Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies

doi:10.15421/nvlvet7833

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 619:615.9

Дослідження ембріотоксичної дії препарату для зовнішнього використання «Мазь для ран» на лабораторних тваринах

Р.М. Сачук
sachuk.08@ukr.net

Дослідна станція епізоотології ІВМ НААН,
вул. Князя Володимира, 16/18, Рівне, 33028, Україна

Результати експериментів показали один з аспектів безпеки застосування нового препарату «Мазь для ран», що призначений для зовнішнього застосування великій рогатій худобі, коням, вівцям, козам, свиням, хутровим звірям, кролям, собакам та котам. До складу препарату входять ефірні масла сосни сибірської, евкаліпту, чайного дерева, кедр, гвоздики та масляний розчин хлорофілліту. Доклінічні випробування препарату «Мазь для ран» проведені на вагітних щурах, шляхом багаторазового дермального нанесення у період з 1 по 19 добу вагітності, не викликали у тварин токсичних явищ. При розтині щурів на 20 добу вагітності проводили підрахунок жовтих тіл в яєчниках, місць імплантації і резорбції в матці, оцінювали кількість живих і мертвих плодів. Встановлено, що перебіг вагітності у контрольних і дослідних тварин істотно не відрізнявся. У дослідній групі щурів, яким дермально застосовували «Мазь для ран», доїмплантаційна і загальна ембріональна смертність була нижчою від показників контрольної групи відповідно на 16,3% і 10,2%. Постімплантаційна смертність перевищувала на 7,0% аналогічний показник контрольної групи. Морфометрія ембріонів затримки росту плодів не виявила. При зовнішньому огляді у витягнутих з матки плодів значних видимих аномалій розвитку (каліцтв) не відмічено. Дослідження внутрішніх органів плодів дефектів їх розвитку не виявили, як і не встановлено дефектів розвитку кісткової системи, що свідчить про те, що даний препарат не викликає порушення процесів остеогенезу.

При наскірному нанесенні щурам «Мазі для ран» в дозі 0,5 г/кг у досліджуваній період вагітності, не встановлено впливу препарату на подальшу кількість народжених щурят чи відсоток мертвонароджених плодів. Роду у піддослідних самок наступали, як правило, на 23 добу вагітності, як і у контрольних тварин. Отже, препарат не викликає ембріотоксичної дії, не впливає на показники доїмплантаційної, постімплантаційної, загальної ембріональної смертності та на постнатальний розвиток потомства. Подальші дослідження будуть спрямовані на клінічне випробування препарату при лікуванні гіперкератозу діжок вимені корів.

Ключові слова: «Мазь для ран», щур, вагітність, ембріон, роди, постімплантаційна смертність, пренатальний період.

Исследование эмбриотоксического действия препарата для наружного применения «Мазь для ран» на лабораторных животных

Р.Н. Сачук
sachuk.08@ukr.net

Исследовательская станция эпизоотологии ИВМ НААН,
ул. Князя Володимира, 16/18, Ровно, 33028, Украина

Результаты экспериментов показали один из аспектов безопасности применения нового препарата «Мазь для ран», который предназначен для наружного применения крупному рогатому скоту, лошадям, овцам, козам, свиньям, пушным зверям, кроликам, собакам и котам. В состав препарата входят эфирные масла сосны сибирской, эвкалипта, чайного дерева, кедр, гвоздики и масляный раствор хлорофиллита. Доклинические испытания препарата «Мазь для ран», проведенные на беременных крысах путем многократного дермального нанесения в период с первых по 19 сутки беременности,

Citation:

Sachuk, R.N. (2017). Research of embryotoxic effect of external preparation «Ointment for wounds» on laboratory animals. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(78), 162–166.

показали отсутствие токсических явлений у животных. При вскрытии крыс на 20 сутки беременности проводили подсчет желтых тел в яичниках, мест имплантаций и резорбции в матке, оценивали количество живых и мертвых плодов. Установлено, что течение беременности у контрольных и опытных животных существенно не отличалось. В опытной группе крыс, которым дермально применяли «Мазь для ран», предимплантационная и общая эмбриональная смертность была ниже показателей контрольной группы соответственно на 16,3% и 10,2%. Постимплантационная смертность превышала на 7,0% аналогичный показатель контрольной группы. Морфометрия эмбрионов задержки роста плодов не показала. При внешнем осмотре извлеченных из матки плодов значительных видимых аномалий развития (увечий) не отмечено. Исследование внутренних органов плодов дефектов их развития не выявили, как и не установлено дефектов развития костной системы, что свидетельствует о том, что данный препарат не вызывает нарушения процессов остеогенеза.

