

УДК 619:616.995.132.6:1-085

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-58-63

Методические рекомендации по испытанию и оценке эффективности препаратов при трихинеллезе и гименолепидозе на лабораторной модели

Иван Алексеевич Архипов, Анастасия Ивановна Варламова,
Ирина Михайловна Одоевская

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук», 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: arhipovhelm@mail.ru

Поступила в редакцию: 17.05.2019; принята в печать: 18.05.2019

(Рассмотрены и одобрены на секции Методической комиссии «Инвазионные болезни животных» 17 мая 2019 г., протокол № 1)

Аннотация

Цель исследований: дать характеристику методам испытаний и оценки эффективности антигельминтных препаратов при трихинеллезе и гименолепидозе на лабораторной модели.

Материалы и методы. Проведен анализ литературы и результатов собственных исследований по испытанию и оценке эффективности антигельминтных препаратов при трихинеллезе и гименолепидозе на лабораторной модели, в качестве которой использовали белых мышей массой тела 14–16 г, экспериментально зараженных личинками *Trichinella spiralis* в дозе 200 личинок на особь и яйцами *Hymenolepis papae* в дозе 200 инвазионных яиц на особь. Эффективность препаратов учитывали по результатам вскрытия тонкого кишечника животных на 2 и 4-е сутки после введения препаратов соответственно при трихинеллезе и гименолепидозе белых мышей.

Результаты и обсуждение. Подробно описаны рациональные методы испытания препаратов и новых химических соединений на нематодоцидную активность на белых мышах, экспериментально зараженных *T. spiralis*, и на цестодоцидную активность на белых мышах, экспериментально зараженных *H. papae* в дозе соответственно 200 личинок и 100–200 яиц на особь. Для изучения эффективности испытуемые препараты вводили животным на 3-и сутки при трихинеллезе и 13-е сутки при гименолепидозе. Учет антигельминтной эффективности препаратов проводили на основании гельминтологического вскрытия тонкого кишечника животных на 2 и 4-е сутки после дачи препаратов соответственно против *T. spiralis* и *H. papae*. Обнаруженных гельминтов у животных подопытных и контрольной (нелеченой) групп подсчитывали по типу «контрольный тест», т. е. в сравнении с животными контрольной группы.

Ключевые слова: лабораторная модель, белые мыши, *Trichinella spiralis*, *Hymenolepis papae*, эффективность, препарат.

Для цитирования: Архипов И. А., Варламова А. И., Одоевская И. М. Методические рекомендации по испытанию и оценке эффективности препаратов при трихинеллезе и гименолепидозе на лабораторной модели // Российский паразитологический журнал. 2019. Т. 13. № 2. С. 58–63. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-58-63.

© Архипов И. А., Варламова А. И., Одоевская И. М.

Methodological Recommendations for Testing and Assessment of Efficiency of Medications against Trichinellosis and Hymenolepidosis in Laboratory Model

Ivan A. Arkhipov, Anastasiya I. Varlamova, Irina M. Odoevskaya

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a branch of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences", 28, B. Cheremushkinskaya street, Moscow, Russia, 117218, e-mail: arkipovhelm@mail.ru

Received on 17.05.2019; accepted for printing on: 18.05.2019

(Reviewed and approved at the subpanel of the Methodological Commission "Invasive Diseases of Animals" May 17, 2019, Protocol No. 1)

Abstract

The purpose of the research is to characterize the methods for testing and assessment of efficiency of anthelmintics against trichinellosis and hymenolepidosis in laboratory model.

Materials and methods. The literature and own research results have been analyzed as regards testing and efficiency assessment of anthelmintics against trichinellosis and hymenolepidosis in white mouse as a laboratory model weighting 14–16 g that was infected experimentally with *Trichinella spiralis* larvae in a dose of 200 larvae per specimen and with *Hymenolepis nana* eggs in a dose of 200 infective eggs per specimen. The medication efficiency was considered subject to the results of a small intestine autopsy on the 2nd and 4th days after the medications were injected to treat trichinellosis and hymenolepidosis in white mice accordingly.

