УДК 619:615.9

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИНСЕКТОАКАРИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА ИНСАКАР ПРИ АРАХНОЭНТОМОЗАХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.А. СТЕПАНОВ
аспирант
М.В. АРИСОВ
Научный руководитель – доктор ветеринарных наук
Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина, 117218, г. Москва, ул. Большая Черемушкинская, д. 28, тел./факс 8-499-124-56-55,e-mail:vigis@ncport.ru

Изучены параметры острой токсичности препарата инсакар при пероральном введении и накожном нанесении: ЛД$_{50}$ при введении белым мышам в желудок составила 5125±226, при накожном применении – 41833 мг/кг. Препарат обладает слабо выраженной кумуляцией, слабым местно-раздражающим действием и не оказывает кожно-резорбтивного эффекта.

Ключевые слова: инсакар, токсичность, кумуляция, крысы, мыши, гематологические и биохимические показатели.

Для расширения ассортимента отечественных противопаразитарных средств на базе ВНИИ гельминтологии им. К.И. Скрябина разработан новый препарат с инсектоакарицидным действием инсакар, содержащий в качестве ДВ фипронил, пирипроксифен и бензилбензоат.

Препарат представляет собой прозрачную маслянистую жидкость светло-желтого цвета, со слабым специфическим запахом. Препарат применяют путем топикального (точечного) нанесения на кожу.

Одной из основных задач, возникающих при изучении токсического действия препарата, является выявление побочных нежелательных эффектов и исключение отдаленного действия на организм животных [1, 3, 6].

Целью нашей работы было определение параметров острой токсичности препарата инсакар при пероральном введении и накожном нанесении, изучение кумулятивных свойств, оценка местного и кожно-резорбтивного действия препарата.

Материалы и методы

Изучение токсикологических свойств препарата инсакар проводили в виварии ВИГИС на белых крысах-самцах, белых мышах и кроликах массой тела соответственно 210–230 г, 18–23 г и 2,0–2,3 кг. В опытах использовали брали клинически здоровых животных, которые предварительно находились на 15-дневном карантине. Группы состояли из 4–10 животных.

Расчет параметров острой токсичности инсакара проводили в соответствии с Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ (1997), используя метод Кербера в модификации Прозоровского [1, 6].

В опытах при введении препарата в желудок использовали 36 белых мышей. Готовили 30%-ный раствор и вводили с помощью иглы с булавовидным утолщением в желудок натощак. Препарат вводили в диапазоне доз 0,2 мл/гол (3000 мг/кг) – 0,45 мл (6750 мг/кг). Для каждой дозы использовали по 6 мышей.

За мышами вели наблюдения в течение 2-х недель. Учитывали характер токсического действия: поведение, двигательную активность, состояние шерстного покрова, нарушение физиологических функций.

В связи с тем, что препарат рекомендуют применять накожно изучали его острую токсичность при накожном применении.

В опыте использовали белых беспородных крыс массой по 300 г. За сутки до нанесения препарата выстригали участок кожи размером 6 х 6 см в области спины. Препарат наносили на кожу в дозах: 6 мл (20000 мг/кг), 8 мл (26666 мг/кг) и 10 мл (33333 мг/кг). На каждую дозу использовали по 4 крысы. Дозы 8 и 10 мл наносили дважды с интервалом 10 мин. После обработки крыс помещали в индивидуальные камеры на 4 ч. В дальнейшем, животных содержали в обычных клетках. В течение 30 сут после начала опыта вели наблюдение за внешним видом, состоянием и поведением крыс. Отмечали характер проявления признаков токсикоза и падеж животных.

Кумулятивные свойства препарата изучали по методу Лима с соавт. [8]. Опыт проводили на 30 белых мышах массой 19–20 г. В качестве контроля служили 30 мышей. Все животные содержались на стандартном корме, одинаковом для подопытных и контрольной групп. Препарат вводили животным ежедневно, индивидуально, при помощи металлического зонда, алиментарным путем в виде 30%-ного водного раствора. В течение первых четырех дней животные подопытной группы получали препарат в дозе, равной 0,1 от ранее установленной однократной $ЛД_{50}$. На 5-е сутки дозу увеличивали в 1,5 раза. В течение 30 сут за всеми животными вели наблюдения, отмечая их смертность. Результаты оценивали по отношению средних эффективных доз острого и подострого экспериментов по формуле $К_{kum}$ = $ЛД_{50}$(подостр)/ $ЛД_{50}$(остр), откуда следует: если коэффициент кумуляции меньше 1, то испытуемый препарат обладает кумулятивными свойствами; если больше 1 – то отмечается повышенная устойчивость к препарату (слабо выраженная кумуляция) [7].

