

## РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭМБРИО-ФЕТАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА ЭПИФИЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (GP20041)

Д. С. Гайдай<sup>1</sup>, А. В. Калатанова<sup>2</sup>, А. Е. Кательникова<sup>1</sup>, О. И. Авдеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия,

*gajdaj.ds@doclinika.ru;*

*katelnikova.ae@doclinika.ru;*

<sup>2</sup> ЗАО «Фарм-Холдинг», Россия,

*Anna.Kalatanova@geropharm.com;*

*Olga.Avdeeva@geropharm.com*

*Проведено экспериментальное in vivo доклиническое исследование эмбрио-фетальной токсичности лекарственного препарата на основе экстракта эпифиза крупного рогатого скота (GP20041) (ООО «ГЕРО-ФАРМ», Россия). Тест-системой явились беременные кролики породы Советская шиншилла. Лекарственный препарат вводили внутримышечно многократно с 6-го по 28-й день беременности в дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую. Регистрируемые параметры: клиническое состояние, масса тела, пред- и постимплантационная смертность, макро- и микроскопические исследования репродуктивных органов, аномалии развития плодов при гистологическом исследовании и изучении скелета по методике Доусона. В результате исследования установлено, что лекарственный препарат GP20041 в дозе, эквивалентной 10 терапевтическим, не оказал эмбрио- и фетотоксического действия при многократном внутримышечном введении кроликам в период беременности.*

**Ключевые слова:** экстракт эпифиза, эмбриотоксичность, фетотоксичность, пред- и постимплантационная смертность, пренатальное развитие, кролики, инверсия времени суток.

Изучение репродуктивной токсичности – важный аспект доклинической оценки безопасности оригинальных препаратов и регламентируется требованиями нормативных документов [1–4]. Исследуемый препарат – GP20041 – препарат на основе экстракта эпифиза крупного рогатого скота (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

### Цель работы

Определить потенциальное эмбрио- и фетотоксическое действия исследуемого препарата GP20041 (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия), в антенатальном периоде развития при многократном внутримышечном введении самкам кроликов в период беременности.

### Методика исследования

Дизайн исследования был разработан в соответствии с рекомендациями ICHS5 (R3) Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals [4] и Руководства по проведению доклини-

ческих исследований лекарственных средств [5]. До оплодотворения в течение 14 дней проводили адаптацию животных к условиям содержания. После адаптации 40 самок кроликов были оплодотворены. По результатам диагностики беременности методом ультразвукового исследования (УЗИ) и пальпации на 15-й день после спаривания в исследовании были оставлены только беременные самки, которые распределили на 2 группы (1:1) методом модифицированной блочной рандомизации: в контрольной группе 18 животных, в опытной 17 (всего 35 беременных самок). Возраст животных на начало адаптации составил 5 месяцев, масса тела 3,0–3,6 кг.

Опытным кроликам с 6 по 28 дни беременности [4] внутримышечно вводили исследуемый препарат GP20041 в дозе 5,11 мг/кг. Выбор доз проведён на основании рекомендаций ICH S6 (R1) п. 5.3 и ГОСТ Р 56699-2015 [6, 7]. Исследованная доза препарата была кратна 10 терапевтическим дозам для человека, рассчитанная

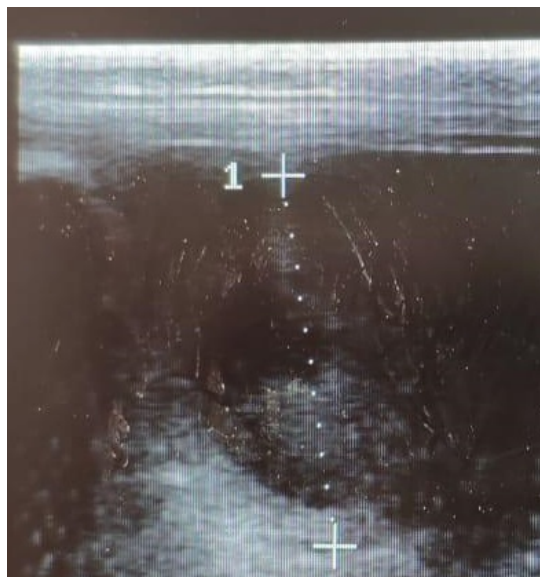
с учетом коэффициентов пересчета доз. Контрольным животным по той же схеме вводили физиологический раствор.

