УДК 616:619.995.132
DOI:

Поступила в редакцию 26.02.2015
Принята в печать 24.03.2015

Оценка эмбриотропных свойств антигельминтика митранокса

С. А. Козлов, М. Б. Мусаев
Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К. И. Скрябина
117218, Москва, ул. Б.Черемушкинская, д. 28, e-mail: musaev@vniigis.ru

Реферат

Цель исследования – оценить возможные эмбриотропные свойства антигельминтика митранокса.

Материалы и методы. Опыты проводили на 70 белых беспородных беременных крысах-самках, которых распределили на 6 подопытных и одну контрольную группы по 10 животных в каждой. Препарат вводили беременным самкам 1, 2 и 3-й подопытных групп в форме суспензии в 1%-ном крахмальном клейстере в терапевтической (100 мг/кг), а крысам 4, 5 и 6-й групп – в трехкратно увеличенной (300 мг/кг) дозах перорально в критические периоды эмбриогенеза: с 1–6; 7–14 и 15–19 сутки беременности. Контрольная группа беременных самок получала суспензию 1%-ного крахмального клейстера. На 20-е сутки эмбриогенеза все беременные животные были убиты декапитацией, а эмбрионы исследованы в соответствии с Методическими рекомендациями Фармакологического Государственного комитета «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», «Методическим указаниям по гигиенической оценке новых пестицидов», и правилам лабораторной практики в Российской Федерации.

Результаты. При исследовании внутренних органов патологических изменений не обнаружено. Признаки уродств и других отклонений у эмбрионов и плацент отсутствовали. Препарат не оказывает эмбриотоксического эффекта, так как масса и размеры плодов не отличались от таковых у контрольных животных. Пред- и постимплантационная гибель и общая эмбриональная смертность у крыс подопытных групп не отличались от показателей контрольных животных. При измерении средних размеров зачатков костной системы у эмбрионов не отмечено тератогенного действия препарата.

Ключевые слова: антигельминтик, митранокс, эмбриотоксичность, тератогенность, предимплантационная и постимплантационная гибель, эмбриональная смертность, уродства.

Введение

Митранокс – новый отечественный антигельминтный препарат, обладающий цестодоцидным и нематодоцидным действиями [3]. Относится к

группе ацетиллированных салициланнилидов. В химическом отношении – 4,6-дихлор-2-(3,4-дихлорфенилкарбамоил) фенилацетат [11]. Препарат представляет собой белый с кремовым оттенком порошок, без вкуса, в воде не растворим, молекулярная масса 377,06, предназначен для перорального применения. Препарат разработан совместно с СПХФА и ИМПИТМ им. Е. И. Марциновского.

По данным доклинических исследований митранокс на основании ГОСТа 12.10007-76 относится к 3 классу умеренно опасных веществ по степени воздействия на организм при введении в желудок белым мышам и крысам [2], а также по принятой классификации химических веществ обладает умеренным кумулятивным свойством (Ккум. = 3,2) [4].

По результатам изучения острой накожной токсичности он относится к классу малоопасных веществ, не оказывает отрицательного воздействия на неповреждённую кожу [6] и существенного раздражающего действия на конъюнктиву глаз [5].

Учитывая относительную дешевизну синтеза митранокса, его слабую токсичность и широкую антигельминтную активность, целью данной работы было продолжение одного из этапов изучения препарата на эмбриотропную активность.

Материалы и методы

Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия митранокса проводили в виварии Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К. И. Скрябина. Исследования проводили в соответствии с Методическими рекомендациями Фармакологического Государственного комитета «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [10], «Методическим указаниям по гигиенической оценке новых пестицидов» [7] и правилам лабораторной практики в Российской Федерации [1, 9].

В опыт подобрали 70 беременных самок белых беспородных крыс и 10 самцов, которых содержали отдельно. К 5 самкам подсаживали одного самца и первым денём беременности самок считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке.