При наружном нанесении крысам «Мази для ран» в дозе 0,5 г/кг в исследуемый период беременности, не установлено влияния препарата на дальнейшее количество родившихся крысят или процент мертворожденных плодов. Роды у подопытных самок наступали, как правило на 23 сутки беременности, как и у контрольных животных. Итак, препарат не вызывает эмбриотоксического действия, не влияет на показатели предимплантационной, постимплантационной, общей эмбриональной смертности и на постнатальное развитие потомства. Дальнейшие исследования будут направлены на клинические испытания препарата при лечении гиперкератоза сосков вымени коров.

Ключевые слова: «Мазь для ран», крыса, беременность, эмбрион, роды, постимплантационная смертность, пренатальный период.

Research of embryotoxic effect of external preparation «Ointment for wounds» on laboratory animals

R.N. Sachuk
sachuk.08@ukr.net

Research Station of Epizootology IVM NAAS, Ukraine
Knyaz Vladimir Str., 18, Rivne, 33028, Ukraine

The results of experiments showed one of the aspects of the application safety of the new preparation «Ointment for Wounds», which is intended for external use to bovine cattle, horses, sheep, goats, swine, fur-bearing animals, rabbits, dogs and cats. The preparation formula includes essential oils of Siberian Cedar, Eucalyptus, Tea Tree, Cedar, Clove, and chlorophyllipt oil solution. Pre-clinical trial of the «Ointment for Wounds» were carried out on pregnant rats, through repeated dermal application in the period from the 1st to the 19th day of pregnancy, and it did not cause toxic effects on animals. At the autopsy post-mortem examination of the rats on the 20th day of pregnancy, the quantity of yellow bodies in the ovaries, the implantation and resorption sites in the uterus, the number of live and dead fetuses were estimated. It was defined that the gestation course in control and experimental groups of animals did not differ significantly. The pre-implantation and total embryonic mortality in the experimental group (intervention group) of rats for which «Ointment for Wounds», was used dermally proved to be lower than that of the control group, respectively, by 16.3% and 10.2%. Post-implantation mortality exceeded by 7.0% the similar indicator of the control group. Morphometry of embryos did not reveal the growth retardation of the fetuses. During the external examination, significant visible development anomalies (deformities) of the fetuses extracted from the uterus have not been observed. During the external examination, significant visible development anomalies (deformities) of the fetuses extracted from the uterus have not been observed. Investigation of the fetuses' internal organs did not reveal defects in their development, as well as defects in the development of the bone system have not been established, that suggests that this preparation does not cause a violation in the osteogenesis processes.

The skin application of «Ointment for Wounds» to rats in a dose of 0.5 g/kg in the studied period of pregnancy effects neither on the number of newborns, nor the percentage of stillborns. Parturition of the experimental does took place, as a rule, at the 23rd day of pregnancy, as well as in control group. Consequently, the drug does not cause embryotoxic effects, does not affect the parameters of preimplantation, post-implantation, general embryonic mortality and postnatal development of offspring. Further research will focus on clinical trials of the preparation in the treatment of hyperkeratosis of the dams of the cow dummy.

Key words: «Ointment for Wounds», rat, pregnancy, embryo, parturition, post-implantation mortality, prenatal period.

Вступ

Пошукам високоефективних і екологічно безпечних лікувально-профілактичних засобів при дерматопатіях у тварин приділяється значна увага як вітчизняних, так і зарубіжних дослідників. Трендом останнього часу є застосування біологічно-активних компонентів рослинного походження, як альтернативи антибіотикотерапії. Вдало підібрані комбінації ефірних масел часто не менш ефективні ніж синтетичні антибіотики, а ризик виникнення резистентних штамів мікроорганізмів у рази менший. Та і собівартість лікувальних заходів із застосуванням лікарської сировини природного походження більш приваблива (Sachuk et al., 2016; Sachuk et al., 2017). Крім того, фітопрепарати можуть включати комбінацію багатьох

сполук, які максимально відповідають заданим терапевтичним цілям.

