсичности «Эктоцида» при введении в желудок

Вид животных	Дозы, мг/кг		
	$ЛД_{16}$	$ЛД_{50}$	$ЛД_{84}$
белые мыши	3150	$3850 \pm 353,7$	4650

Согласно ГОСТ 12.1.007-76, «Эктоцид» относится к веществам III класса токсичности.

Введение «Эктоцида» в дозе 3000 — 6000 мг/кг в виде 10% водной суспензии в желудок белым крысам не вызывало каких-либо изменений в их поведении и общем состоянии. Параметры острой токсичности не были определены, так как объем суспензии токсических доз превышал объем, допустимый для введения в желудок. По такой же причине нами не установлены параметры токсичности замещенного динитробензофураксана при на-кожном применении.

3.4. Выяснение кумулятивного действия «Эктоцида»

Исследования проводили на 30 белых беспородных крысах обоего пола живой массой 150-200 г. Животным вводили исследуемый препарат в желудок в виде 5% водной суспензии в дозе 2 мг/кг и 20 мг/кг. Контрольной группе животных вводили 2% раствор эмульгатора (стеарокс-6).

В первой группе при многократном введении препарата в возрастающих дозах от 2 мг/кг до 22,8 мг/кг гибели подопытных крыс не наблюдали. За весь опытный период животные получили 257,5 мг/кг исследуемого соединения, что в 128,7 раз превышает лечебную дозу. Первые клинические признаки отравления наблюдались на 21-й день после введения «Эктоцида» в дозе 15,19 мг/кг, суммарная доза при этом составила — 120,69 мг/кг. Симптомы отравления проявлялись через 15-20 минут и характеризовались незначительным угнетением общего состояния животных. Спустя 2-3 часа состояние животных было удовлетворительным, они хорошо поедали корм и пили воду. Начиная с 23 суток и до конца опыта (28 сутки) животные после введения препарата находились в состоянии угнетения, отказывались от корма, забивались в угол. Эти признаки исчезали через 3-5 часов. Отсутствие гибели подопытных животных в течение всего периода эксперимента свидетельствует о том, что препарат не кумулируется в организме.

Во второй группе при многократном введении препарата в возрастающих дозах от 20 мг/кг (в 10 раз превышающей лечебную дозу) до 227,82 мг/кг гибель одной крысы наступила от суммарной дозы - 1206,875 мг/кг. За весь период животные получили 2573,75 мг/кг препарата. Первые клинические признаки отравления проявились на 11-й день после введения замещенного динитробензофураксана в суммарной дозе - 335 мг/кг. При этом животные беспокоились, пытались зарыться в подстилку что, возможно, является следствием воздействия суспензии исследуемого препарата на рецепторы слизистой желудка. Начиная с 18 суток и до конца опыта, у белых крыс отмечали состояние угнетения, взъерошенность шерсти, временный отказ от корма. Всего погибли 2 крысы: одна от суммарной дозы 1662, 5 мг/кг, а другая от суммарной дозы 2573,75 мг/кг.

Результаты эксперимента показывают, что в дозах в 10 раз превышающих лечебную «Эктоцид» не обладает кумулятивным свойством.

3.5. Определение местного действия «Эктоцида» на слизистые оболочки и кожу

Действие «Эктоцида» на слизистые оболочки определяли путем нанесения 2 капель 0,1 % суспензии на конъюнктиву глаза кроликов в течение 10 дней. Состояние животных оценивали через 5, 30, 60 минут после нанесения препарата ежедневно в течение 10 дней.

При нанесении суспензии замещенного динитробензофураксана на слизистую оболочку глаза отмечали гиперемию, сохраняющуюся 4-5 часов, слезотечение, продолжающееся 1-2 часа. В последующие сроки наблюдения никаких патологических изменений не обнаруживали. У животных контрольной группы, которым вводили раствор стеарокса-6, наблюдалась незначительная гиперемия, слезотечение, прекращающееся в течение 15-20 минут.

