

WANDA BORZEMSKA, EWA KARPIŃSKA, GRAŻYNA KOSOWSKA, PIOTR SZELESZCZUK,
 MARIAN BINEK*, ELŻBIETA MALICKA**, HENRYK MALEC***, JERZY NIEDZIÓŁKA****

Badania nad embriotoksycznością preparatu Inosine pranobex w próbie biologicznej na zarodkach kurzych*)

Zakład Chorób Drobiu Katedry Epizootiologii, *Katedra Mikrobiologii

i **Katedra Patologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

***Zakład Consultingu i Usług Drobiarskich, ul. Mikołajczyka 11/14, 03-984 Warszawa

****Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska Wiejskiego Wydziału Zootechnicznego AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Summary

Studies on Inosine pranobex embryotoxicity in biological test on chicken embryos

A modified biological method using chicken embryos for the assessment of toxicity of the drug Inosine pranobex (made by Ewopharm – group I or Polfa – group II) was developed. The drugs at a dose of 50 mg/kg of body weight were injected into the while of an egg of embryos at the 6th day of embryogenesis. No teratogenic effects were found. Both drugs showed significant differences in embryotoxicity compared with the control group in favour of the drug made by Ewopharm. The differences were associated with hatching indices (59.88% in group I and 37.9% in group II), the deviation of the hatching diagram towards its delay and the prolongation of hatching time from pipping the shell to the disengagement from it. It was found that the drug of higher toxicity caused a delay of the process of embryogenesis; oedema of livers and kidneys were noticed as well. In chicken of group II a significant increase of alkaline phosphatase in the blood was also observed.

Próby biologiczne przeprowadzane na zarodkach ptaków należą do szczególnie czułych z powodu braku możliwości wydalania toksyn na zewnątrz jaja. Używano je do testowania rozmaitych związków chemicznych i leków (10), hormonów (7), kokcydiostatyków (2) oraz dodatków do pasz i żywności (3, 12). Według Vesely'ego i wsp. (14) testy na zarodkach nadają się do prób porównawczych przy ocenie toksyn grzybiczych. W podobnych badaniach własnych porównano zakres embriotoksyczności trzech stymulatorów wzrostu stosowanych aktualnie w paszach dla drobiu (3).

Preparat *Inosine pranobex* (Isoprinosine), użyty w przeprowadzonym eksperymencie, jest kompleksem 1 cząsteczki inozyiny z 3 cząsteczkami 1-(dwumetyloamino)-2-propranol-4-(acetamidobenzoenu). Stosowany jest w leczeniu jako immunostymulator i lek przy zwalczaniu niektórych infekcji wirusowych (9, 11). Potęguje on działanie mitogenów w stosunku do limfocytów T i B oraz wzmacnia aktywność interferonu (6).

Celem badań było ustalenie możliwości zastosowania biologicznego testu na zarodkach kurzych do różnicowania embriotoksyczności leku na przykładzie *Inosine pranobex* produkowanego przez dwie odrębne firmy.

Materiał i metody

Do testów porównawczych użyto 1997 zarodków, a do próby pilotowej 200 embrionów 6-dniowych. Jaja pochodziły od kur rodu Shaver w 6 mies. nieśności, o maksymalnej wylęgowości w szczycie 87%. Lężono je w aparacie halowym Reform Pol-drob D-108 i Atlas 180. W doświadczeniu pilotowym określono wpływ wzrastających dawek *Inosine pranobex* na wylęg. Zastosowano dawkę 50, 100 oraz 250 mg/kg masy ciała.