Местное и кожно-резорбтивное действие инсакара изучали на крысах при нанесении препарата 5 раз с интервалом 5 сут в дозах 1 мл/гол, что в 2,5 раза превышает срок применения в практических условиях, и в 5 раз повышенной дозе. Кроме того, в опытах на кроликах изучали местное действие препарата на слизистые оболочки глаз.

Местное действие препарата на кожу изучали на 12 белых беспородных крысах обоего пола массой 250–310 г., разделенных на подопытную и контрольную группы по 6 голов. За сутки до эксперимента у каждого животного в области спины выстригали участки кожи размером 3 х 3 см и определяли толщину кожной складки. На выстриженный участок наносили пипеткой препарат в дозе 1 мл. Оценку реакции кожи проводили по системе, принятой по Range Finding Test: очень слабое покраснение – 1 балл, вполне определенное покраснение – 2, умеренное, до сильного покраснение – 3, тяжелая эритема с образованием корочек – 4 балла.

Действие препарата на конъюнктиву глаза изучали на 3 кроликах. Животным глазной пипеткой закапали в правый глаз по 2–3 капли испытуемого препарата, а в левый по 2–3 капли чистого подсолнечного масла (контроль). Наблюдение за животными вели в течение 1 ч, и затем в течение 3 сут ежедневно. Действие препарата на слизистую глаз оценивали по характеру конъюнктивита и кератита.

Кожно-резорбтивное действие инсакара оценивали по специфическим и интегральным показателям через сутки после последней обработки. Гемато-

логические исследования проводили на гематологическом анализаторе PCE 90-vet (США) (определяли динамику числа эритроцитов, лейкоцитов, уровень гемоглобина, величину гематокрита). По общепринятым методам выводили лейкограмму и определяли СОЭ. По биохимическим тестам оценивали обмен веществ в организме и работу внутренних органов: почек, печени, поджелудочной железы и др. Основные показатели определяли на биохимическом анализаторе «А-125 биосистем» [4–7].

Статистическую обработку цифровых показателей выполняли по Стьюденту–Фишеру на персональном компьютере Pentium-4 с использованием программ Microsoft Excel, Microsoft Access и BIOSTAT.

Результаты и обсуждение

Изучение острой токсичности при пероральном введении. В первые сутки после введения препарата гибель животных отмечали от больших доз препаратов (6000–6750 мг/кг массы тела). Малые дозы не вызывали гибели мышей. Однократное введение препарата в больших дозах вызывало общее угнетение, судорожные явления; мыши зарывались в подстилку и вскоре отмечали их гибель. В последующие двое суток фиксировали гибель от доз 3750–5250 мг/кг. Максимальной переносимой дозой, при которой не отмечали гибели животных, была 3000 мг/кг. Мыши начинали погибать при введении препарата в дозе 3750 мг/кг. Абсолютная смертельная доза для белых мышей составила 6750 мг/кг (табл. 1). При вскрытии павших животных установлены патологоанатомические изменения, свойственные острому отравлению: брыжеечные сосуды кровенаполнены, увеличена печень и селезенка, на слизистой оболочке желудка и кишечника геморрагические воспаления.

1. Параметры острого токсического действия препарата инсакар для мышей при введении в желудок

Доза, мг/кг	3000	3750	4500	5250	6000	6750
Гибель	0/6	1/6	1/6	3/6	5/6	6/6

Z	0,5	1	2	4	5,5
d	750	750	750	750	750
Zd	375	750	1500	3000	4125

Расчет параметров токсичности:

$$ЛД_{50} = ЛД_{100} – \Sigma Zd : n = 6750 – 9750 : 6 = 5125 \text{ мг/кг}.$$

Следует отметить, что после трех суток падежа мышей не отмечено, но общее состояние у некоторых мышей оставалось неудовлетворительным в течение 5 сут. В дальнейшем клиническое состояние нормализовалось.

Таким образом, $ЛД_{50}$ инсакара при введении внутрь для мышей составила 5125÷226 мг/кг, что дает основание отнести данный препарат к 4 классу токсичности – малоопасные по ГОСТ 12.1.007-76. [2].