Для задоволення потреб ринку ветеринарних фітопрепаратів ПП «Біофарм», спільно з Дослідною станцією епізоотології ІВМ НААН, розроблено новий препарат для зовнішнього застосування «Мазь для ран», застосування якого дозволить оптимізувати вартість і терміни виконання лікувальних процедур та спростить терапевтичні маніпуляції. До складу препарату входять ефірні масла сосни сибірської, евкаліпту, чайного дерева, кедр, гвоздики та масляний розчин хлорофілліпту. Рекомендований зовнішньо великий рогатий худобі, коням, вівцям, козам, свиням, хутровим звірям, кролям, собакам та котам. Застосовується з лікувальною метою при ураженнях шкірного покриву (рани, дерматити, екземи, абсцеси, фурункули,

карбункули, опіки, обмороження); молочної залози (мастити, тріщини шкіри дійок); статевих органів (вагініти, вестибуліти, цервіцити); кінцівок (травми кігтів, поверхневий панарицій, гниття копитної стрілки); ротової порожнини (стоматити, гінгівіти). Має виражену лікувальну дію при травматичних міозитах і дерматитах; гострих асептичних запаленнях зв'язок, суглобів, тканин пальців і копит тощо; при проявах ектопаразитозів (покуси комах, псороптози, отодектози).

Обов'язковою умовою застосування нових лікарських препаратів є попередні доклінічні дослідження – на лабораторних тваринах (Kosenko et al., 1997; Kotsyumbas et al., 2006; Gutyj et al., 2016; Gutyj et al., 2017; Todoruk et al., 2017). Передреєстраційні випробування визначають характер та вираженість можливої шкідливої дії лікувального препарату на організм лабораторних тварин і включають вивчення: гострої токсичності при одноразовому і при повторних введеннях (підгострої, субхронічної та хронічної); специфічних видів токсичності: ембріотоксичності; тератогенності; гонадотоксичності; імунотоксичності; алергогенності; мутагенності; місцевоподразливої дії та пірогенності. Таким чином, за результатами кожного окремого етапу доклінічних досліджень препарату можна значною мірою гарантувати безпеку його клінічного випробування та подальшого практичного застосування.

Мета роботи. Дослідження ембріотоксичних властивостей препарату для зовнішнього використання «Мазь для ран».

Матеріал та методи досліджень

Вивчення ембріотоксичної дії препарату для зовнішнього використання «Мазь для ран» проводилися на базі Дослідної станції епізоотології ІВМ НААН. У роботі з експериментальними тваринами керувалися «Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин».

В основу вивчення ембріотоксичної дії препарату та впливу його на постнатальний розвиток лаборатор-

них тварин були покладені стандартні методики (Kotsyumbas et al., 2006). Досліди проводили на 50 білих безпородних щурах-самках масою 185–220 г і 15 самцях масою 230–240 г, що є загальноприйнятим тестом для такого роду досліджень. Використано щурів тільки з нормальним естральним циклом, що є показником нормального функціонування репродуктивної системи. Препарат наносили на шкіру щодня в дозі 0,5 г/кг. Для різних груп тварин препарат застосовували з 1 по 19 добу вагітності. Контрольним тваринам з 1 по 19 добу вагітності на шкіру наносили вазелін. Результати дослідів враховували на 20 добу вагітності. Плоди зважували, вимірювали їх краніокаудальний розмір, визначали стать. Потім плоди досліджували на наявність аномалій внутрішніх органів (Dawson, 1926; Wilson, 1965).

Статистичну обробку результатів дослідження ембріонального матеріалу проводили за формулами: а) доімплантаційну смертність, % – $[B - (A+B) : B] \times 100$; б) постімплантаційну смертність, % – $B : (A+B) \times 100$, в) загальну ембріональну смертність, % – $(B-A) : B \times 100$; де: А – кількість живих плодів; В – кількість мертвих і резорбованих ембріонів; В – кількість жовтих тіл вагітності. Показниками ембріотоксичної дії «Мазь для ран» вважали: а) ембріональну (до- та постімплантаційну) загибель плодів; б) відставання у розвитку, що проявляється у зменшенні маси тіла і краніокаудальних розмірів плодів; в) появи патологій розвитку внутрішніх органів; г) вияву зовнішніх аномалій (тератогенний ефект).

Результати та їх обговорення

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що багаторазове дермальне нанесення препарату «Мазь для ран» вагітним щурам з 1 по 19 добу вагітності не викликало у тварин токсичний явищ. Результати досліджень впливу препарату «Мазь для ран» на ембріогенез щурів представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив препарату «Мазь для ран» на ембріогенез щурів

Показники	Група тварин	
	Дослідна	Контрольна
Кількість вагітних самок	11	10
Кількість жовтих тіл вагітності	$10,1 \pm 0,12^*$	$10,3 \pm 0,57$
Кількість місць імплантації	$9,55 \pm 0,41$	$9,8 \pm 0,51$
Кількість мертвих і резорбованих ембріонів	$0,19 \pm 0,12$	$0,18 \pm 0,13$
Кількість живих плодів	$9,49 \pm 0,54^{**}$	$9,6 \pm 0,49$
Маса плода, мг	$2588,09 \pm 1,12$	$2597,01 \pm 1,03$
Довжина плода, мм	$32,11 \pm 0,56^{***}$	$34,33 \pm 0,46$
Смертність доімплантаційна, %	$4,25 \pm 2,56^*$	$5,08 \pm 1,55$
Смертність постімплантаційна, %	$1,98 \pm 1,73^*$	$1,85 \pm 1,07$
Смертність загальна ембріональна, %	$6,55 \pm 2,66^*$	$7,29 \pm 1,67$
Співвідношення плодів, ч/ж	$1,19 \pm 0,11$	$1,21 \pm 0,21$
Кількість плодів з аномаліями	відсутні	відсутні

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ порівняно з контрольною групою.