Grupę I stanowiło 486 zarodków, którym między 132 a 144 godz. inkubacji wstrzyknięto do białka w ostrym końcu jaja 0,1 ml wodnego roztworu preparatu *Inosine pranobex* (Isoprinosine – Ewopharm, Szwajcaria) w dawce 50 mg/kg m.c. wg sposobu opisanego wcześniej (2, 3). Tak podany preparat był spożywany przez zarodki wraz z białkiem między 12-16 dniem embriogenezy. Grupę II stanowiło 488 zarodków, które w tym samym wieku otrzymały, w analogiczny sposób, wodny roztwór preparatu *Inosine pranobex* (Gropinosin – Polfa). Do grupy III kontrolnej przeznaczono 497 embrionów, którym wstrzyknięto 0,1 ml PBS dla uwzględnienia strat spowodowanych zabiegiem. Grupa IV również kontrolna, w której nie zastosowano żadnego z badanych preparatów, obejmująca 526 zarodków była przeznaczona do oceny zdolności wylęgowej jaj.

Przekładu do komory klujnikowej dokonano w 458 godz. inkubacji. Diagramy lęgu (liczba wylężonych piskląt w jednostce czasu) i klucia (liczba naklutej skorupy w jednostce czasu) przeprowadzono wg metody opracowanej wcześniej (3, 5). Dodatkowo obliczono diagram czasu wykluwania tj. liczbę godzin od naklucia do wydostania się pisklęcia ze skorupy każdego jaja. Wylęg zakończono w 500 godz. inkubacji.

W surowicy 10 piskląt wylężonych z każdej grupy oznaczono standardowymi metodami (1) poziom białka całkowitego (g/dl), mocznika BUN (mg/dl), kwasu moczowego (mg/L) oraz aktywność aminotransferazy alaninowej AlAT (IU/L), aminotransferazy asparaginowej AspAT (IU/L) i fosfatazy alkalicznej (IU/dl). Wyniki biochemiczne oceniono statystycznie testem t-Studenta.

Wycinki wątroby, śledziony, nerki i torby Fabrycjusza wylężonych 1-dniowych piskląt poddano kontroli histopatologicznej. Skrawki utrwalono w 8% formalinie i barwiono metodą H-E oraz Sudanem III.

Zarodki zamarte poddano rutynowej analizie embriopatologicznej, wynotowując cechy podane w tab. 4. Wskaźniki wylęgu piskląt oraz dane liczbowe dotyczące zamartych zarodków przedstawiono w procentach w stosunku do nakładu 6-dniowych embrionów.

*) Praca finansowana przez KBN (proj. bad. nr 50102110023).

W opracowaniu statystycznym dokumentacji liczbowej porównano grupy I i II do grupy III testem jednorodności dla prób różnicowych wg Oktaby (8).

Wyniki i omówienie

W próbie pilotowej preparat *Inosine pranobex* podany w dawce 50 mg/kg m.c. (zalecana dawka lecznicza) obniżył wylęg wyłącznie w grupie II. Natomiast dawka dwukrotnie wyższa spowodowała obniżenie wylęgu w obu grupach doświadczalnych odpowiednio do 48% w I i 36% w II. Natomiast przy dawce 250 mg/kg wylęg w obu grupach obniżył się do 4%. W grupie kontrolnej III wylęg wynosił 80%.

W teście biologicznym na zarodkach kurzych stwierdzono podobnie jak w próbie pilotowej zasadnicze różnice w embriotoksyczności preparatu w zależności od jego pochodzenia.

W przebiegu wylęgu piskląt z zarodków 6-dniowych (tab. 1) stwierdzono istotne różnice między grupą I i III i między grupą II i III. Wylęg w grupie I był o 7,5% niższy w stosunku do grupy III ($p < 0,05$) natomiast w grupie II obniżenie wylęgu wyniosło 30,31% w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,01$). W grupie II na uwagę zasługuje także wysoki procent zamaryłych embrionów (20,9) stwierdzony w 7 dobie inkubacji to jest 24 godz. po inokulacji preparatu Groprinosin – Polfa oraz bardzo wysokie brakowanie piskląt po wylęgu (20,9%). Wyraźnie odkształcony został diagram łęgu grupy II ($p < 0,05$)

Tab. 1. Zamieranie zarodków, brakowanie i wylęg piskląt (%)

Grupa	Zamieranie zarodków			Pisklęta	
	po zabiegu	w komórce		wybrakowane	wylężone
		łęgowej	kłujnikowej		
I	9,88	5,76	6,17*	18,31**	59,88*
II	20,70**	6,15	15,16*	20,90**	37,09**
III	7,65	6,04	10,46	8,45	67,40
IV	–	1,90	3,04	9,32	85,74

Objaśnienia: * istotność różnic przy $p < 0,05$, ** przy $p < 0,01$.