На протяжении всего исследования проводили ежедневное клиническое наблюдение, регулярное взвешивание животных. На 15-й день после спаривания проводили дополнительную

оценку беременности животных. Оценка беременности включала в себя пальпацию брюшной стенки в области матки и УЗИ (рис. 1). УЗИ проводили с помощью аппарата ультразвуковой диагностики Mindray DP-50 («Mindray», Китай). Исследование выполняли в положении на боку или на спине.



а



б

Рис. 1. Диагностика беременности животных:  
а – пальпация беременной самки; б – ультразвуковое исследование плода

Эвтаназию животных осуществляли на 29-й день беременности с помощью передозировки анестетиком (начальный этап) с последующим удалением жизненно важных органов (конечный этап).

Патоморфологическое исследование включало в себя necropsy с подробным макроскопическим исследованием органов репродуктивной системы беременных самок и их гистологическое исследование. Подсчитывали число желтых тел в обоих яичниках, число мест имплантации в матке в обоих рогах, число живых и погибших эмбрионов с оценкой ранней и поздней резорбции. Оценивали предимплантационную смертность (эмбриотоксическое действие), как разность между числом желтых тел в яичниках и числом мест имплантации в матке, и постимплантационную смертность (фетотоксическое действие) – разность между числом мест имплантации в матке и числом живых плодов. У всех живых эмбрионов, извлеченных при проведении плановой necropsy, регистрирова-

ли индивидуальную массу тела и краниокаудальный размер, проводили внешний осмотр с целью выявления возможных аномалий развития. По окончании осмотра все живые эмбрионы каждой экспериментальной группы были эвтаназированы и поделены на две группы, примерно равные по числу особей. У первой половины эмбрионов в ходе гистологического исследования изучали состояние внутренних органов (особое внимание уделяли состоянию и уровню развития органов репродуктивной системы) по методике Вильсона [5] с определением пола эмбрионов, у второй половины – состояние и уровень развития скелета по методике Доусона [8], модифицированной в отделе эмбриологии НИИЭМ АМН РФ.

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения Graph Pad Prism 9.0.2 («GraphPadSoftware», США). Исследование было одобрено для проведения биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», протокол 3.45/20 от 12.08.2020.

**Результаты исследования и их обсуждение**

По результатам клинического наблюдения за беременными самками, анализов данных по массе тела установлено, что многократное внутримышечное введение исследуемого препарата GP20041 в дозе 5,11 мг/кг самкам кроликов в период беременности не привело к развитию негативных последствий на физическое состояние животных и не повлияло на течение беременности. Ультразвуковое исследование плодов не выявило отклонений от нормы. Средний прирост массы тела с 1-го до 29-го дня беременности в контрольной группе составил 19 %, в опытной группе – 16 %, различия были статистически не значимы.

При оценке пренатального развития плодов самок кроликов, получавших в период беремен-

ности исследуемый препарат GP20041, не было получено различий с контрольными животными по количеству желтых тел, мест имплантации, живых и погибших плодов (с ранней и поздней резорбцией). При оценке эмбрио- и фетотоксического действия по показателям предимплантационной и постимплантационной смертности не было выявлено отличий между животными, получавшими исследуемый препарат в период беременности, и контрольной группой. В ходе эксперимента у плодов экспериментальных групп не было зарегистрировано аномалий развития (табл. 1).

Количество плодов одного пола и их физические параметры (масса тела плодов и их краниокаудальный размер) не отличались между экспериментальными группами (табл. 2).