Results and discussion. A detailed description has been given for progressive methods to test medication and new chemical compound effect on nematode activity in white mice infected experimentally with *T. spiralis*, and on cestode activity in white mice infected experimentally with *H. nana* in a dose of 200 larvae and 100–200 eggs per specimen accordingly. In order to study effectiveness, the test medications were introduced into animals on the 3rd day in the trichinellosis case and on the 13th day in the hymenolepidosis case. Anthelmintic effectiveness was taken into consideration based on helminthologic autopsy of small intestines in animals on the 2nd and 4th days after the medications were given against *T. spiralis* u *H. nana* accordingly. The helminthes found in the experimental and control (uncured) animals were counted by a checkup analysis, namely, in comparison with the control animals.

Keywords: laboratory model, white mice, *Trichinella spiralis*, *Hymenolepis nana*, effectiveness, medication.

For citation: Arkhipov I. A., Varlamova A. I., Odoevskaya I. M. Methodological Recommendations for Testing and Assessment of Efficiency of Medications against Trichinellosis and Hymenolepidosis in Laboratory Model. Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology. 2019; 13 (2): 58–63. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-58-63.

Гельминтозы встречаются примерно у трети населения земного шара. На территории бывшего Советского Союза отмечено около 60 видов гельминтов у людей [4] и свыше 3500 видов у позвоночных животных. У сельскохозяйственных животных паразитирует около 1000 видов гельминтов. Вред, причиняемый здоровью человека и животных гельминтами, очень велик и поэтому роль химиотерапии в борьбе с ними весьма значительна.

Многие применяемые ныне антигельминтные препараты разработаны в прошлом веке, а в настоящее время осуществляется, в основном, разработка новых лекарственных форм на их основе с целью повышения эффективности, снижения побочных эффектов и расширения спектра действия.

Для выявления антигельминтной активности препаратов и новых соединений ранее были предложены разные модели и методы в опытах *in vitro* и *in vivo* [1–6].

Метод изучения антигельминтиков *in vitro* позволяет за сравнительно короткий период времени и с небольшими затратами исследовать значительное число препаратов. Этот метод ценен также тем, что почти исключительно при его помощи изучается механизм действия на паразитических червей тех или иных веществ. Недостатком его являются условия проведения опытов, далекие от естественных. Кроме того, в некоторых случаях возможно расхождение результатов опытов *in vitro* с данными, получаемыми *in vivo*. Работа на экспериментальных животных позволяет в значительной мере ликвидировать эти недостатки. При этом, одновременно выявляется и токсичность препаратов. Недостатки работы с экспериментальными животными заключаются в некотором отличии физиологии лабораторных животных и их гельминтов от гельминтов домашних животных и человека.

Наилучшим объектом, заменяющим трихинелл человека, является вид *Trichinella spiralis*, которым заражаются все виды лабораторных животных, в том числе белые мыши.

При экспериментальной терапии требуется предварительное обследование животных на зараженность гельминтами. Оно проводится как у животных, зараженных искусственным путем, так и у спонтанно зараженных, в связи с тем, что поголовного заражения обычно не происходит.

При диагностике большинства гельминтозов применяют метод флотации по Фюллеборну. Фекалии размешивают в насыщенном растворе поваренной соли (380 г NaCl кипятят в 1 л воды) и оставляют в стаканчике или пробирке на 1–1,5 ч. По истечении этого времени петель (петлю делают из проволоки диаметром около 0,6 см) снимают поверхностную пленку и стряхивают на предметное стекло. Яйца гельминтов, имеющие меньший удельный вес, чем насыщенный раствор поваренной соли, концентрируются в поверхностной пленке. Яйца некоторых гельминтов, например, фасциол и ряда цестод, не всплывают и их выявляют путем просмотра осадка. Вместо поваренной соли можно применять азотнокислый натрий, насыщенный раствор которого (1 кг соли кипятят в 1 л воды) имеет больший удельный вес, чем раствор хлористого натрия (метод Калантарян). Благодаря этому всплывание яиц происходит более интенсивно [4].

Инвазионный материал, необходимый для заражения лабораторных животных, получают различными путями в зависимости от биологических особенностей тех или иных видов гельминтов.

Трихинеллез. В качестве модели для изучения терапии трихинеллеза могут служить любые млекопитающие. В лабораторных условиях наиболее часто используют мышей, крыс и морских свинок.

Трихинеллы *Trichinella spiralis* встречаются в одном и том же хозяине в виде половозрелой кишечной стадии и в личиночной мышечной стадии.