При розтині щурів на 20 добу вагітності встановили, що самки, які отримали «Мазь для ран», по числу жовтих тіл в яєчнику, числу місць імплантацій і резорбованих ембріонів у матці, а також за кількістю живих і мертвих плодів істотно не відрізнялися від контрольних тварин. У групі вагітних щурів, яким дермально застосовували «Мазь для ран», доімплантаційна і загальна ембріональна смертність була нижчою показників контрольної групи відповідно на 16,3% і 10,2%. Постімплантаційна смертність перевищувала на 7,0% аналогічний показник контрольної групи.

Показники доімплантаційної, постімплантаційної і загальної ембріональної смертності в дослідній групі істотно не відрізнялися від показників контрольної групи ($P < 0,05$). При вивченні довжини і маси ембріонів затримка росту плодів не виявлено. При зовнішньому огляді у витягнутих з матки плодів значних видимих аномалій розвитку (каліцтв) не відмічено (таблиці 2).

Таблиця 2

Частота аномалій розвитку у плодів на 20 добу ембріогенезу щурів після застосування препарату «Мазь для ран»

Показники	Групи тварин	
	Дослідна	Контрольна
Кількість самок	11	10
Кількість крововиливів	$0,41 \pm 0,09^*$	$0,55 \pm 0,75$
Кількість гематом	$0,49 \pm 0,65^{**}$	$0,53 \pm 0,11$
Кількість гідронефрозів	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ порівняно з контрольною групою

Вияток становлять 3,7% крововиливів і 4,4% гематом у плодів дослідної групи. Відповідно – 5,3% гематом і 5,5% крововиливів у плодів у контрольної групи.

При дослідженні внутрішніх органів плодів дефектів їх розвитку не виявлено. Крім того, у ембріонів

тварин, оброблених «Мазь для ран» в період вагітності, не встановлено дефектів розвитку кісткової системи, що свідчить про те, що даний препарат не викликає порушення процесів остеогенезу. При порівнянні кількості кісток у всіх відділах скелета у ембріонів дослідної та контрольної груп патологій та достовірних відмінностей не встановлено.

На підставі отриманого можна зробити висновок про відсутність у препараті ембріотоксичної тератогенної дії при дермальному його застосуванні.

Далі проведено спостереження за постнатальним розвитком потомства у тварин підданих впливу препарату під час вагітності. Так, як вади розвитку і функціональна неповноцінність різних органів і систем часто виявляються після народження. При нашкірному нанесенні щурам «Мазь для ран» в дозі 0,5 г/кг з 1 по 19 добу вагітності не встановлено впливу препарату на кількість народжених щурят і відсоток мертворождалих плодів. Встановлено, що роди у піддослідних самок наступали, як правило, на 23 добу вагітності, як і у контрольних тварин. Чисельність посліду у самок, оброблених «Мазь для ран», була такою ж, як і в контролі. Показники смертності щурят і динаміка маси їх тіла протягом першого місяця життя, що піддавалися в пренатальному періоді розвитку впливу препарату «Мазь для ран», не відрізнялися від відповідних показників у контролі (таблиці 3, 4).

Таблиця 3

Показники постнатальної смертності щурят, які зазнавали впливу «Мазь для ран» з 1 по 19 добу вагітності

Показники	Дослідна	Контрольна
Кількість народжених щурят на 1 самку	$9,7 \pm 1,21$	$9,8 \pm 1,55$
Постнатальна смертність, %	$5,91 \pm 1,35^*$	$3,99 \pm 2,01$

Примітка: * – $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою

Таблиця 4

Показники постнатального розвитку щурят у самок, що піддавалися з 1 по 19 добу вагітності впливу «Мазь для ран»