Таблица 1

**Оценка влияния исследуемого препарата на пренатальное развитие плодов на 29-й день беременности**

| Исследуемый параметр                        | Характеристика групп             |                     |
|---------------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
|                                             | Физиологический раствор, 0 мг/кг | GP20041, 5,11 мг/кг |
|                                             | n = 18                           | n = 17              |
| Число желтых тел, М ± SEM                   | 8,2 ± 0,57                       | 8,8 ± 0,51          |
| Число мест имплантации, М ± SEM             | 6,7 ± 0,49                       | 6,9 ± 0,47          |
| Число живых эмбрионов, М ± SEM              | 6,4 ± 0,47                       | 6,7 ± 0,53          |
| Число погибших эмбрионов, Ме (Q1; Q3)       | 0,0 (0,0; 0,0)                   | 0,0 (0,0; 0,0)      |
| Число ранних резорбций, Ме (Q1; Q3)         | 0,0 (0,0; 0,0)                   | 0,0 (0,0; 0,0)      |
| Число поздних резорбций, Ме (Q1; Q3)        | 0,0 (0,0; 0,0)                   | 0,0 (0,0; 0,0)      |
| Предимплантационная смертность, Ме (Q1; Q3) | 0,0 (0,0; 0,0)                   | 0,0 (0,0; 0,0)      |
| Постимплантационная смертность, Ме (Q1; Q3) | 1,0 (0,0; 2,0)                   | 2,0 (1,0; 3,0)      |
| Число эмбрионов с внешними аномалиями       | –                                | –                   |

Таблица 2

**Масса тела, размер и распределение по полу плодов самок кроликов на 29-й день беременности**

| Исследуемый параметр                      | Характеристика групп             |                     |
|-------------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
|                                           | Физиологический раствор, 0 мг/кг | GP20041, 5,11 мг/кг |
|                                           | n = 116                          | n = 114             |
| Масса тела, г, М ± SEM                    | 46,6 ± 0,94                      | 47,6 ± 0,78         |
| Краниокаудальный размер, мм, М ± SEM      | 102,1 ± 1,52                     | 100,0 ± 1,65        |
| Распределение плодов по полу, самцы/самки | 60/56                            | 53/61               |

По результатам патоморфологического исследования многократное внутримышечное введение исследуемого препарата GP20041 самкам кроликов в период беременности не привело к патологическим изменениям репродуктивных органов самок. Эндометрий матки имел

сильно извитые железы, в рыхлой строме многочисленные сосуды. Микроскопическое строение плаценты соответствовало норме. Плацента была представлена зонами: лабиринтным отделом, соединительной зоной, децидуальной зоной. В соответствии со сроком беременности

в децидуальной зоне определялись обширные участки некроза, очаги кальцификации, тромбы в мелких сосудах, также присутствовало большое количество гигантских клеток трофобласта, массивные кровоизлияния.

Яичники были представлены корковым и мозговым веществом.

В корковом слое располагались немногочисленные фолликулы и несколько больших желтых тел, тека-ткань располагалась ритмично, без проявлений склероза.



Рис. 2. Скелет эмбриона, извлеченного из полости матки самки кролика № 1.4 контрольной группы

При сопоставлении данных патоморфологического исследования плодов кроликов контрольной группы и группы, получавшей исследуемый препарат, было установлено, что топография всех исследуемых органов на 29-й день беременности была в пределах анатомической нормы, характерной для данного вида и породы животных. Гистологическое строение соответствовало возрасту плодов. Патологических изменений в органах и тканях обнаружено не было.

На поперечном срезе головного отдела определялись полушария головного мозга, ствол и мозжечок, периферические ганглии. Отмечалась начальная дифференцировка серого и белого вещества. Миграция нейронального комплекса была еще не завершена.

В паравентрикулярной зоне четко определялся зародышевый слой и сохранившийся медуллярный эпителий (рис. 4).

В сердце плодов экспериментальных групп просматривались все четыре камеры. Толщина миокарда левого и правого желудочка была одинакова. Папиллярные мышцы были хорошо выражены. Полости были концентрически

Целостность всех плодов была сохранена, анатомическое строение соответствовало норме. Голова, хвост, грудные и тазовые конечности сформированы, отмечалось по 4 пальца на каждой тазовой конечности и по 5 пальцев на каждой грудной с зачатками когтей. Волосной покров отсутствовал, веки были сомкнуты плотно, наружный слуховой проход закрыт ушной раковиной.

При исследовании плодов кроликов экспериментальных групп отмечено физиологическое развитие костных тканей (рис. 2, 3).



Рис. 3. Скелет эмбриона, извлеченного из полости матки самки кролика № 2.6 опытной группы

сужены с небольшим количеством крови. Крупные предсердия сердца были наполнены кровью (рис. 5).

Ткань легких имела железистое строение из округлых клеток недифференцированной мезенхимы. На срезах просматривались просветы эпителиальных трубок бронхов 1-го и 2-го порядков. Более мелкие бронхиолы представляли собой железистые трубочки, широкий просвет неправильной формы выявлялся в зоне дихотомического деления. Просвет большинства трубок был закрыт (рис. 6).