Местное действие «Эктоцида» на кожу изучали на 25 белых беспородных белых крысах живой массой 150-200 г. Крысам применяли растворы препарата в диметилсульфоксиде в концентрации 0,1 и 1 % и в 70% спирте этиловом в таких же концентрациях; а также 0,1% суспензию препарата на стеароксе-6 в течение 25 дней. За подопытными животными вели клиническое наблюдение в течение двух месяцев (определяли эластичность кожи, наличие воспалительных процессов, отека, утолщения кожной складки, шелушения, изъязвления, некроза, расчесов).

У крыс, которым применяли 0,1%-й раствор препарата в диметилсульфоксиде, симптомы раздражающего действия не обнаружены. При применении 1%-го раствора, наблюдалось раздражение кожи, о чем свидетельствовала гиперемия, сохранявшаяся 4-6 дней после последнего нанесения. Кожа теряла свою эластичность, становилась сухой, утолщалась, наблюдалось шелушение эпидермиса и образование корочки. Спустя 25 дней после прекращения применения препарата происходило отторжение корочек вместе с шерстью, обнажалась молодая кожа, которая вновь начинала покрываться шерстью. У крыс, которым применяли 0,1%-й раствор препарата в 70 % спирте этиловом, отмечалась незначительная гиперемия кожи. 1%-й раствор препарата в 70 % спирте этиловом вызывал незначительную гиперемию, расчесы, на месте которых выступали капли крови. Отмеченные клинические признаки начинали проявляться на девятый день применения препарата. При нанесении на кожу 0,1% суспензии замещенного динитробензофураксана отмечалась незначительная гиперемия кожи, которая сохранялась в течение 2-3 дней после последнего применения препарата.

Таким образом» установлена зависимость степени раздражающего действия «Эктоцида» от концентрации. В высоких концентрациях (1 % растворы в ДМСО и этиловом спирте) замещенное динитробензофураксана вызывает различные обратимые изменения кожи (гиперемия, шелушение эпидермиса, образование корочки), а в лечебной концентрации не оказывает отрицательного воздействия на кожу и слизистые оболочки животных.

3.6. Выявление аллергизирующего действия «Эктоцида»

Аллергенные свойства замещенного динитробензофуроксана изучали на 10 кроликах массой 2-2,5 кг. Перед опытом оценивали первично-раздражающее действие препарата путем однократных накожных аппликаций различных его разведений с целью определения концентрации, которая не вызывает реакцию кожи животных. Для «Эктоцида» это 0,1 %.

Затем животных сенсибилизировали путем многократных аппликаций вещества в 0,1 % концентрации на один и тот же участок кожи. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид. На поверхность кожи наносили 0,1 мл раствора замещенного динитробензофуроксана, выдерживали 4 часа и смывали дистиллированной водой. На 30-й день нанесения препарата у кроликов наблюдалась слабая гиперемия кожи, и нанесение раствора было прекращено. Через 21 день после последней аппликации на кожу свежестриженного участка спины наносили разрешающую дозу (1 мл) препарата в той же концентрации. Учет реакции проводили через 24 часа. Признаков аллергической реакции у экспериментальных животных не выявили. Следовательно, «Эктоцид» не обладает аллергизирующим действием.

3.7. Изучение отдаленных последствий действия «Эктоцида»

Эмбриотоксическое действие «Эктоцида» или отсутствие такового выявляли путем накожной аппликации в дозе 2 мг/кг в виде 0,1% раствора в ДМСО 60 беременным самкам с 1-го по 10-й день, 11-го по 19-й день и с 1-го по 19-й день беременности. Контрольным крысам наносили на кожу диметилсульфоксид, а также была группа интактных белых крыс.

Эмбриотоксическое действие выявляли после эктаназии и вскрытия самок на 20-й день беременности по 6 животных из контрольной и каждой опытной группы. При этом подсчитывали в матке число живых и мертвых плодов, мест имплантации, в яичнике — количество желтых тел. Плоды взвешивали, измеряли длину плода и осматривали на наличие анатомических аномалий и кровоизлияний. Показателем эмбриолетальности считали пред- и постимплантационную эмбриональную смертность, показателем тератогенности - морфологические (анатомические) пороки развития, а также общую задержку развития плодов.

