

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ СУБТИЛИЗИНОВ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ТОКСИЧНОСТЬ. I. АНТЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

**Татьяна Анновна ЭМЕДОВА¹, Светлана Владимировна МИШЕНИНА¹,
Павел Геннадьевич МАДОНОВ¹, Татьяна Геннадьевна БОРОВСКАЯ²,
Анна Владимировна ВЫЧУЖАНИНА², Валерия Александровна МАШАНОВА²**

¹ *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52*

² *НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ
634028, г. Томск, просп. Ленина, 3*

При изучении возможных эмбриотоксических свойств иммобилизованных субтилизинов, реализуемых в антенатальном периоде развития, установлено, что при его введении крысам-самкам в дозе 195 ЕД/кг в течение всего периода беременности токсических эффектов не выявлялось. При дозе 1950 ЕД/кг возрастает гибель плодов после имплантации, у живых плодов увеличивается количество наружных кровоизлияний, патологических изменений внутренних органов, тормозятся процессы оссификации.

Ключевые слова: иммобилизованные субтилизины, репродуктивная токсичность, антенатальный период.

В современной фармакологии для полноценного изучения лекарственного препарата необходимо выполнение экспериментальных исследований их репродуктивной токсичности. Эксперименты проводятся на различных животных, преимущественно грызунах, оценивается способность лекарственного препарата оказывать токсическое воздействие на репродуктивные органы с последующим снижением половой функции и способности к размножению, а также патологическое воздействие на развитие потомства [3, 4]. Результаты экспериментов по репродуктивной токсичности дают возможность, во-первых, оценить риск применения препарата и предотвратить развитие бесплодия у пациентов, во-вторых, исключить негативное влияние на плод, с последующим влиянием на новорожденного ребенка.

Цель исследования – изучить возможное эмбриотоксическое и тератогенное действие лекарственного средства на основе иммобилизованных субтилизинов при введении его во время беременности, реализуемое в антенатальном периоде развития.

Задачи исследования соответствуют основным критериям токсичности при изучении влияния на антенатальный период развития. Предстояло исследовать изменение динамики массы беременных крыс, увеличение показателей эмбриональной гибели, размера и массы плодов, изменение распределения крысят по полу, появление в потомстве плодов с увеличением (уменьшением) точек оссификации, с патологическими изменениями наружных и внутренних органов.

Эмедова Т.А. – аспирант кафедры акушерства и гинекологии

Мишенина С.В. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Мадонов П.Г. – д.м.н., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: madonov@scpb.ru

Боровская Т.Г. – д.б.н., проф., зав. лабораторией фармакологии репродуктивной системы, e-mail: repropfarm@yandex.ru

Вычужанина А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы

Машанова В.А. – младший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали лекарственное средство на основе иммобилизованных субтилизинов (ЛПИС) – тромбовазим®. Активной фармакологической субстанцией тромбовазима® является иммобилизованный на полиэтилен-оксиде с помощью технологии радиационного синтеза субтилизин. Субтилизин тромбовазима® состоит из 275 аминокислот, его молекулярная масса 27,7 кДа. В настоящее время зарегистрированы две лекарственные формы препарата с одинаковым названием. Показание к применению парентеральной формы – лечение острого инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST, энтеральной формы – лечение хронической венозной недостаточности.

Для исследования репродуктивной токсичности ЛПИС препарат применялся в жидком виде, вводился перорально. Приготовление доз для введения осуществлялось в день введения в необходимом количестве. ЛПИС вводился крысам в терапевтической дозе 195 ЕД/кг и в дозе 1950 ЕД/кг (максимальная доза) в соответствии с Руководством по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ [4].

Эксперименты выполнены на половозрелых животных: аутбредных крысах сток CD массой 250–300 г, в возрасте 2,5–3 мес., полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (НИИФиРМ, г. Томск). Дизайн экспериментов одобрен этическим комитетом НИИФиРМ. Крысы содержались в неполной барьерной системе в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Животные были адаптированы в виварии в отдельной комнате в течение трех дней до начала введения. Во время этого периода осуществляли ежедневный осмотр их внешнего состояния.