Слизистая желудка, прилегающая к пищеводу, была покрыта многослойным плоским эпителием, в остальных отделах – однослойным цилиндрическим эпителием. Определялись формирующиеся крипты и ворсинки, мезенхимальный подслизистый слой и тонкая мышечная пластинка.

Слой цилиндрического эпителия слизистой оболочки был рыхло связан с подлежащими тканями. Стенка с выраженным мышечным слоем, цилиндрический эпителий слизистой формировали крипты и ворсинки (рис. 7).



Кишечная трубка на всем протяжении имела одинаковое строение. Отмечалось начало формирования крипт и ворсинок без дифференцировки слизистой по отделам кишечника. Просвет кишечника плодов контрольной группы в отдельных участках был закрыт сосочковыми структурами слизистой, покрытой цилиндрическим эпителием (рис. 8).

Печень эмбрионов крупная, занимала большую часть брюшной полости, полнокровна. Имела сетчатую структуру за счет сформированных клеточных балочек и кровяных синусов. Гепатоциты с четкими контурами, небольшой зернистостью цитоплазмы. Трабекулярная система печени и гепатоциты имели строение типичное для взрослых кроликов, и не демонстрировали патологических изменений. Синусы широкие. В просвете закладок синусоидных капилляров и в мезенхиме между балочками печеночных клеток в эмбриональных кровяных островках отмечалось кроветворение (миэлопоэз).

Множество очагов экстрамедуллярного кроветворения были диффузно распределены в паренхиме печени (рис. 9).

На 29-й день беременности почки плодов кроликов располагались симметрично и находились в крестцово-поясничном отделе (каудальнее, чем у взрослых кроликов). Почки плодов уже имели типичное метанефрическое строение с выраженными кортикальным и мозговым слоями и почечной лоханкой. У плодов почки на этой стадии развития еще не до конца были сформированы и имели ряд эмбриональных черт – слабо развита капиллярная сеть (особенно в почечных тельцах), каналцы нефронов укорочены и слабо дифференцированы (рис. 10).

Семенники плодов имели типичное строение с не полностью сформированными канальцами (рис. 11). Яичники были не сформированы, граница между слоями стерта, в ткани были не четко видны небольшие примордиальные фолликулы (рис. 12).

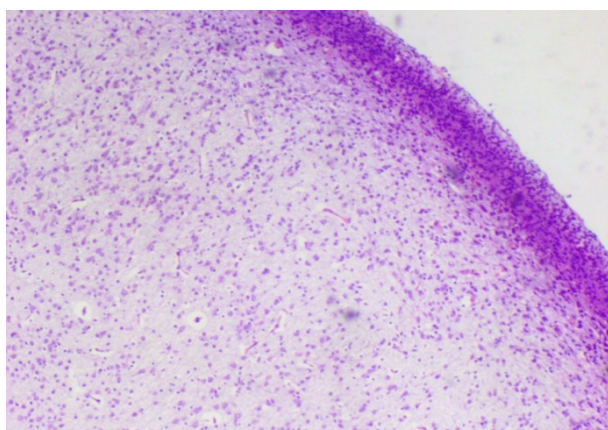


Рис. 4. Головной мозг эмбриона.  
Окраска гематоксин-эозин. Увеличение  $\times 40$

