

ОЦЕНКА ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОГО И ТЕРАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЙ ИВЕРМЕКТИНА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Н.Б. ЕМЕЛЬЯНОВА

кандидат биологических наук

Н.А. САМОЙЛОВСКАЯ

кандидат биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им.

К.И. Скрябина, 117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28

e-mail: emelyanova13@mail.ru, rhodiola_rosea@mail.ru

Проведены исследования по изучению эмбриотропного действия ивермектина (субстанция) в терапевтической дозе 0,2 мг/кг. Установлено, что в тестируемой дозе ивермектин не обладает эмбриотоксическим и тератогенным эффектом.

Ключевые слова: ивермектин, терапевтическая доза, беспородные крысы, эмбриотоксический эффект, тератогенное действие.

Препараты, действующим веществом которых является ивермектин, получаемый путем ферментации гриба *Streptomyces avermitilis*, обладают выраженным противопаразитарным действием на личиночные и половозрелые стадии нематод желудочно-кишечного тракта и легких, личинки подкожных, носоглоточных и желудочных оводов, вшей, кровососок и саркоптоидных клещей.

Механизм действия ивермектина подробно описан многими исследователями. У нематод он стимулирует выделение гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) нервными окончаниями и усиливает связывание ее с постсинаптическими ГАМК-рецепторами, блокируя передачу нервных импульсов, что приводит к параличу и последующей гибели гельминтов. У клещей и насекомых блокируется передача нервных импульсов между нервными окончаниями и клетками мышечной ткани, что также приводит к параличу и гибели паразитов. Ивермектин не действует на ацетилхолин, являющийся основным медиатором нервной системы у млекопитающих [15].

Ивермектин в терапевтической дозе 0,2 мг/кг не проявляет эмбриотропного действия [11]. При изучении эмбриотропных свойств ивермектина на мышцах установлено отрицательное влияние препарата в дозе 0,4 мг/кг [10, 13]. У плодов мышей опытных групп регистрировали уродства («волчья пасть»). У крыс нарушения эмбриогенеза наблюдали в дозе 10 мг/кг. Уродства у эмбрионов кроликов отмечали в дозе 3 мг/кг [14].

Фармакотоксикологические свойства ивермектина изучены и описаны многими авторами [2, 9, 12, 14].

Однако, различные технологии производства одного и того же вещества могут оказать влияние на его биологические и токсикологические свойства.

Применение некоторых противопаразитарных лекарственных средств нередко оказывает серьезную опасность для потомства, поэтому необходимо определить возможный тератогенный эффект препарата перед применением его на практике. Воздействие различных химических соединений во время беременности может вызвать нарушения физиологических процессов и привести к патологическим изменениям в развитии плода. Так, например, эм-

бриотоксические: внутриутробная гибель, изменения массы и размеров плода и плаценты и тератогенные: гистоморфологические нарушения в развитии, сбой функций основных органов и систем [1, 4].

Возможный тератогенный и эмбриотоксический эффект может зависеть от дозы препарата, пути его введения и воздействия на определенный срок эмбриогенеза. Путь введения вещества, как правило, зависит от того, как оно будет применяться на практике [7, 8].

В связи с этим, возникла необходимость оценить эмбриотоксический и тератогенный эффект субстанции ивермектина (предоставленный ООО «Русичи», Россия) в терапевтической дозе 0,2 мг/кг на белых беспородных крысах с целью дальнейшего приготовления солевых брикетов и применения последних для профилактики паразитозов у домашних и диких животных.

Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с Методическими рекомендациями Фармакологического государственного комитета («Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», Москва, 2005) [3, 6].

Опыты проводили в 2012–2013 гг. в виварии Всероссийского научно-исследовательского института гельминтологии имени К.И.Скрябина (ВИ-ГИС).

Чувствительность эмбрионов к вводимому веществу в различные периоды эмбриогенеза не одинакова [16]. Поэтому препарат вводили во все периоды эмбриогенеза с целью выявления наиболее уязвимой стадии.

Эмбриотоксическое и тератогенное действие ивермектина оценивали на 40 крысах-самках массой 200–220 г и 10 крысах-самцах (самцов содержали отдельно). Животных разделили на восемь групп: 6 опытных и 2 контрольных. На ночь подсаживали самцов к самкам (один самец на четыре самки). На следующее утро обнаружение сперматозоидов у самок во влагалищном мазке принимали за первый день беременности.

Исследования включали оценку влияния ивермектина на пренатальное и постнатальное развитие крыс.