Половозрелые трихинеллы с трудом различаются невооруженным глазом. Самцы длиной 1,4–1,6 мм и шириной 0,04 мм. Спикюлы отсутствуют. На заднем конце тела в промежутке между двумя коническими лопастями располагаются две пары сосочков. Самки вдвое крупнее самцов, длина их 3–4 мм, максимальная ширина – 0,06 мм. Половое отверстие находится в передней части тела. Заражение людей и животных происходит при поедании мяса, содержащего спирально свернутых мышечных трихинелл. После переваривания мяса мышечные трихинеллы освобождаются от капсул, пробуравливают эпителиальный слой слизистой оболочки и внедряются в паренхиматозную ткань ворсинки. Уже через 48 ч нематоды достигают половой зрелости и наступает совоплощение, после чего самцы вскоре погибают. Самки трихинелл живородящие; они начинают выделять личинок через 80–90 ч после заражения. Самки живут в тонких кишках у крыс и мышей 2–3 недели, у морских свинок – около 5 недель. Личинки трихинелл с током лимфы и крови разносятся по организму хозяина. Для дальнейшего их развития служит только поперечнополосатая мышечная ткань. Достигнув ее, личинки увеличиваются в размерах и вскоре спирально закручиваются. Обычно спустя 2–2,5 недели мышечные трихинеллы инкапсулируются за счет реакции окружающей ткани. Со временем в капсуле откладываются соли извести. Мышечные трихинеллы достигают инвазионности уже на 17-е сутки после выделения их самками [4].

Для изучения эффективности препаратов используют белых инбредных мышей-самок

BALB массой тела 14–16 г, полученных из питомников Московской области. Мышей выдерживают в карантине в течение 7 сут, а затем распределяют в поликарбонатные клетки по 6 гол. Лабораторные животные получают стандартный корм (ООО «Лабораторкорм») в соответствии с нормами кормления РФ [8] и их содержат в виварии с естественным и искусственным освещением и контролируемой температурой 20–22 °С и влажностью 60–70%.

Исследования проводят на животных согласно Руководству по экспериментальным (доклиническим) исследованиям новых фармакологических веществ [10], Правилам надлежащей лабораторной практики РФ [9] и Правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, использованных для экспериментальных и иных научных целей (ETS 123) [7].

Изучение терапии трихинеллеза может быть направлено на изыскание путей уничтожения трихинелл в кишечной стадии и мышечных трихинелл. Большой интерес представляла бы возможность воздействия на личинок, проникших в мышцы, так как на ранней стадии трихинеллез обычно не диагностируют.

Изучение нематодоцидной активности препаратов проводят на лабораторной модели трихинеллеза на белых мышках массой 14–16 г, экспериментально инвазированных *T. spiralis* в дозе 200 личинок на животное [13]. Животных заражают путем введения суспензии с личинками в желудок с помощью шприца с канюлей.

Изолят *T. spiralis*, использованный в опытах, получают путем серийного пассажа личинок первой стадии самкам крыс. Инвазионных личинок получают путем переваривания мышц крыс. Материал помещают на 12 ч в жидкость для переваривания, состоящую из 1 л физиологического раствора, 20 мл концентрированной соляной кислоты и 20 г пепсина при температуре 37 °С в условиях постоянного смешивания в механическом встряхивателе. Затем суспензию центрифугируют в течение 2 мин при 1000 об./мин. Осадок последовательно отмывают физ. раствором (0,9% NaCl) и центрифугируют. Далее ресуспенсируют в 1,5% желатине на физ. растворе для получения стабильной суспензии. Для подсчета

необходимого числа личинок для заражения используют гемоцитометр. До заражения мышей содержат в течение 12 ч на голодной диете, а затем им в желудок вводят дозу личинок, используя туберкулиновый шприц.

При изучении терапии кишечной стадии трихинеллеза препараты назначают на вторые–третьи сутки после заражения мышей, которых разделяют на подопытные и контрольную группы по 10 голов в каждой. Животным подопытных групп вводят в желудок испытуемый препарат в разных дозах в 1%-ном крахмальном геле. Животные контрольной группы получают крахмальный гель в соответствующем объеме.