Выявлено, что нанесение на кожу 0,1 % раствора «Эктоцида» в терапевтической дозе с 1 - 10, с 11 - 19, с 1-19 дни беременности не вызвало достоверных изменений в росте, развитии и количестве плодов, а также в их массе и краниокаудальных размерах по сравнению с контролем. При осмотре ни в одной опытной группе морфологических пороков развития плодов не выявлено, что говорит об отсутствии тератогенного действия препарата.

Для выявления нарушений эмбрионального развития, проявляющихся в постнатальном периоде жизни, вели наблюдение за оставшимися белыми крысами.

В течение беременности клиническое состояние животных опытных групп не отличалось от таковых контрольной группы. Животные охотно по-

САДАЛИ корм, адекватно реагировали на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители. Состояние кожного покрова, слизистых оболочек крыс опытных и контрольных групп также было в норме. Продолжительность беременности колебалась от 21 до 22 дней. Количество приплода, а также масса новорожденных крысят в опытной группе не отличались от аналогичных показателей в контрольной.

Это свидетельствует о том, что нанесение на кожу беременных самок 0,1% раствора замещенного динитробензофураксана в терапевтической дозе не оказывает отрицательного действия на рост и развитие плодов.

Наблюдения были продолжены на трех поколениях белых крыс. Для этого физиологически зрелых трех самок и одного самца первого поколения крыс, получавших препарат в дозе 2 мг/кг в виде 0,1% раствора, помещали в одну клетку. Во второй группе к трем физиологически зрелым самкам первого поколения подсаживали одного интактного физиологически зрелого самца и учитывали количество и качество приплода. В третьей группе находились интактные крысы (3 самки и 1 самец). Проводили наблюдение за ними в течение 45 дней и учитывали количество и качество их приплода. В каждой из указанных групп были получены по 15-18 крысят, которые развивались так же, как и контрольные животные. Сроки развития и становления сенсорно-двигательных рефлексов крысят контрольных групп и опытных не отличались друг от друга.

При исследовании количества и качества второго и третьего поколений крыс, получавших наочно препарат в дозе 2 мг/кг в виде 0,1% раствора, не было выявлено никаких отклонений ни в их количестве, ни в развитии. Следовательно, «Эктоцид» не обладает отдаленными последствиями действия на репродуктивную систему животных.

Мутагенную активность «Эктоцида», согласно методике, изучали в два этапа. На первом этапе исследований определяли минимальную концентрацию, при которой полностью подавляется рост используемого штамма *Salmonella thiphimurium*. Для «Эктоцида» она составила 2,5 мг/мл.

На втором этапе проводили полуколичественное определение генных мутаций с внесением растворов препарата в слой полужидкого агара без метаболической активации *in vitro*.

Учет результатов проводили через 48 часов инкубации, подсчитывая число колоний ревертантов. Опыты проводили в трехкратной повторности.

При концентрациях замещенного динитробензофураксана в минимально - глюкозной среде выше 400 мкг / мл наблюдается более низкое число мутантов в сравнении с контролем, что связано с превалированием токсичности препарата. При снижении концентрации препарата число колоний ревертангов возрастает, достигая максимума при концентрации 200 мкг/мл. При дальнейшем снижении концентрации снижается и мутагенная активность.

Количество мутаций в опытных и контрольных чашках не различается более чем в 2,5 раза. Следовательно, мутагенный эффект 5,7-(4-

гидроксифсниламино)-4,6-динитробензофуроксана на использованной мутационной модели не выявлен.

3.8. Изучение влияния «Эктоцида» на морфологический и биохимический состав крови

Исследования были проведены на 10 клинически здоровых кроликах массой 2,5 - 3 кг, подобранных по принципу аналогов. Препарат наносили в ушные раковины в виде 0,1% раствора в ДМСО в дозах 2 мг/кг. За 3 дня до начала опыта брали кровь для исследования. После этого кролику наносили исследуемый препарат 10 дней подряд, кровь для исследования брали на 4 - 10 день от начала опыта и через 3 - 7 дней после прекращения применения препарата.