В зависимости от регистрации результатов введения испытуемого препарата в антенатальном или постнатальном периоде эксперименты условно разделили на два фрагмента.

В первом опыте ивермектин вводили беременным самкам перорально в виде суспензии на 1%-ном крахмальном геле в терапевтической дозе 0,2 мг/кг в критические периоды эмбриогенеза с 1–6, 7–14 и 15–19 сутки. Животные, не получавшие препарат, служили контролем.

На 20-е сутки беременности опытных и контрольных крыс подвергали эвтаназии; после лапаротомии извлекали матку и зародышей; регистрировали число желтых тел беременности в обоих яичниках, мест имплантации; число живых, мертвых и резорбированных плодов; эмбрионы внимательно осматривали на наличие каких-либо внешних аномалий в развитии; определяли массу (г) и краниокаудальный размер (см) плодов, массу (г) и диаметр плаценты (см); определяли эмбриональную смертность, пред- и постимплантационную гибель. Половину исследуемых плодов фиксировали в жидкости Буэна и использовали для дальнейшего исследования плодов на наличие внутренних аномалий в развитии по методу Вильсона в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР [5].

Плоды помещали на две недели в жидкость Буэна (насыщенный водный раствор пикриновой кислоты, 40% формалин, ледяная уксусная кислота – 15 : 5 : 1). По методу Вильсона в модификации А.П. Дыбана, по схеме лезвием бритвы делали 9 сагиттальных срезов. Все срезы анализировали под стереомикроскопом МБС-2 на наличие внутренних аномалий у плодов.

Во втором опыте отбор беременных крыс проводили как описано выше в

опыте по изучению антеннатального развития.

Ивермектин вводили беременным самкам с нормальным эстральным циклом перорально в терапевтической дозе 0,2 мг/кг на 1%-ном крахмальном геле во время всего периода эмбриогенеза. Животные контрольной группы препарат не получали.

Вели наблюдение за течением беременности, родами и лактации у крыс-самок. За несколько дней до родов самок рассаживали в отдельные клетки по одной в каждую. Регистрировали дату родов, длительность беременности.

Оценивали физическое развитие потомства в течение первых 30 сут жизни по ряду интегральных и специфических показателей: размер помета, число живых и мертворожденных; гибель крысят на 3, 5, 14 и 30-е сутки; регистрировали массу (г) при рождении и на 3, 5, 14 и 30-е сутки; измеряли краниокаудальный размер (см) при рождении и на 3-и сутки; сроки отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, открытие глаз (сутки).

Результаты и обсуждение

На протяжении всего периода введения испытуемого препарата у крыс-самок не отмечали признаков токсикоза, падежа и видимых нарушений беременности. При динамическом наблюдении за приростом массы тела у опытных самок не регистрировали снижения привесов по сравнению с контрольными животными. Гибель эмбрионов на всех стадиях развития у опытных крыс-самок не отличалась от контрольных значений.

Масса и размеры плодов от опытных самок были сравнимы с данными контроля (табл. 1). При внешнем осмотре эмбрионов нами не было обнаружено уродств; по результатам выполнения девяти саггитальных срезов аномалий в развитии эмбрионов не зарегистрировали.

1. Влияние ивермектина при многократном введении в критические периоды эмбриогенеза в дозе 0,2 мг/кг на пренатальное развитие крыс

Показатель	Сутки беременности, в которые вводили препарат			
	1–6	7–14	15–19	контроль
Число самок	5	5	5	5
Среднее число плодов на одну самку	12,00±1,08	12,00±1,29	11,50±0,87	12,25±0,75
Среднее число резорбций на одну самку	0,50±0,29	1,00±0,71	0	0
Предимплантационная гибель, %	10,71±4,42	8,77±3,96	6,12±3,57	18,33±5,58
Постимплантационная гибель, %	4,00±2,80	7,69±3,89	0±7,28	0±1,41
Общая эмбриональная смертность, %	14,28±5,00	15,79±5,32	6,12±3,57	18,33±5,58
Случаи полной внутриутробной гибели	0	0	0	0
Масса плода, г	2,65±0,04	2,62±0,05	2,70±0,03	2,68±0,03
Краниокаудальный размер плода, см	2,99±0,03	3,10±0,03	3,06±0,03	3,06±0,03
Масса плаценты, г	0,48±0,01	0,47±0,01	0,50±0,01	0,50±0,01
Диаметр плаценты, см	1,33±0,02	1,36±0,01	1,42±0,01	1,38±0,02
Число эмбрионов с аномалиями развития:				
- внешние аномалии	0	0	0	0
- внутренние аномалии	0	0	0	0

Примечание. * – $P \geq 0,05$.