Tab. 2. Analiza statystyczna diagramów łęgu, klucia i czasu wykluwania (godz.; $\bar{x} \pm s$)

Diagram	Grupa			
	I	II	III	IV
Łęgu	492,0 $\pm$ 5,2	493,3 $\pm$ 5,4**	491,9 $\pm$ 5,1	489,2 $\pm$ 5,4
Klucia	480,9 $\pm$ 7,7*	482,8 $\pm$ 7,9	482,0 $\pm$ 7,4	479,3 $\pm$ 7,2
Czasu wykluwania	10,9 $\pm$ 6,2**	10,7 $\pm$ 6,5*	9,5 $\pm$ 6,1	9,2 $\pm$ 5,5

Objaśnienia: * istotność różnic przy $p < 0,05$, ** przy $p < 0,01$.

Tab. 3. Kształtowanie się parametrów biochemicznych piskląt

Grupa	Białko całkowite g/dl	AlAT IU/L	AspAt IU/L	BUN mg/dl	Kwas moczowy mg/dl	Fosfataza alkaliczna IU/L
I	2,58 $\pm$ 0,54	15,8 $\pm$ 10,57	207,2 $\pm$ 49,9	11,5 $\pm$ 2,87	4,40 $\pm$ 2,35	1970,8 $\pm$ 343
II	2,49 $\pm$ 0,59	16,4 $\pm$ 6,78	222,1 $\pm$ 73,6	10,5 $\pm$ 0,97	4,69 $\pm$ 2,08	2263,7 $\pm$ 389*
II	2,51 $\pm$ 0,57	14,3 $\pm$ 4,16	206,3 $\pm$ 64,2	10,2 $\pm$ 1,87	4,20 $\pm$ 1,43	1817,5 $\pm$ 391
IV	2,44 $\pm$ 0,43	14,6 $\pm$ 4,32	217,8 $\pm$ 80,8	9,9 $\pm$ 1,37	3,40 $\pm$ 0,47	17 450,0 $\pm$ 268

Objaśnienie: * istotność różnic przy $p < 0,01$.

Tab. 4. Zmiany anatomopatologiczne zarodków zamarych (%)

Rodzaj zmian		Grupa			
		I	II	III	IV
Wady ułożenia		3,70	9,02*	4,83	2,09
Zahamowanie w rozwoju		1,03	7,38**	1,21	0
Retencja	woreczka żółtkowego	2,47	6,97	6,64	2,09
	białka	1,23	9,43**	1,21	1,52
Oddychanie płodowe		1,23	7,38**	2,28	0,95
Uszkodzenie	naczyń krwionośnych	1,65	6,15**	2,21	0,57
	narządów mięszszowych	4,11	23,97**	2,21	0
Odształcenia morfologiczne		0,2	0,82	0,80	0

Objaśnienia: * istotność różnic przy $p < 0,05$, ** przy $p < 0,01$.

wskazujący na opóźnienie embriogenezy. Przebieg wylęgu piskląt grupy I był zbliżony do wylęgu piskląt grupy III (tab. 2, ryc. 1). Natomiast czas od naklucia do wydostania się pisklęcia ze skorupy był wydłużony w obu grupach, co wskazuje na gorszą żywotność zarodków. W grupie I wyraźnie zaznaczyło się ($p < 0,05$) przyspieszenie nakluwania skorup. Nie można tego uznać za wadę, ponieważ czas nakluwania skorup zbliżony był do stwierdzanego w grupie IV (tab. 2).