На вторые–третьи сутки после введения препаратов животных убивают декапитацией. Нематодоцидную активность испытуемых препаратов учитывают по результатам гельминтологического вскрытия тонкого кишечника. Тонкий кишечник мышей вскрывают ножницами по всей длине, помещают в физиологическом растворе в аппарат Бермана. Затем пробы ставят в термостат при температуре 37–39 °С на 2 ч, после чего седимент исследуют под бинокулярной лупой и подсчитывают число обнаруженных *T. spiralis*.

При изучении терапевтического воздействия на мигрирующих личинок лечение начинают с 7-х суток после заражения: с этого периода обычно наиболее интенсивно проявляется клиника заболевания. Вскрытие животных проводят не ранее чем через 2–3 недели; подсчитывают число мышечных трихинелл у животных опытной и контрольной групп. Для этого проводят переваривание мышц: мышечную ткань освобождают от костей и фасций, промывают проточной водой и измельчают в мясорубке. Мясной фарш помещают в переваривающую жидкость (1% соляной кислоты и 0,7% пепсина из расчета 1 л жидкости на 80 г фарша). Переваривание проводят при температуре 37 °С в течение 12–18 ч. После этого переваривающую жидкость процеживают через мельничный газ и собирают в пробирки. Подсчет личинок проводят путем определения их среднего числа в единице объема взвеси и последующего пересчета на одно животное.

Учет эффективности препаратов проводят по типу «контрольный тест» с расчетом

среднего числа обнаруженных нематод и интенсэфективности. Полученные результаты обрабатывают статистически.

Гименолепидоз. Для выявления цестодозных свойств препаратов часто используют возбудителей гименолепидоза – одного из распространенных гельминтозов в мире, в том числе и в РФ.

Возбудитель – карликовый цепень *Hymenolepis nana* (Siebold, 1852). Гименолепидоз чаще поражает детей. Естественными хозяевами гельминта наряду с человеком являются крысы, домовые мыши, суслики, хомяки. Моделью являются мыши, зараженные *H. nana*. Карликовый цепень достигает 10–30 мм, а иногда и 50 мм длины при наибольшей ширине 0,7–0,9 мм. Почти округлая головка снабжена 4 присосками и хоботком, вооруженным 20–24 крючками. Стробила паразита имеет до 200 проглоттид. В гермафродитных члениках в центре расположен допастной яичник и желточник. С одной стороны от них лежит один округлый семенник, с другой – два. Зрелые членики заполнены прозрачными эллипсоидными яйцами 0,040–0,050 мм в диаметре. Размеры зародышевых крючков онкосферы равны 0,015–0,016 мм. Паразиты локализуются в заднем отделе тонкого кишечника.

Экспериментальная модель гименолепидоза на мышах очень удобна и проста в обращении и воспроизводстве, так как инвазированные животные выделяют зрелые (инвазионные) яйца карликового цепня.

Мыши 1–2-месячного возраста нередко спонтанно заражены *H. nana*. В связи с этим, из питомника целесообразно выписывать мышей приблизительно 3-недельного возраста (массой 7–8 г), свободных от спонтанной инвазии. Мышей заражают *per os* с помощью шприца, снабженного специальной канюлей, обычно по 100–400 инвазионных яиц. Для этого собранных от предшествующего заражения цестод *H. nana* растирают пестиком в ступке или разрушают в небольшом объеме водопроводной воды посредством неоднократного насасывания в шприц с насаженной на него иглой-канюлей длиной 25 мм для перорального заражения.

У инвазионных и жизнеспособных яиц карликового цепня онкосферальные крючья

расположены в виде пальцев перчатки. У незрелых яиц все три пары крючьев по отношению друг к другу расположены попарно под углом около 90° или более. В случаях гибели яиц они лежат в беспорядке.

Онкосфера вылупляется из оболочек яйца в просвет тонкой кишки и внедряется в ворсинку, где в течение 96 ч или немного более (иногда до 7 сут) развивается в цистицеркоид. Большинство цистицеркоидов развивается в задней половине тонкой кишки. Зрелая личинка – ларвоциста – выходит в просвет тонкой кишки и опускается в подвздошную кишку, где на 11–14-е сутки инвазии достигает половозрелой стадии (чаще на 12–13-е сутки).