Введение ивермектина в дозе 0,2 мг/кг беременным крысам в критические периоды эмбриогенеза с 1–6, 7–14 и 15–19 дни не влияло на поведение животных.

Исследование эмбрионального материала свидетельствует о том, что показатели опытных животных существенно не отличаются от показателей контрольных животных.

По результатам лабораторных исследований можно заключить, что введение крысам ивермектина в различные сроки беременности, включая критические периоды, в терапевтической дозе 0,2 мг/кг не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия.

Во время и после введения ивермектина не отмечали гибели крыс, признаков интоксикации, а также симптомов, которые свидетельствовали бы о нарушении беременности (например, истечений из влагалища и др.). В течение всего опыта животные прибавляли в массе тела.

В таблице 2 приведены итоги оценки постнатального развития потомства от крыс-самок, которым вводили препарат в терапевтической дозе в критические периоды эмбриогенеза.

2. Влияние ивермектина на постнатальное развитие крыс в дозе 0,2 мг/кг при пероральном введении

Показатель	Сутки беременности, в которые вводили препарат			
	1–6	7–14	15–19	контроль
Число родивших самок в группе	5	5	5	5
Продолжительность беременности, сут	21,75±0,25	22,00±0,41	22,25±0,25	22,00±0
Среднее число крысят на самку при рождении	10,25±0,86	10,34±0,48	11,34±0,28	11,50±0,65
Число мертвых крысят	0	0	0	0
Краниокаудальный размер, см:				
- при рождении	4,94±0,04	5,00±0,08	4,78±0,12	4,90±0,08
- на 3-и сутки	5,31±0,10	5,20±0,09	5,13±0,09	5,35±0,10
Масса крысят, г:				
- при рождении;	5,60±0,17	5,42±0,19	5,35±0,12	5,39±0,06
- на 3-и сутки	5,99±0,03	6,00±0,08	5,89±0,05	6,04±0,07
- на 5-е сутки	7,92±0,07	7,78±0,05	7,68±0,07	7,66±0,09
- на 14-е сутки	15,25±0,31	14,89±0,44	15,10±0,36	15,51±0,32
- на 30-е сутки	102,00±5,41	85,09±6,55	93,25±4,86	98,63±7,25
Отлипание ушных раковин, сут	4,00±0,63	3,98±0,72	4,12±0,68	4,30±0,91
Появление шерстного покрова, сут	7,99±0,62	8,00±0,43	7,68±0,26	7,72±0,32
Открытие глаз, сут	17,00±0,60	17,10±0,48	17,05±0,63	16,75±0,93
Самцы/самки	1/1	1/1	1/1	1/1

Примечание. * – $P \geq 0,05$.

Продолжительность беременности у опытных самок находилась на уровне контроля и физиологической нормы для данного вида животных. Течение родов проходило без особенностей и отклонений от нормы. Судя по наличию молока в желудочках у крысят, введение испытуемого препарата крысам-самкам не отразилось отрицательно на лактации и сосательном рефлексе у них.

При введении ивермектина в терапевтической дозе на 1–6, 7–14 и 15–19 сут беременности гибель крысят в первый месяц жизни была сравнима с контрольными значениями.

Физическое развитие потомства протекало без каких-либо отклонений от нормы. Масса тела при рождении, а также на 3, 5, 14 и 30-е сутки у потомков от самок, получавших ивермектин в тестированной дозе, не отличались от таковых показателей у контрольных крысят. Аналогичный вывод можно сделать и в отношении краниокаудального размера плодов при рождении и на 3-и сутки жизни. Регистрируемые сроки проявления специфических показателей развития, таких как отлипание ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, открытие глаз у крысят опытной группы находились в пределах контрольных и характерных для данного вида животных колебаний.

Формирование поведенческих реакций и рефлексов у крысят опытных групп было сравнимым с контролем и в сроки, характерные для данного вида животных.

По нашим наблюдениям влияние ивермектина на постнатальное развитие крыс в виде гибели и внешних уродств отсутствовало. Все крысята родились нормальными, хорошо реагировали на внешние раздражители, с хорошим аппетитом и вели активный образ жизни.

Таким образом, можно заключить, что ивермектин (субстанция) в терапевтической дозе 0,2 мг/кг при пероральном введении не оказывает отрицательного влияния на эмбриональное развитие крыс. Полученные результаты подтверждают данные литературы [2, 9, 12–14].