Беременных самок крыс распределяли на 7 групп по 10 животных в каждой. Первым трем группам самок препарат вводили в терапевтической дозе 100 мг/кг, а крысам 4, 5 и 6-й групп – в три раза увеличенной дозе 300 мг/кг на 1–6, 7–14 и 15–19-е сутки беременности соответственно. Митранокс вводили в форме 1%-ного крахмального клейстера в желудок с помощью специального зонда. Животные 7-й группы получали 1%-ную суспензию крахмала без препарата и служили контролем.

На протяжении всего периода беременности за животными вели наблюдение. Принимали во внимание наличие признаков интоксикации, состояние видимых слизистых оболочек и шерстного покрова, акт приема корма и воды. Взвешивание животных проводили ежедневно.

Животных убивали на 20-е сутки беременности декапитацией.

После лапаратомии обращали внимание не только на органы-мишени (эмбрионы, плодные оболочки, плаценты, яичники), но и на все внутренние органы, проводя макроскопическое исследование.

После эктирпации матки учитывали число эмбрионов, резорбций и желтых тел; измеряли краниокаудальные размеры эмбрионов и плацент и регистрировали их массу, определяли пол. Также обращали внимание на наличие уродств и аномалий развития у эмбрионов.

Тератогенное действие препарата оценивали с использованием метода J. G. Wilson (1965) в модификации отдела эмбриологии ИЭМ РФ. Одну группу плодов фиксировали в жидкости Буэна в течение 14 сут для изучения аномалий внутренних органов плодов по методу Вильсона, другую – в 96º спирте в течение 7 сут для изучения состояния развития скелета методом Даусона [8].

Осматривали, измеряли и взвешивали плаценту и с учётом массы эмбрионов определяли плодоплацентарный коэффициент по формуле:

$$\text{Масса плаценты}/\text{Масса плода} \times 100$$

Для оценки эмбритоксической активности препарата учитывали пред- и постимплантационную гибель и общую эмбриональную смертность в процентах.

Показателями тератогенного действия являлись нарушения органогенеза во внутриутробном периоде и изменения костной системы плода.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Стюдент 200. За статистически значимые изменения был взят общепринятый уровень достоверности $P \leq 0{,}05$.

Результаты и обсуждение

В течение всего периода беременности признаков интоксикации у подопытных животных не наблюдали. Животные были активны, охотно поедали корм и хорошо набирали массу.

При макроскопическом исследовании внутренних органов каких-либо патологических изменений не обнаружено. Признаки воспаления, уродства и другие отклонения от нормы у эмбрионов и плацент отсутствовали.

Результаты исследования эмбрионального материала при введении беременным крысам митранокса в дозах 100 и 300 мг/кг в критические периоды эмбриогенеза сведены в таблицу 1, из которой следует, что препарат не оказывает эмбриотоксического эффекта. Об этом свидетельствуют значения массы и размер плодов, а также отсутствие аномалий в развитии скелета. Краниокаудальные размеры, масса эмбрионов, а также диаметр и масса плацент самок крыс подопытных групп не отличались от таковых животных контрольной группы.

Пред- и постимплантационная гибель и общая эмбриональная смертность у крыс, которым вводили митранокс в терапевтической и 3 раза увеличенной дозах в критические периоды эмбриогенеза не превышали значения у животных контрольной группы.

На срезах у подопытных и контрольных эмбрионов самок крыс отмечали идентичность топографии пищеварительного тракта, спинного мозга, крупных сосудов, сердца, лёгких, бронхов, печени, поджелудочной железы, почек, органов малого таза и скелета.

Длина участков окостенения в закладках основных костей эмбрионов, размеры зачатков лопаточной, плечевой, локтевой, лучевой, а также

бедренной, большой и малой берцовых костей у опытных плодов находились в пределах, близких таковым у животных контрольной группы (табл. 2).