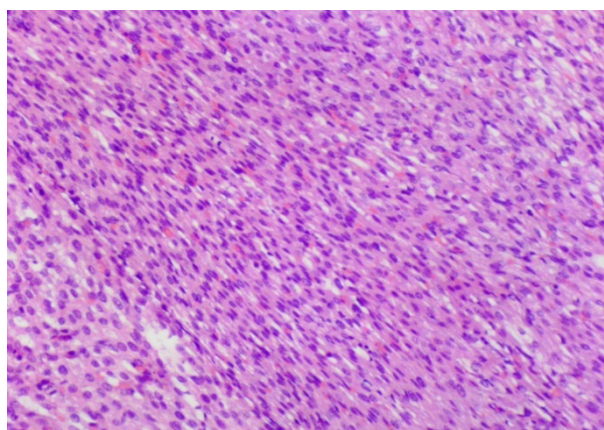


Рис. 5. Сердце эмбриона.  
Окраска гематоксин-эозин. Увеличение  $\times 100$

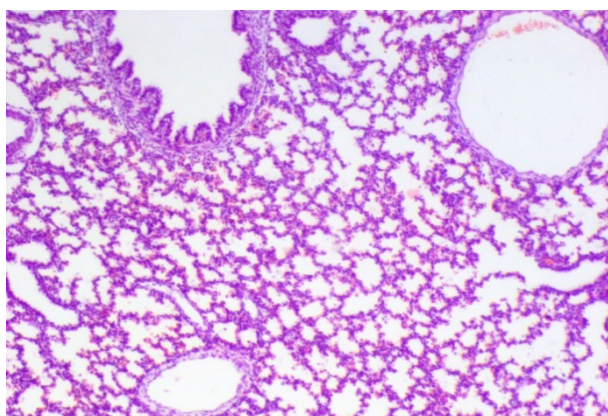


Рис. 6. Легкое эмбриона. Окраска гематоксин-эозин. Увеличение  $\times 40$

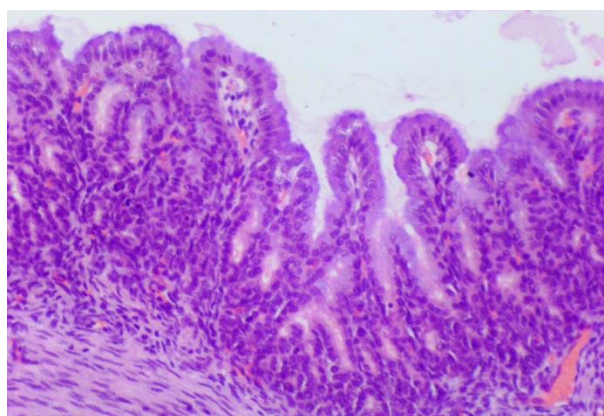


Рис. 7. Желудок эмбриона.  
Окраска гематоксин-эозин. Увеличение  $\times 100$



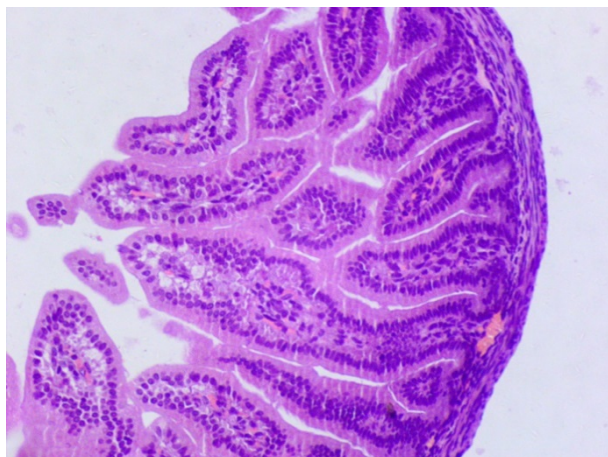


Рис. 8. Кишечник эмбриона.  
Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение  $\times 100$

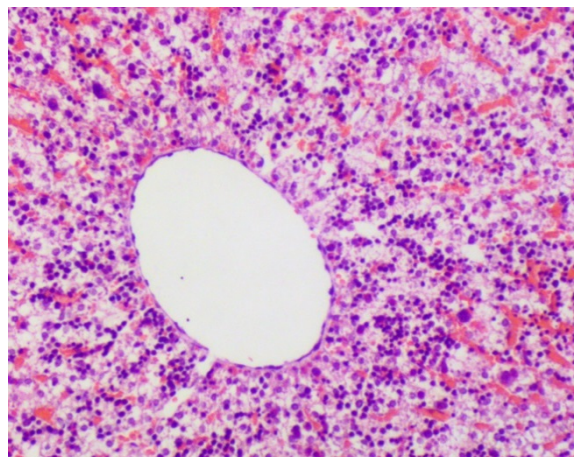


Рис. 9. Печень эмбриона.  
Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение  $\times 100$