Изучение острой кожной токсичности. Установлено, что в течение всего срока наблюдения не отмечали изменений внешнего вида и нарушений видимых физиологических функций. В группах, где наносили препарат в дозах 8 и 10 мл наблюдали признаки интоксикации по истечении 1–3 сут (тремор, судороги, взъерошенность). В течение 10 сут во второй группе пала одна крыса, в третьей – три крысы. Достижение 100%-ного эффекта было невозможно ввиду требуемых больших доз препарата. $ЛД_{100}$ определяли методом пробит-анализа [1].

В результате обработки экспериментальных данных $ЛД_{50}$ препарата составила 41833 мг/кг.

По гигиенической классификации (ГОСТ 12.1.007-76) в соответствии с установленными параметрами кожной токсичности для крыс препарат инсакар относится к 4 классу опасности [2].

Изучение кумулятивных свойств. Для изучения кумулятивных свойств установили первоначальную дозу препарата, которая составила 0,1 от ранее установленной однократной $ЛД_{50}$ – 512,5 мг/кг или 0,0342 мл/гол. 30%-ного водного раствора. Для удобства введения препарата внутрь мышам и последующих расчетов, незначительно округлили значения первоначальных доз, которые составили 525 мг/кг или 0,035 мл/гол 30%-ного водного раствора. Результаты приведены в таблице 2.

2. Изучение кумулятивных свойств препарата инсакар

Период введения, сут	Ежедневно вводимая доза, мл/гол.	Ежедневно вводимая доза, мг/кг	Суммарная доза, мг/кг	Пало/ было	%
1–4	0,035	525	2100	0/30	0
5–8	0,0525	787	3148	0/30	0
9–12	0,078	1181	4724	0/30	0
13–16	0,118	1772	7088	2/30	6,6
17–20	0,177	2658	10632	12/30	40
21–24	0,266	3987	15948	22/30	73,3
25–28	0,40	5980	23920	30/30	100

В результате обработки экспериментальных данных $ЛД_{50}$ препарата при многократном введении в желудок составила 13092,8 мг/кг.

Используя формулу Кагана–Станкевича, определили коэффициент кумуляции:

$$К = \frac{ЛД_{50}\ многократно}{ЛД_{50}\ однократно} = \frac{13092,8}{5125} = 2,55.$$

Учитывая суммарную дозу ($ЛД_{50}$ многократная) препарата, определили коэффициент кумуляции, который составил 2,55. По классификации веществ по кумулятивным свойствам исследуемый препарат относится к группе веществ со слабо выраженной кумуляцией.

Изучение местного действия на кожу. При нанесении препарата инсакар у одной из трех крыс регистрировали наличие изменений кожи в течение 1 ч в виде покраснения (2 балла), в течение 12 ч переходящая в слабое покраснение (1 балл). У второго животного регистрировали слабое покраснение в течение 12 ч. Общая сумма баллов составила 2,5, что позволяет классифицировать местно-раздражающее действие препарата как слабое (4 класс опасности).

Восстановление функционального состояния кожи протекало без постороннего вмешательства в течение суток после прекращения нанесения препарата.

Изучение местного действия на слизистые оболочки глаз. Проводили через 1, 24, 48 и 72 ч по изменению кровенаполнения конъюнктивы, наличию лакримаций и состоянию роговицы глаза по 10-бальной системе. Результаты исследований приведены в таблице 3.

При нанесении препарата у кроликов отмечали выраженную гиперемию и слезотечение. Эти явления исчезли через 24 ч.

3. Оценка раздражающего действия препарата инсакар при воздействии на конъюнктиву глаза кролика

№	Оценка в баллах через (часы)				аздражающий эффект
	1	24	48	72	
1	6	2	0	0	
2	6	2	0	0	
3	6	2	0	0	

Таким образом, препарат обладает слабовыраженным действием на слизистую оболочку глаза с восстановлением слизистой оболочки до нормы в течение суток.

Кожно-резорбтивное действие в подостром эксперименте. В течение всего опыта внешних признаков токсикоза и гибели крыс не отмечали. Подопытные животные по своему поведению, внешнему виду ничем не отличались от контрольных животных.

Результаты оценки влияния препарата на показатели периферической крови крыс приведены в таблице 4.