Заключение

Митранокс в терапевтической (100 мг/кг) и в 3 раза увеличенной дозе (300 мг/кг) при внутрижелудочном введении в критические периоды эмбриогенеза самок крыс не проявил эмбриотоксической и тератогенной активности.

Литература

1. Государственная фармакопея. – Т. X1, Вып.2. – М.,1968.- 1079 с.
2. Козлов С. А., Мусаев М. Б., Михайлицин Ф. С., Севбо Д. П., Трусов С. Н. Изучение острой токсичности митранокса // Мед. паразитол. и паразит. бол. – 2013. – № 3. – С. 47–48.
3. Козлов С. А., Мусаев М. Б. Антигельминтная эффективность и титрация терапевтических доз отечественного антигельминтика митранокса при мониезиозе и нематодозах овец // Рос. паразитол. журнал. – 2014. – № 4. – С. 114–116.
4. Козлов С. А., Мусаев М. Б., Михайлицин Ф. С., Севбо Д. П., Трусов С. Н. и др. Экспериментальное изучение кумулятивных свойств нового препарата митранокса // Мед. паразитол. и паразит. бол. – 2013. – № 3. – С. 53–55.
5. Козлов С. А., Мусаев М. Б. Оценка раздражающего действия митранокса и надината на слизистую глаз // Матер. докл. науч. конф. Всерос. о-ва гельминтол. РАН «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – 2014. – Вып. 15. – С.109–110.
6. Козлов С. А., Мусаев М. Б. Параметры острой накожной токсичности и раздражающего действия митранокса и надината // Матер. докл. науч. конф. Всерос. о-ва гельминтол. РАН «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – 2014. – Вып. 15. – С.110–112.
7. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов. – Киев, 1988. – С. 32–35.
8. Дыбан А. П., Баранов В. С., Акимова И. М. Архив Анатомии Гистологии и Эмбриологии. – 1970. – Т. 59, № 10. – 191с.
9. Правила лабораторной практики в Российской Федерации: Приказ министерства здравоохранения РФ, №708н от 23.08.2010.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005.-829с.

References

1. Gosudarstvennaja farmakopeya [State Pharmacopoeia of the USSR]. Moscow, 1968, vol. X1, i. 2, 1079 p.
2. Kozlov S. A., Musaev M. B., Mihajlicin F. S., Sevbo D. P., Trusov S. N. Acute toxicity study of Mitranox. *Med. parazitol. i parazit. bol.* [Medical parasitology and parasitic diseases], 2013, no. 3, pp. 47–48.

3. Kozlov S. A., Musaev M. B. Anthelmintic efficacy and titration to therapeutic doses of domestic anthelmintic Mitranox at moniesiosis and nematodosis in sheep. *Ros. parazitol. zhurnal* [Russian Journal of Parasitology], 2014, no. 4, pp. 114–116.

4. Kozlov S. A., Musaev M. B., Mihajlicin F. S., Sevbo D. P., Trusov S. N. et al. Experimental study of cumulative properties of the new drug Mitranox. *Med. parazitol. i parazit. bol.* [Medical parasitology and parasitic diseases], 2013, no. 3, pp. 53–55.

5. Kozlov S. A., Musaev M. B. Evaluation of irritative effects of Mitranox and Nadinate on the eye mucous membranes. *Mater. dokl. nauch. konf. Vseros. o-va gel'mintol. RAN «Teorija i praktika bor'by s parazitarnymi boleznjami»* [Proceedings of the 15th Scientific Conference «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases»]. Moscow, 2014, i. 15, pp. 109 – 110.

6. Kozlov S. A., Musaev M. B. Parameters of the acute dermal toxicity and the irritative effects of Mitranox and Nadinate. *Mater. dokl. nauch. konf. Vseros. o-va gel'mintol. RAN «Teorija i praktika bor'by s parazitarnymi boleznjami»* [Proceedings of the 15th Scientific Conference «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases»]. Moscow, 2014, i. 15, pp. 110 – 112.