Групи тварин	При народженні		На 7-му добу життя		На 14-ту добу життя		На 21-шу добу життя	
	Маса тіла щуренят, г	Довжина тіла щуренят, см	Маса тіла щуренят, г	Довжина тіла щуренят, см	Маса тіла щуренят, г	Довжина тіла щуренят, см	Маса тіла щуренят, г	Довжина тіла щуренят, см
Дослідна	$6,7 \pm 2,11$	$4,12 \pm 1,87$	$10,99 \pm 0,26^*$	$6,41 \pm 1,87$	$20,42 \pm 0,45^*$	$6,86 \pm 0,39^*$	$25,11 \pm 5,14$	$7,89 \pm 2,45$
Контрольна	$6,23 \pm 0,30$	$4,87 \pm 0,29$	$10,26 \pm 0,29$	$5,87 \pm 0,27$	$20,45 \pm 0,42$	$6,39 \pm 0,29$	$25,14 \pm 0,64$	$7,45 \pm 0,35$

Примітка: * – $P < 0,05$ порівнянн з контрольною групою

Висновки

Багаторазове дермальне нанесення препарату для зовнішнього використання «Мазь для ран» щурам з 1 по 19 добу вагітності не викликає ембріотоксичної дії, не підвищує показники передімплантаційної, постімплантаційної, загальної ембріональної смертності і не впливає на постнатальний розвиток щурят.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на клінічне випробування препарату, зокрема, на вивчення ефективності «Мазі для ран» при гіперкератозі діжок вимені корів

та завершення передреєстраційних клінічних випробувань.

Бібліографічні посилання

Sachuk, R.N., Tverdy, V.M., Zhyhalyuk, S.V., Dmytriiev, I.M., Stravs'ky, Ya.S., Katyukha, S.M. (2017). Patent na korysnu model' № 113784. Maz' dlya ran – preparat dlya profilaktyky ta likuvannya zakhvoryuvan' shkiry [Ointment for wounds - a preparation for the prevention and treatment of skin diseases]; zayavnyk i patentovlasnyk Doslidna stantsiya

- epizootolohiyi IVM NAAN; Byul. № 3 (in Ukrainian).
- Sachuk, R.N., Zhyhalyuk, S.V., Luk'yanyk, I.M., Stravs'kyi, Ya.S., Katsaraba, O.A., Neizvyesna, I.M. (2016). «Maz' dlya ran» – efektyvnyy fitopreparat dlya profilaktyky ta likuvannya zakhvoryuvan' shkiry u tvaryn [«Ointment for Wounds» is an effective phytopreparatum for the prevention and treatment of skin diseases in animals]. Materialy naukovo-praktychnoyi konferentsiyi molodykh vchenykh «Aktual'ni problemy veterynarnoyi biotekhnolohiyi ta infektsynoyi patolohiyi tvaryn». K., TsP «Komprynt» (in Ukrainian).
- Kosenko, M.V., Malyk, O.H., Kotsyumbas, I.Ya. (1997). Toksykologichnyy kontrol' novykh zasobiv zakhystu tvaryn [Toxicological control of new animal protection means: methodical recommendations]: metodychni rekomendatsiyi (in Ukrainian).
- Kotsyumbas, I.Ya., Malyk, O.H., Patereha, I.P. (2006). Doklinichni doslidzhennya veterynarnykh likars'kykh zasobiv [Preclinical studies of veterinary medicinal products]; za redaktsiyeyu I. Ya. Kotsyumbasa. – L'viv: Triada plyus (in Ukrainian).
- Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., Vavrysevich, Y. (2017). Research on acute and chronic toxicity of the experimental drug Amprolinsyl. Regul. Mech. Biosyst. 8(1), 41–45.
- Gutyj, B., Paska, M., Levkivska, N., Pelenyo, R., Nazaruk, N., Guta, Z. (2016). Study of acute and chronic toxicity of 'injectable mevesel' investigational drug. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University. 6(2), 174–180.
- Todoriuk, V.B., Hunchak, V.M., Hufrii, D.F., Gutyj, B.V., Khariv, I.I., Khomyk, R.I., Vasiv, R.O., Slobodiuk, N.M., Vyniarska, A.V., Zhuravlov, O.Iu., Husar, P.T., Nazaruk, N.V., Nazaruk, N.Ia., Soltys, M.P. (2017). Doslidzhennia hostroi ta khronichnoi toksychnosti eksperymentalnoho preparatu «Ferosel T». Naukovyi visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhytskoho. 19(73), 104–111 (in Ukrainian).
- Wilson, J.G. (1965). Embryological considerations in teratology. Teratology principles technigens. London, New-York. 6, 251–277.
- Dawson, A.B. (1926). Note on the staining of the skeleton cleared specimens with alizarin reds. Stain Technol., 1.

Received 22.09.2017

Received in revised form 18.10.2017

Accepted 23.10.2017