Анализ полученных результатов показал, что «Эктоцид» в виде 0,1 % раствора при десятикратной обработке не вызывает достоверных изменений в морфологическом составе крови. Количество эритроцитов, гемоглобина, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, базофилов оставались в пределах физиологических норм. Однако отмечено достоверное изменение содержания общего количества лейкоцитов и лимфоцитов в сторону увеличения. До обработки животных количества лейкоцитов составляло $9,1 \cdot 10^9 \pm 0,3/\text{л}$, лимфоцитов - $61,5 \pm 0,2 \%$, на 10 день применения препарата количество лейкоцитов достигло $10,3 \cdot 10^9 \pm 0,3/\text{л}$, лимфоцитов - $62,7 \pm 0,9\%$. Отмеченные изменения носили обратимый характер и через 7 суток после последнего применения препарата возвращались к исходным величинам.

Исследование биохимических показателей крови проводилось на тех же группах кроликов, что и при изучении морфологических показателей крови. При этом установлено, что десятикратная обработка «Эктоцидом» в виде 0,1 % раствора не вызывает достоверных изменений содержания общего белка и глюкозы. До обработки у животных содержание общего белка составляло $72,55 \pm 0,66$ г/л, глюкозы - $4,67 \pm 1,7$ м Моль /л, а к концу опыта указанные показатели имели значения $72,4 \pm 0,29$ г/л и $4,61 \pm 0,8$ мМоль /л соответственно.

Таким образом, десятикратная обработка «Эктоцидом» в виде 0,1% раствора не оказывает отрицательного влияния на морфологический и биохимический состав крови кроликов.

3.9. Влияние «Эктоцида» на центральную нервную систему

Оценку функционального состояния нервной системы при воздействии «Эктоцида» проводили на 30 белых беспородных крысах обоего пола, массой 150-200 г на «открытом поле». Крысам применяли исследуемый препарат на-кожно в виде 0,1% раствора в диметилсульфоксиде и в виде суспензии в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг. Контрольным животным вводили дистиллированную воду.

3д час до введения препарата и через 1, 3, 6, 12, 24, 48 часов после применения средства, каждое животное помещали в открытое поле и вели наблюдение в течение 3 минут за двигательной активностью (число пересеченных линий) и исследовательской активностью (число обследованных отверстий).

Таблица 2. Функциональное состояние центральной нервной системы крыс под влиянием «Эктоцида» в разных дозах и способах применения

№ групп-пы	До опыта	Интервал исследований, часы					
		1	3	6	12	24	48
Число пересеченных линий							
1.	32,4±0,1	32,5±0,5	32,8±0,1	33,2±0,9	33,7±0,2	34±0,6	34,3±0,1
2.	32,3±0,8	32,4±0,1	31,7±0,5	32,1±0,2	32,6±0,7	33±0,3	33,3±0,6
3.	32,3±1,3	32,4±0,5	32,7±1,7	33,1±1,4	33,6±0,9	33,9±0,3	34,2±1,2
4.	32,1±0,6	32,2±0,9	32,5±0,6	32,9±0,4	33,4±0,8	33,7±0,1	34,0±0,7
Конт-роль	32,5±0,4	32,6±0,7	32,9±0,1	33,3±0,8	33,8±0,2	34,1±0,7	34,4±0,1
Число обследованных отверстий							
1.	16,2±0,9	16,2±0,1	16,4±0,7	16,6±0,9	16,8±0,1	17,0±0,2	17,1±0,3
2.	16,1±0,2	16,2±0,7	15,8±0,1	16,0±0,3	16,3±0,7	16,5±0,1	16,6±0,4
3.	16,1±0,5	16,2±0,3	16,3±0,7	16,5±0,1	16,8±0,4	16,9±0,1	17,1±0,9
4.	16±0,4	16,1±0,7	16,2±0,2	16,4±0,3	16,7±0,1	16,8±0,5	17,0±0,4
Конт-роль	16,2±0,7	16,3±0,1	16,4±0,8	16,6±0,4	16,9±0,2	17,1±0,5	17,2±0,1

Результаты исследований показали, что изменений в двигательной и исследовательской активности между опытными и контрольной группами не произошло. Следовательно, «Эктоцид» не оказывает отрицательного действия на регулирующую функцию центральной нервной системы.