7. *Metodicheskie ukazanija po gigienicheskoj ocenke novyh pesticidov.* [Methodical guidelines for hygienic assessment of new pesticides], Kiev. 1988, pp. 32–35.

8. Dyban A. P., Baranov V. S., Akimova I. M. *Arhiv anatomii, gistologii embriologii* [Archives of anatomy, histology and embryology], 1970, vol. 59, no.10, 191p.

9. *Pravila laboratornoj praktiki v Rossijskoj Federacii: Prikaz ministerstva zdravoohraneniya RF, № 708n ot 23.08.2010* [Rules for laboratory practice in the Russian Federation: Order of the Ministry of Health of RF no.708n from 23.08.2010]

10. Habriev R. U. *Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskih veshhestv* [Guidelines for the experimental (preclinical) studies of new pharmaceutical drugs], Moscow. Medizina, 2005, 829p.

Russian Journal of Parasitology
Article history:
Received 26.02.2015
Accepted 24.03.2015

Evaluation of embryotropic properties of the anthelmintic Mitranox

Kozlov S.A., Musaev M.B.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin, 117218 Russia,
28 B. Cheremushkinskaya st., e-mail: musaev@vniigis.ru

Abstract
Objective of research: to estimate the potential embryotropic properties of the anthelmintic Mitranox.

Materials and methods: the experiments were conducted on 70 white outbreed pregnant rats divided into one control and 6 experimental groups (10 animals in each). The preparation was given orally to pregnant female rats of the 1st , 2nd and 3rd experimental group in a form of 1% starch suspension at the therapeutic dose 100 mg/kg, and to the rats of the 4th , 5th and 6th group at a triple dose 300 mg/kg in the critical periods of embryogenesis (1–6, 7–14 and 15–19 days of pregnancy).

Pregnant female rats of the control group received a 1% starch suspension. On the 20th day of embryogenesis all pregnant rats were killed by decapitation, and the embryos were examined according to Methodical Recommendations of the State Pharmacological Committee «Guidelines for experimental (preclinical) studies of new pharmaceutical substances», «Methodological guidelines for the hygienic assessment of new pesticides» and the Rules of Laboratory Practice in the Russian Federation.

Results: No pathological changes in the internal organs have been found. No malformation signs and other fetal and placenta abnormalities have been detected. The preparation has no embryotoxic effect because there was no difference in fetal mass and size between the control and experimental groups.

The pre- and post implantation death of rats and the total fetal mortality in experimental groups did not differ from the data of the control group.

No teratogenic effects of the drug were determined when the measurements of the average size of rudiments of embryonic skeleton were carried out.

Keywords: anthelmintic, Mitranox, embryotoxicity, teratogenicity, pre- and post implantation death, fetal mortality, malformations.

© 2015 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI)http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org / Human Sciences section: http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf)

Таблица 1. Результаты исследования эмбрионального материала при введении беременным крысам митранокса в дозах 100 и 300 мг/кг в критические периоды эмбриогенеза