Chociaż niskie wylęgi, wysokie brakowanie piskląt oraz odkształcenie diagramów łęgu i klucia przesadzają o embriotoksyczności preparatu Groprinosin-Polfa, nie udało się stwierdzić u wykłutych piskląt istotnych zmian w podstawowych parametrach biochemicznych, z wyjątkiem piskląt grupy II (tab. 3). Wykazano u nich wyraźny wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej ($p < 0,01$), co daje podstawę do przypuszczeń o uszkodzeniu funkcji czynnościowych wątroby. Badanie patomorfologiczne przeprowadzone na zdrowych pisklętach nie wykazały odchylenia od stanu prawidłowego wątroby, śledziony, nerek i torby Fabrycjusza. Obraz anatomopatologiczny zarodków, zamaryłych wskutek toksycznego działania preparatów zebrano w tab. 4. Najliczniej wystąpiły one w grupie II i dotyczyły wad ułożenia ($p < 0,05$), zahamowania w rozwoju, retencji białka, uszkodzenia naczyń i narządów mięszszowych ($p < 0,01$).

Wyniki te pozwalają na porównanie embriotoksyczności preparatu w obu grupach na niekorzyść leku *Inosine pranobex* produkcji Polfy. Uszkodzenie zarodków grupy I nie różniło się istotnie od zarodków, które otrzymały PBS (grupa III) z wyjątkiem retencji woreczka żółtkowego, który wykazywał wartości niższe, zbliżone do kontroli nie traktowanej (grupa IV).

Większość odnotowanych zmian patologicznych u zarodków grupy II wskazuje na opóźnienie embriogenezy (zahamowanie w rozwoju, trudności z wykorzystaniem białka, opóźnienie oddychania płucami). Stwierdzono także uszko-

dzenie narządów mięsowych (obrzęk wątroby i nerek oraz wytrącanie się soli moczanowych w nerkach) u zarodków zamaryłych 23,97% ($p < 0,01$) w stosunku do kontroli 2,91% (tab. 4). Pozwala to wyjaśnić wzrost aktywności ($p < 0,01$) fosfatazy alkalicznej u piskląt wyklutych w grupie II (tab. 3).

W obu grupach nie znaleziono zwiększenia się liczby odkształceń morfologicznych zarodków wskazujących na właściwości teratogenne preparatów. Użycie embrionów kurzych do testów porównawczych przez Verreta i wsp. (12) i Vesely'ego i wsp. (13, 14) pozwoliło na ustalenie, które z badanych mikotoksyn i związków chemicznych wykazywał niższą toksyczność dla ptaków. Metody te oparto o dożółtkowe podanie badanych związków a wyniki określono porównując wskaźniki wylęgu. Z przeprowadzonych badań wynika, że zarodki kurze nadają się do porównawczego testowania leków dla ptaków i dają możliwość doboru dla nich preparatów o niższej toksyczności. *Inosine pranobex* jak dotąd stosowany jedynie u ludzi, nie był kontrolowany na ptakach z wyjątkiem badań modelowych (6, 15).

Zaproponowana metoda iniekcji preparatów farmaceutycznych do białka w 6 dniu inkubacji (2, 3), poszerzona o diagramy lęgu, badania patomorfologiczne, biochemiczne i embriopatologiczne jest czułym testem przydatnym do ich kontroli.