На 13-е сутки после заражения в желудок мышей подопытных групп по 10 особей в каждой вводят испытуемый препарат однократно в разных дозах в 1%-ном крахмальном геле. В качестве базового препарата обычно служит субстанция препарата в той же дозе. Животным контрольной группы вводят крахмальный гель в соответствующем объеме.

На четвертые сутки после введения препаратов животных убивают декапитацией. Активность препаратов учитывают по результатам гельминтологического вскрытия тонкого кишечника. Извлеченных при вскрытии цестод подсчитывают. Учет эффективности препаратов проводят по типу «контрольный тест» с расчетом среднего числа обнаруженных цестод и интенсэфективности.

В связи с тем, что инвазия у мышей при экспериментальном заражении яйцами *H. nana* относительно кратковременна (обычно до 16–20 сут), причем половозрелые особи гельминта быстро теряют способность продуцировать яйца или вообще элиминируются из кишечника, для поддержания экспериментальной модели *H. nana* в лаборатории часть экспериментально инвазированных мышей убивают через 13–14 сут после заражения, а из заднего отрезка тонкой кишки (около 10–12 см), где обычно локализуются все половозрелые особи карликового цепня, извлекают цестод в бюкс с водопроводной водой, который затем помещают в холодильник при 4°C. При условии смены водопроводной воды через каждые 5–7 сут яйца *H. nana* сохраняют жизнеспособность до 30 сут, после чего она резко падает [2].

Таким образом, использование лабораторной модели трихинеллеза и гименолепидоза на белых мышах позволяет провести скрининг эффективности антигельминтных препаратов, а также оценить эффективность новых лекарственных форм и комплексов с наименьшими затратами.

Литература

1. Архипов И. А. Испытание препаратов при литомозидозе многососковых крыс // Труды Всес. ин-та гельминтол. 1988. Т. 29. С. 6–7.
2. Астафьев Б. А., Яроцкий Л. С., Лебедева М. Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. М., 1989. 279 с.
3. Котова З. Н. Экспериментальная химиотерапия гименолепидоза препаратами акридинового ряда // Мед. паразитология и паразит. болезни. 1955. Т. 24, № 3. С. 262–265.
4. Кротов А. И. Экспериментальная терапия гельминтозов. М.: Медгиз, 1961. 192 с.
5. Кротов А. И. Основы экспериментальной терапии гельминтозов. М.: Медгиз, 1973. 272 с.
6. Лукашенко Н. П. Методы экспериментальной химиотерапии (Практическое руководство). 1971. С. 344–345.
7. Правила Европейской конвенции по защите позвоночных животных, использованных для экспериментальных и научных целей (ETS 123). Страсбург, 1986.
8. Приказ МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г. «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».
9. Приказ МЗ СССР № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».
10. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических субстанций. М., 2005. 832 с.

References

1. Arkhipov I. A. Medications tested against Litomosoidosis in *Mastomys natalensis* (Natal Multimammate Mouse). *Trudy Vsesoyuznogo instituta gel'mintologii = Works of the All-Union Institute of Helminthology*. 1988; 29: 6–7. (In Russ.)
2. Astafiev B. A., Yarotskiy L. S., Lebedeva M. N. Experimental Models of Parasitosis in Biology and Medicine. M., 1989. 279. (In Russ.)
3. Kotova Z. N. Experimental Chemotherapy of Hymenolepidosis with Acridine-Type Drugs. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 1955; 24(3): 262–265. (In Russ.)
4. Krotov A. I. Experimental Helminthosis Therapy. M.: Medgiz, 1961. 192. (In Russ.)
5. Krotov A. I. Fundamentals of Experimental Helminthosis Therapy. M.: Medgiz, 1973; 272. (In Russ.)
6. Lukashenko N. P. Experimental Chemotherapy Methods (Practice Guideline). 1971; 344–345. (In Russ.)
7. Regulations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.
8. Decree No. 1179 by the Ministry of Healthcare of the USSR Concerning Approval of Basic Standard Costs of Fodders for Laboratory Animals in Healthcare Institutions, dated 10/10/1983.
9. Decree No. 199n by the Ministry of Healthcare of the USSR Concerning Adoption of Good Laboratory Practice Regulations, dated 01/04/2016.
10. Khabriev R. U. Guidelines for Experimental (Non-Clinical) Study of New Pharmaceutical Ingredients. M., 2005; 832.