3.11. Разработка лекарственных форм и изучение лечебной эффективности «Эктоцида» при кожных болезнях животных

В связи с плохой растворимостью «Эктоцида» в воде возникла необходимость подобрать подходящие растворители для создания удобных для применения лекарственных форм. Лучшим растворителем для «Эктоцида» является диметилсульфоксид.

Суспензии. При разработке стойких суспензий в качестве поверхностно-активных веществ нами использовали ПЭО - 400 и стеарокс — 6. Для приготовления суспензии навеску исследуемого вещества растирали в ступке сомюльгатором в различных соотношениях и по каплям добавляли дистиллированную воду. Полученную суспензию помещали в химические стаканчики

и оставляли при комнатной температуре на 24 часа, 5, 10 суток после чего взбалтывали и визуально проверяли на однородность.

Установлено, что «Эктоцид» образует стабильную суспензию при использовании в качестве эмульгатора стеарокс-6 в соотношении 1 : 0,5 (1 часть препарата и 0,5 части стеарокса — 6). После 24 часового хранения определяли однородность суспензии.

Мази. В качестве мазевой основы использовали ПЭО - 400, ПЭО-1500 и вазелин. Для приготовления мази навеску исследуемого препарата растворяли в диметилсульфоксиде в соотношении 1 : 1 и добавляли полиэтиленоксида до необходимого объема. Наиболее стойкая мазь получена на основе ПЭО-400.

Кроме того, для лечения псороптоза кроликов были разработаны ушные капли - 0,1% раствор «Эктоцида» в 70% спирте этиловом.

Лечебная эффективность «Эктоцида» **при** чесотке **и** дерматомикозах животных.

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

Для исследования лечебной эффективности лекарственных форм «Эктоцида» данных препаратов были созданы четыре группы кроликов, пораженных псороптозом в разной степени. Первой группе применяли 0,1% - ную жидкую мазь «Эктоцида» на ПЭО - 400, второй группе - 0,1% - ный раствор «Эктоцида» в этиловом спирте (70*), третьей - 0,1 % водную суспензию, четвертой группе - ушные капли «Барс».

Лечение проводили после предварительной очистки ушной раковины от чешуек, корок и экссудата или без этого. Кратность обработок зависела от степени поражения. На второй день после каждой обработки с пораженных участков брали соскоб на наличие живых или мертвых клещей. При отсутствии клещей лечение животных прекращали. Интервал обработок препаратами больных кроликов определяли, учитывая, что средний срок развития личинок в яйце (в среднем 5 — 6,5 суток) и возможность их выхода на кожу животных через 6 суток.

После одно- и трехкратного применения 0,1%-ной жидкой мази «Эктоцида» у животных прекращался зуд, исчезало беспокойство, отсутствовали повторные расчесы, на второй день наступало отторжение корок. В соскобах, взятых на второй и четвертый день, после применения препарата отсутствовали живые клещи. На 2-3 дни после начала лечения на местах отторжения появлялась юная эпителиальная ткань, уменьшался воспалительный отек. Полное выздоровление кроликов наступало через 9 - 10 дней.

Применение 0,1% спиртового раствора «Эктоцида» также оказалось эффективным, но сроки лечения были более длительными (16-18 день). Такая же лечебная эффективность характерна и для 0,1% суспензии.

Применение ушных капель «Барс» не обеспечило выздоровления контрольных животных.

При отодектоз собак и кошек применяли жидкую мазь «Эктоцида» двух - трехкратно с интервалом 6 дней. Контрольных животных лечили препаратом «Барс». Установлено, что «Эктоцид», обладает выраженной лечебной эффективностью. После первого применения у животных уменьшается беспокойство, прекращается зуд. Отторжение корочек, прилипших к поверхности ушных раковин, начиналось на 2-3 сутки лечения. Исходя из биологического цикла развития клещей, на 6 день была проведена повторная обработка животных. После повторного применения препаратов внутренняя поверхность ушных раковин и наружного слухового прохода становилась чистой, розовой и влажной, кожа эластичной. Полное выздоровление наступало в среднем на 10-12 день после начала лечения. Препарат не раздражает кожу и не вызывает побочных местных и общих эффектов.