Литература

1. Veselova T.P. Sovremennye aspekty izucheniya toksichnosti antigelmintikov // Mater. 2 Zakavkazskoy konf. po parazitolog. – Erevan, 1981. – S. 64–66.
2. Gadjevi I.M. Izucheniye vozmojnogo embriotoksicheskogo i teratogennoogo deystviya ivermektina // Bul. Vses. In-ta gelmintol. – Moskva, 1985. – Vip. 39. – S. 14–16.
3. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR XI. – Moskva, 1987. – Vip. 2. – S.182.
4. Dinerman A.A. Rol zagryazniteley okruzhayushey sredi v narushenii embrionalnogo razvitiya. – Moskva: Medicina, 1980. – 191 s.
5. Diban A.P., Baranov V.S., Akimova I.M. Osnovnye metodicheskie podhody k testirovaniyu teratogennoy aktivnosti himicheskikh veshchestv // Arhiv anatom.embriologii. – Moskva, 1970. – T. 59, № 10. – S. 89–100.
6. Habriev R.U. Rukovodstvo po experimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniu novih farmakologicheskikh veshchestv. – Moskva: Medicina, 2005. – 832 s.
7. Sanockiy I.V., Pashkova G.A., Fomenko B.N. K voprosu expolyacii dannyh, poluchennyh v experimente otnositelno cheloveka, pri izuchenii vliyaniya himicheskikh soedineniy na reproduktivnuyu funkciyu. – Moskva: Medicina, 1976. – S. 22–27.
8. Sanockiy I.V., Fomenko B.N. Otdalennye posledstviya vliyaniya himicheskikh soedineniy na organism. – Moskva: Medicina, 1979. – 232 s.
9. Semeryak E.V. Patomorfologicheskie priznaki toksichnosti i otdalennye efekty leystviya ivermektina na organism jivotnyh: Dis. ... kand. vet. nauk. – Omsk, 2009. – 164 s.
10. Brent R.L. Definition of a teratogen and the relationship of teratogenicity to carcinogenicity //Teratol. – 1986. – V. 34, № 3. – P. 359–360.
11. Campbell W.C., Benz G.W. Ivermectin: a review of efficacy and safety // J. Vet. Pharmacol. and Therap. – 1984. – V. 7, № 1. – P. 1–16.
12. Campbell W.C. Ivermectin and abamectin. – Springer-Verlag. – 1989. – 363 p.
13. Khera K.S. Material toxicity – a possible factor in fetal malformation in mice // Teratol. – 1984. – V. 29, № 4. – P. 411–416.

14. *Lankas G.R., Gordon L.R.* Toxicology In Ivermectin and abamectin. Edit. W.C. Campbell. – 1989. – P. 89–113.
15. *Martin R.I., Pennington A.J.* Ivermectin induces cation channels in isolated patches of *Ascaris* muscle // *J. Physiol.* – 1989. – P. 83.
16. *Wilson J.G.* Environmental chemicals. – In: *Handbook of therapy.* – 1977. – P. 410.

Estimation of embryotoxic and teratogenic effects of ivermectin in laboratory animals

N.B. Yemelyanova, N.A. Samoylovskaya
PhD in biological sciences

*All-Russian Scientific Research Institute of Helminthology named after
K.I. Skryabin, 117218, Russia, B. Cheremushkinskaya, 28,
e-mail: emelyanova13@mail.ru, rhodiola_rosea@mail.ru*

Injection of ivermectin in a dose of 0,2 mg/kg to pregnant rates in critical stage of embryogenesis at days 1–6, 7–14 and 15–19 did not effect animals' behavior. Duration of pregnancy in laboratory female rats was at control and normal physiological level for present kind of animas. Delivery process was normal without clinical features and complications. Presence of milk in rats' stomachs allows to conclude that the injection of tested medicine to female rats did not affect their lactation and sucking reflex. At injection of ivermectin in a therapeutic dose at days 1–6, 7–14 and 15–19 of pregnancy the value of rats' death in the first life month was compatible with control values. According to our observation there was no effect of ivermectin on postnatal development in rats in form of death and external malformations. All rats were born healthy, responded well to external stimuli, had a good appetite and pursued an active life. Results of laboratory research allow to conclude that ivermectin injection to rats in a therapeutic dose of 0,2 mg/kg in different pregnancy terms including critical stages doesn't have embryotoxic and teratogenic effects.

Keywords: ivermectin, therapeutic dose, nonbreeding rats, embryotoxic effects, teratogenic effects.