4. Гематологические показатели крыс при накожном пятикратном нанесении препарата инсакар

Показатель	Опыт	Контроль	% к контролю
Эритроциты, 10^{12}/л	7,89±0,32	8,29±0,47	95,17
Лейкоциты, 10^{9}/л	9,13±0,25	9,2±0,19	99,24
Гемоглобин, г/л	142,16±8,53	143,83±8,08	98,84
Гематокрит, %	44,7±3,67	48,9±4,63	91,41
СОЭ, мм/г	1,16±0,72	1,33±0,54	87,22
Лейкограмма, %			
Нейтрофилы сегментоядерные	12,33±3,61	14,66±4,12	84,11
Эозинофилы	3,0±1,14	2,66±1,08	112,8
Лимфоциты	83,33±4,12	81,68±4,86	102,05
Моноциты	1,34±1,08	1,0±1,15	133

Анализ полученных данных по количеству эритроцитов, лейкоцитов (2 группа), уровню гемоглобина, гематокрита, а также по лейкограмме показал отсутствие различий между подопытными и контрольными животными ($P > 0,05$). Отмечено снижение СОЭ на 12,78 % по сравнению с контролем, но данное снижение не существенно.

Результаты изучения влияния препарата на функциональную активность печени, почек и некоторых показателей белкового, жирового и углеводного обмена приведены в таблице 5.

Как следует из таблицы, почти все биохимические показатели у животных подопытной и контрольной групп находятся примерно на одном уровне и статистически не достоверны ($P > 0,05$). Отмечено снижение уровня общего билирубина на 19 % по сравнению с контролем. Данное изменение значимости не имеет, так как оно связано с тем, что в подопытной группе наблюдали незначительное снижение числа эритроцитов и, соответственно, уменьшение их разрушения.

При убое у крыс взвешивали внутренние органы и определяли массовые коэффициенты. Результаты приведены в таблице 6.

5. Показатели функциональной активности печени и состояния белкового, жирового и углеводного обмена крыс при накожном пятикратном нанесении препарата инсакар

Показатель	Опыт	Контроль	% к контролю
Глюкоза, моль/л	6,73±0,47	6,8±0,29	98,97
Белок общий, г/л	71,33±2,17	72,5±3,97	98,39
Альбумин, г/л	28,0±2,89	27,66±3,36	101,23
Билирубин общий, мкмоль/л	14,45±10,67	17,83±12,64	81,04
АЛТ, ед/л	55,5±6,25	57,0±7,76	97,37
АСТ, ед/л	168,83±18,64	166,83±26,10	101,20
Щелочная фосфатаза, ед/л	287,83±79,9	273,0±67,5	105,43
Амилаза, ед/л	1063,33±203,47	981,66±127,68	108,31
Остаточный азот,мкмоль/л	7,01±0,35	7,5±0,22	93,47
Креатинин, мкмоль/л	55,83±3,83	63,16±8,86	88,39

6. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс после пятикратного нанесения препарата инсакар

Группа	Почки	Легкие	Селезенка	Сердце	Печень
Инсакар	6,28±0,64	7,22±1,40	4,08±0,58	3,04±0,23	41,94±1,66
Контроль	5,87±0,43	5,83±0,21	3,44±0,63	3,44±0,41	37,01±3,68

Как следует из таблицы, пятикратное накожное применение препарата не привело к достоверному изменению массовых коэффициентов почек, легких, селезенки, сердца и печени по сравнению с контрольными животными.

Литература

1. *Беленький М.Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Госмедиздат, 1963. – 151 с.
2. Гост 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда: вредные вещества: классификация и общие требования безопасности. – М., 1984.
3. *Жуленко В.Н., Рабинович М.И., Таланов Г.А.* Ветеринарная токсикология. – М.: Колос, 2001. – 384 с.
4. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. – М., 1985. – С. 134–136.
5. *Кост Е.А.* Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. – М., 1975. – 253 с.
6. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств, утвержденные Минздравом РФ 29 декабря 1997 г. // Ведомости Фармакоп. Комитета. – 1998. – № 1. – С. 27–32.
7. Методические рекомендации по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций веществ в воздухе рабочей зоны. – 1980. – 25 с.
8. *Lim R.K., Rink K.G., Glass H.G.* // Arch. Internat. Pharmacodyn. – 1961. – V. 130, № 3–4. – P. 336–353.

Toxicological estimation insectoacaricid preparation insacar at arachnoentomosis of carnivores

A.A. Stepanov

The parameters of acute toxicity of insacar are studied. LD_{50} at introduction inside for mice has made 5125÷226 mg/kg, LD_{50} at application on a skin – 41833 mg/kg. Insacar has poorly expressed accumulation, weak local irritating action and does not render skin getting effect.

Keywords: insacar, toxicity, cumulation, rats, mice, haematological and biochemical parameters.