Таким образом, 3-6 - кратное с интервалом 6 дней применение «Эктоцида» в виде 0,1%-ной жидкой мази обеспечивает полное выздоровление животных от отодектоза.

При микроспории собак и кошек применяли 0,1% мазь «Эктоцида» трех-шестикратно с интервалом в один день. Кратность применения варьировала в зависимости от степени поражения животных. Контрольным животным применяли 5% - ный спиртовой раствор йода. Установлено, что «Эктоцид» является эффективным средством для лечения дерматомикозов собак и кошек. Животные легко переносят 3-х - 6-ти кратное применение мази замещенного динитробензофураксана с интервалом в один день. Уже после первого применения животные меньше беспокоятся, охотнее принимают корм. Повторное применение ускоряет отторжение корочек и появление под ними волос. Появление роста волос на пораженных местах наступает в среднем через 8-10, полное выздоровление - через 12-14 дней.

Применение 5% - ного раствора йода не обеспечило выздоровление контрольных животных. Их повторно лечили 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофураксаном.

Таблица 3. Терапевтическая эффективность «Эктоцида»

Болезни	Лекарственная форма	Количество животных	Кратность применения, дни	Сроки выздоровления
Псороптоз кроликов	0,1% жидкая мазь	6	2-3, повтор через 6 дней	9-10
	0,1% спиртовой раствор	5	2-3, повтор через 6 дней	16-18
	0,1% водная суспензия	5	2-3, повтор через 6 дней	18-20
Контроль	ушные капли «Барс»	5	10	выздоровления нет

Болезни	Лекарственная форма	Количество животных	Кратность применения, дни	Сроки выздоровления
Отодектоз собак	0,1% жидкая мазь	13	3-6, повтор через 6 дней	10-12
контроль	ушные капли «Барс»	5	10	выздоровления нет
Отодектоз кошек	0,1% жидкая мазь	11	3-6, повтор через 6 дней	10-12
контроль	ушные капли «Барс»	8	5-7	выздоровления нет
Микроспория собак	0,1% жидкая мазь	8	3-6, через день	12-14
контроль	5% спиртовой раствор йода	3	1 раз в день, 10 дней	выздоровления нет
Микроспория кошек	0,1% жидкая мазь	7	3-6, через день	12-14
контроль	5% спиртовой раствор йода	5	1 раз в день, 10 дней	выздоровления нет

4. ВЫВОДЫ

1. Все изученные 14 соединений в ряду 5,7-дизамещенных-4,6-динитробензофуруксана обладают выраженным антимикробным, антимикотическим и акарицидным свойством. Биологическая активность бис-фениламинопроизводных-4,6-динитробензофуруксана зависит от природы заместителя в ароматическом ядре замещающего амина. Менее выражена биологическая активность у этил-, метокси-, бромзамещенных динитробензофуруксана (минимальная бактериостатическая концентрация по отношению к *St. aureus*, *E. coli* - 0,125%; минимальная фунгистатическая концентрация по отношению *Tr. gypseum* и *M. lanosum* — 0,1%). При наличии атома хлора активность соединений повышается на порядок. Однако, наибольшей биологической активностью обладают соединения, содержащие в своем составе гидроксильные группы. Так, у 5,7-(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуруксана («Эктоцид») минимальная бактериостатическая концентрация для *St. aureus* и *E. coli* составляет 0,004%, минимальная фунгистатическая концентрация для *Tr. gypseum* 0,003%, *M. lanosum* 0,0007%, а среднесмертельная концентрация для *P. cuniculi* 0,0009%. Аналогичную активность проявляет и соединение 5,7-(2-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуруксан.

2. «Эктоцид» при внутрижелудочном введении относится к III классу опасных веществ. Его ДД₅₀ для белых мышей при оральном применении 3850±353,7 мг/кг, ЛД₅₀ - 3150 мг/кг, ЛД₅₀ - 4650 мг/кг. Белые крысы более

устойчивы к препарату, они не погибают при оральном введении «Эктоцида» в дозе 6000 мг/кг.