Показатель	Значение показателя при введении митранокса в дозе (мг/кг) в дни беременности						Контроль
	100			300			
	1–6	7–14	15–19	1–6	7–14	15–19	1–19
Число самок	10	10	10	10	10	10	10
Среднее число плодов на одну самку	12,35±0,48	11,60±0,82	10,67±0,73	12,77±0,91	10,76±0,86	11,71±0,69	10,96±0,54
Среднее число резорбций на одну самку	0,30±0,27	0,40±0,32	0,40±0,36	0,80±0,59	0,60±0,36	0,40±0,18	0,50±0,39
Предимплантационная гибель, %	1,12±1,31	3,78±1,22	3,58±1,83	6,32±2,12	4,42±1,18	4,42±1,18	4,76±1,55
Постимплантационная гибель, %	8,54±2,96	6,18±2,57	7,46±2,34	3,95±1,75	6,55±2,07	6,55±2,07	4,39±1,95
Общая эмбриональная смертность, %	10,68±2,83	8,84±2,81	9,65±1,78	10,18±2,68	9,47±1,32	9,47±1,32	8,33±2,70
Число случаев полной внутриутробной гибели	0	0	0	0	0	0	0
Масса плода, г	2,43±0,02	2,52±0,03	2,55±0,03	2,46±0,03	2,58±0,30	2,49±0,02	2,56±0,02
Краниокаудальный размер плода, см	3,54±0,02	3,27±0,03	3,22±0,02	3,41±0,03	3,27±0,02	3,36±0,02	3,37±0,01
Масса плаценты, г	0,55±0,01	0,62±0,01	0,57±0,02	0,54±0,01	0,60±0,01	0,61±0,01	0,60±0,01
Диаметр плаценты, см	1,48±0,01	1,44±0,01	1,53±0,02	1,48±0,01	1,41±0,01	1,44±0,01	1,48±0,01
Плодоплацентарный коэффициент, %	22,63	24,60	22,35	22,95	23,26	24,51	23,44
Число эмбрионов с аномалиями развития: внешними	0	0	0	0	0	0	0
внутренними	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: $P \geq 0,05$.

Таблица 2. Средние размеры зачатков костной системы у эмбрионов

Показатель		Значение показателя (длина, мм) при введении митранокса в дозе (мг/кг)						Контроль
		100			300			
		в дни беременности						
		1–6	7–14	15–19	1–6	7–14	15–19	1–19
Плечевая	левая	2,37±0,02	2,46±0,02	2,44±0,02	2,40±0,02	2,39±0,03	2,42±0,02	2,39±0,02
	правая	2,41±0,02	2,49±0,02	2,47±0,02	2,43±0,02	2,41±0,03	2,45±0,03	2,43±0,03
Локтевая	левая	2,39±0,02	2,44±0,03	2,41±0,03	2,37±0,03	2,43±0,02	2,44±0,03	2,46±0,01
	правая	2,45±0,02	2,47±0,02	2,46±0,03	2,42±0,02	2,48±0,02	2,47±0,03	2,51±0,02
Лучевая	левая	2,08±0,02	2,14±0,03	2,09±0,03	2,15±0,03	2,11±0,02	2,09±0,03	2,11±0,03
	правая	2,12±0,03	2,19±0,02	2,13±0,03	2,24±0,03	2,19±0,03	2,16±0,03	2,25±0,02
Бедренная	левая	1,67±0,03	1,73±0,02	1,72±0,02	1,76±0,03	1,79±0,02	1,75±0,02	1,76±0,02
	правая	1,73±0,02	1,76±0,02	1,76±0,02	1,83±0,02	1,85±0,02	1,84±0,02	1,79±0,01
Большая берцовая	левая	1,90±0,01	1,89±0,03	1,75±0,03	1,87±0,02	1,89±0,03	1,88±0,03	1,91±0,03
	правая	1,92±0,02	1,93±0,02	1,81±0,02	1,91±0,03	1,93±0,02	1,93±0,03	1,95±0,02
Малая берцовая	левая	1,77±0,01	1,78±0,01	1,73±0,02	1,85±0,02	1,82±0,03	1,82±0,02	1,85±0,02
	правая	1,79±0,02	1,84±0,02	1,77±0,04	1,89±0,01	1,87±0,03	1,87±0,02	1,88±0,02
Лопатка	левая	2,43±0,01	2,40±0,03	2,39±0,02	2,41±0,02	2,44±0,03	2,43±0,03	2,44±0,02
	правая	2,39±0,01	2,45±0,02	2,43±0,03	2,45±0,02	2,39±0,02	2,46±0,03	2,41±0,03

Примечание: $P \geq 0,05$.