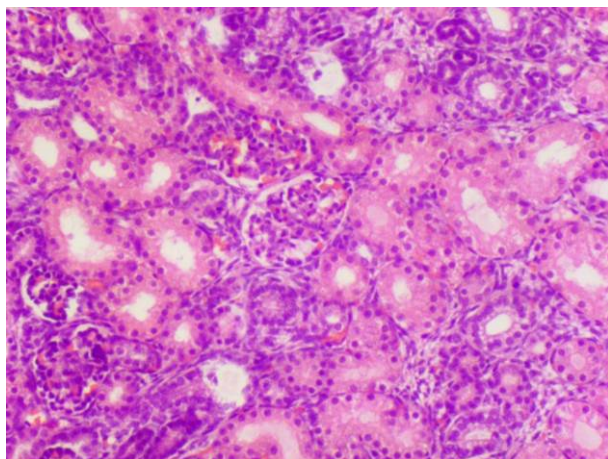


Рис. 10. Почка эмбриона.  
Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение  $\times 100$

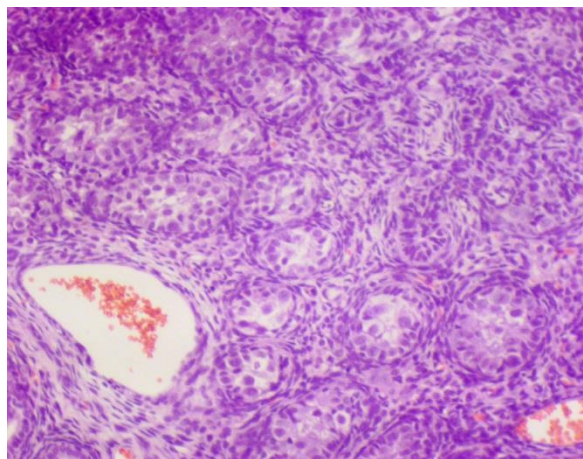


Рис. 11. Семенник эмбриона.  
Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение  $\times 100$

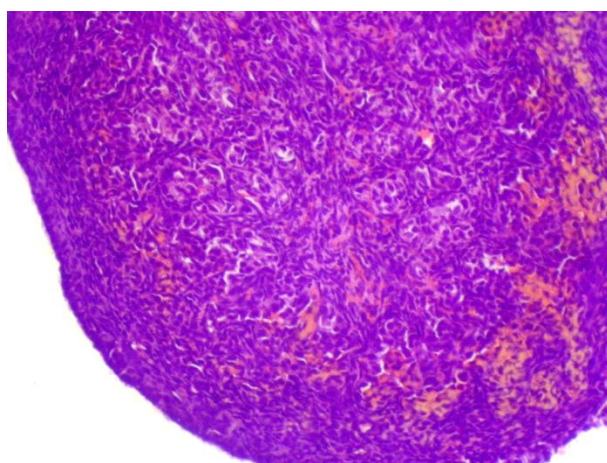


Рис. 12. Яичник эмбриона. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение  $\times 100$

По результатам гистологического исследования внутренних органов плодов экспериментальных групп можно заключить, что исследуемый препарат не оказал тератогенного действия.

#### Заключение

Лекарственный препарат GP20041 на основе экстракта эпифиза крупного рогатого скота (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия), в дозе 5,11 мг/кг

(эквивалентная 10 терапевтическим дозам) не оказал эмбрио- и фетотоксического действия при многократном внутримышечном введении самкам кроликов в период беременности.

*Финансирование исследования осуществляло ЗАО «Фарм-Холдинг», являющееся R&D центром компании ООО «ГЕРОФАРМ».*

***Благодарности***

*Коллектив авторов выражает благодарность редакции журнала «Лекарственный вестник» за возможность публикации результатов исследования.*

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (с изменениями и дополнениями). – Текст : непосредственный.
2. Национальный стандарт ГОСТ 56701-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств». – Текст : непосредственный.
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств // под ред. А. Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2014. – Т. I. – 328 с. – Текст : непосредственный.
4. ICH S5 (R3) «Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals». – Text (visual) : unmediated.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов. – Москва: Гриф и К., 2012. – 944 с.
6. ICH (International Conference on Harmonization). ICH S6 (R1) –Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals // GI, Step. – 1997. – Vol. 5. – 22 p. – Text (visual) : unmediated.
7. Национальный стандарт российской федерации ГОСТ Р 56699-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации». – Текст : непосредственный.
8. *Дыбан, А. П.* Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ / А. П. Дыбан, В. С. Баранов, И. М. Акимов. – Текст : непосредственный // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1970. – Т. 59. – С. 89 – 100.