3. «Эктоцид» в концентрациях 0,1-1% при многократном (25 дней) применении не оказывает раздражающего действия на кожу. Ежедневное в течение 10 дней нанесение 0,1% суспензии «Эктоцида» на слизистую глаза кролика вызывает слезотечение в течение 1-2 часов и гиперемию - 4-5 часов.

4. «Эктоцид» не обладает кумулятивным, аллергенным и мутагенным действием.

5. «Эктоцид» в дозе 2 мг/кг при многократном накожном применении в виде 0,1% раствора на диметилсульфоксиде не оказывает отрицательного влияния на живую массу, морфологический и биохимический состав крови, не вызывает изменений в гистоструктуре тканей и органов животных, не проявляет эмбриотоксического и тератогенного действия.

6. При накожном и внутрижелудочном применении «Эктоцид» в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг в виде 0,1% раствора в диметилсульфоксиде и в виде суспензии не оказывает отрицательного действия на регулирующие и координирующие функции центральной нервной системы и не изменяет поведенческие реакции животных.

7. Наиболее устойчивой лекарственной формой «Эктоцида» является 0,1% мазь на ПЭО-400 и 0,1% раствор на диметилсульфоксиде. Водные суспензии и спиртовой раствор «Эктоцида» в указанной концентрации менее устойчивы.

8. «Эктоцид» в форме 0,1%-ной жидкой мази на ПЭО-400 обладает хорошей лечебной эффективностью при псороптозе кроликов, отодектозе собак и кошек. Оптимальной схемой лечения является ежедневная обработка пораженных участков кожи в течение 2-3 дней и при необходимости повторное применение через 6 дней. Полное выздоровление животных пораженных указанными эктопаразитами наступает в течение 10-12 дней от начала лечения.

9. «Эктоцид» в виде 0,1% мази обеспечивает полное выздоровление собак и кошек, пораженных микроспориями через 12-14 дней от начала лечения при трех-шести кратном применении с интервалом 24 часа.

10. «Эктоцид» в виде 0,1% мази на ПЭО-400 высокоэффективен при микроспории собак и кошек при 3-6 кратном применении с интервалом 24 часа. В зависимости от степени поражения полное выздоровление наступает через 12-14 дней от начала лечения.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. При направленном синтезе соединений в ряду динитробензофуроксанов необходимо учитывать, что в структуре наиболее биологически активных веществ должны присутствовать хлор- и гидроксильные заместители в ароматическом ядре замещающего амина.

2. При создании лекарственных форм труднорастворимых соединений, предназначенных для наружного применения с успехом можно использовать как основу ПЭО-400.

3. Для лечения болезней кожи животных паразитарной и микозической этиологии предложено новое высокоэффективное средство - «Эктоцид», который рекомендуется использовать наружно в виде 0,1% концентрации.

4. В установленном порядке подано на патент «5,7-дизамещенный-4,6-динитробензофуроксан общей формулы $C_6N_2O_6R_1$, обладающей акарицидной и бактерицидной активностью» № 2003119046 от 24.06.03.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Юсупова Л.М., Гарипов Т.В., Ишкаева Д.Р., Шиндала М.К. Ветфуроксан - новое средство для лечения саркоптоидозов и дерматомикозов животных. // Ветеринарный врач. - 2002. №2. - С. 77-79.
2. Юсупова Л.М., Спатлова Л.В., Фаляхов И.Ф., Гарипов Т.В., Шиндала М.К. Биологическая активность функциональнозамещенных нитропроизводных бензофуроксанов. // Материалы второй международной конф. «Химия и биологическая активность кислород- и серосодержащих гетероциклов». - Черноголовка, 2003. - С. 122.
3. Шиндала М.К. Акарицидная активность производных бензофуроксана. // Материалы науч.-произв. конф. по актуальным проблемам Агропромышленного комплекса. - Казань, 2003. - С.268-270.
4. Шиндала М.К. Антимикробная активность производных бензофуроксана. // Материалы науч.-произв. конф. по актуальным проблемам Агропромышленного комплекса. - Казань, 2003. - С.270-272.

Подписано к печати *31.05.04.*
Заказ *114* Тираж *100* экз.
Бумага офсетная

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

Центр информационных технологий КГАВМ
420074, Казань, Сибирский тракт, 35.

№ 1 2 4 6 4