Piśmiennictwo

1. Anon.: J. clin. Chem. Clin. Biochem. 24, 481, 1986.
2. Atef M., Shalaby A. A., Khafagy A., Abo-Norag M. A.: Dt. trierärztl. Wschr. 96, 285, 1989.
3. Borzemska W., Karpińska E., Szeleszczuk P., Binek M., Malicka E., Kosowska G., Malec H.: Medycyna Wet. 51, 745, 1995.
4. Borzemska W., Kosowska G., Malec H., Piusiński W., Niezgoda J., Malec L.: Medycyna Wet. 47, 366, 1991.
5. Malec H., Borzemska W., Malec L.: Roczn. Nauk. Roln. 106, 93, 1990.
6. Moya P., Alonso M. L., Baixeras E., Ronda E.: Inter. J. Immunopharm. 6, 339, 1984.
7. Niedziółka J., Salichon M. R., Blum J. C.: Arch. Geflügelk. 58, 61, 1994.
8. Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i metoda doświadczalnictwa. PWN, Warszawa 1974.
9. Pedersen C., Sandstrom E., Petersen C. S.: N. Engl. J. Med. 322, 1757, 1990.
10. Peterka M., Jelinek R., Benesova O.: Arch. Toxicol. Suppl. 4, 413, 1980.
11. Thorsen S., Pedersen C., Sandstrom E.: J. Inter. Med. 231, 607-615, 1992.
12. Verret M. J., Scott W. F., Reynaldo E. F., Alterman E. K., Thomas C. A.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 265, 1980.
13. Vesely D., Vesela D.: Vet. Med. (Praga) 36, 175, 1991.
14. Vesely D., Vesela D., Jelinek R.: Toxicol. Lett. 13, 239, 1982.
15. Woźniak M., Błaszczak B., Krawczyk E., Dobryszczyka W.: Arch. Imm. Ther. Exp. 33, 783, 1985.

Adres autora: prof. dr hab. Wanda Borzemska, ul. Perzyńskiego 8 m. 18, 01-872 Warszawa

KAROL KOTOWSKI, ANDRZEJ SZROM, PIOTR BIELECKI
Kępno Domaszowice

Obserwacje kliniczne nad przydatnością Uterotonic-Polfa w ograniczeniu syndromu MMA u loch

Summary

Clinical observations on the usefulness of Uterotonic-Polfa in the restriction of MMA syndrome in sows

The studies were carried out in an industrial farm consisting of 120 sows and 1239 piglets born to them. The sows selected at random were divided into two groups. Sixty female pigs (group I) were given Uterotonic at a dose of 50 mg of propranolol (10 ml of the solution) per sow. The drug was administered once intramuscularly during parturition or a few hours after its accomplishment. The second group of 60 sows served as a control. In the control group signs of MMA were recorded in 15 per cent of the sows and in the experimental one in 8.33 per cent. The puerperal period in sows receiving Uterotonic lasted 3-5 days shorter than that in the control group. In piglets of the experimental group the signs of diarrhoea were observed in 12 litters (20 per cent) and in the control in 16 litters (26.66 per cent). Mortality in the experimental group was 5.87 per cent in the control one - 8.61 per cent. Better pro-

ductive effects within 21 days after birth were also noted in the experimental group of animals than in the control one although the difference was statistically nonsignificant.

Efektywność produkcji trzody chlewnej jest w znacznym - jeżeli nie w decydującym - stopniu uzależniona od prawidłowego odchowu prosiąt. Z danych piśmiennictwa wynika (6, 8, 22), że straty wśród żywo urodzonych osesków są znaczne i wynoszą od 12 do 30%. Ci sami autorzy podają, że główną przyczyną strat w pierwszym okresie życia prosiąt jest ich niedożywienie, związane z hipo- lub agalakcją loch.

Analizując przyczyny narastania problemu zaburzeń mleczności poporodowej w stadach wielkotowarowych świń, Backström i wsp. (1) zwrócili uwagę, że w chlewniach, w których w okresie okołoporodowym przemieszczano maciory z wybiegów do małych kojców porodowych, zachorowalność macior przebiegająca z objawami hipo- lub agalakcji była wyraźnie wyższa, niż wtedy, gdy lochy przebywały przez cały okres cyklu reprodukcyjnego nawet w gorszych warunkach, ale bez zdecydowanej ich zmiany w okresie okołoporodowym.