При изучении возможного эмбриотоксического и тератогенного действия ЛПИС, реализуемого в антенатальном периоде развития, препарат вводился беременным крысам-самкам перорально с 1 по 19 день беременности в терапевтической (195 ЕД/кг массы тела) и максимальной (1950 ЕД/кг массы тела) дозе. Контрольные животные получали растворитель (физиологический раствор) в те же сроки в эквивалентном объеме. В исследовании использовались данные контрольных групп прежних подобных экспериментов, обобщенные в группу «исторический контроль». Первый день беременности фиксировали

с помощью цитологической оценки вагинального мазка после подсаживания самок к интактным крысам-самцам. В течение периода беременности оценивалась динамика массы тела крыс (животных взвешивали на 1, 7, 14 и 20 дни беременности). Крысам на 20 день беременности проводилась эвтаназия (с помощью CO₂-камеры). Затем их вскрывали и подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации в матке, число живых и мертвых плодов. Преимплантационную смертность определяли по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке, постимплантационную смертность – по разности между количеством мест имплантации и количеством живых плодов [4]. Живые плоды выделялись, определялась их масса, краниокаудальный размер, пол. Проводился макроскопический осмотр плодов на наличие у них внешних патологических изменений. В дальнейшем исследовалось состояние их внутренних органов (по методу Вильсона) и процессов оссификации (по методу Доусона) [4]. Для проведения этих исследований использовались 20 крыс-самок опытной группы (две дозы), 10 контрольных самок и 10 крыс-самцов.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами вариационной статистики. Вычисляли среднее арифметическое (X), ошибку среднего арифметического (m), результаты представляли в виде $X \pm m$. Различие двух сравниваемых величин считалось статистически значимым в том случае, если вероятность их тождества была меньше 5 % ($p < 0,05$). В случаях нормального распределения признаков для статистической оценки применяли параметрический t -критерий Стьюдента. При больших отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок был использован непараметрический U -критерий Манна – Уитни. Для выявления достоверности различий качественных показателей использовался критерий углового преобразования Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований установлено, что поведение и внешний вид крыс-самок, получавших ЛПИС в различные периоды беременности в исследуемых дозах, не отличались от таковых в контрольных группах. Крысы не проявляли признаков беспокойства и агрессии, имели хороший аппетит, были подвижны, имели гладкий шерстяной покров. Масса тела животных после 7-дневного введения ЛПИС в максимальной дозе не отличалась от фоновых значений (исторический контроль), но достоверно снижалась по сравне-

Таблица 1

Прирост массы тела (г) беременных крыс, которым вводили ЛПИС с 1 по 19 день беременности

Группа	Дни беременности			
	1–7	7–14	14–20	1–20
ЛПИС (195 ЕД/кг), n = 12	30,08 ± 1,63 [#]	33,83 ± 2,53	47,17 ± 4,45	107,58 ± 7,12
ЛПИС (1950 ЕД/кг), n = 11	22,73 ± 4,38 [*]	33,18 ± 4,03	47,64 ± 4,01	103,55 ± 5,94
Контроль, n = 12	33,33 ± 2,10 [#]	34,17 ± 2,90 [#]	46,83 ± 7,17	113,50 ± 9,73
Исторический контроль, n = 46	27,26 ± 1,34	31,41 ± 1,41	53,22 ± 1,69	111,89 ± 3,81

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – соответствующего контроля, # – исторического контроля.

Таблица 2

Влияние ЛПИС на эмбриональное развитие крыс, полученных от самок, которым вводили ЛПИС с 1 по 19 день беременности

Группа	Число желтых тел на 1 самку	Число мест имплантации на 1 самку	Число живых плодов на 1 самку	Преимплантационная гибель, %	Постимплантационная гибель, %	Средняя масса плодов, г	Средний размер плодов, мм
ЛПИС (195 ЕД/кг), n = 11	14,08 ± 0,78	11,58 ± 1,14	10,58 ± 1,07	17,91 ± 6,71	8,99 ± 3,08	2,43 ± 0,04	28,88 ± 0,86
ЛПИС (1950 ЕД/кг), n = 10	14,40 ± 0,52	12,50 ± 1,13	10,40 ± 1,28	14,41 ± 6,18	18,27 ± 4,90 ^{#*}	2,37 ± 0,04	29,46 ± 0,37
Контроль, n = 11	14,10 ± 0,82	12,60 ± 0,85	12,30 ± 0,86	10,74 ± 2,83	2,49 ± 1,32	2,41 ± 0,06	29,43 ± 0,27
Исторический контроль, n = 46	13,91 ± 0,30	12,85 ± 0,32	12,02 ± 0,31	7,65 ± 1,23	6,38 ± 1,20	2,16 ± 0,03	29,24 ± 0,11

нию с контролем, что не отразилось на общем приросте массы тела за весь период беременности (табл. 1). Повышение исследуемого показателя по сравнению с фоном не является результатом действия ЛПИС, так как и в контроле он оказался увеличенным по сравнению с фоном. Фармакокинетика ЛПИС указывает на то, что наряду с высокой энтеральной биодоступностью оно не депонируется в тканях и, соответственно, не может вызвать существенных морфофункциональных повреждений. Ранее изучено положительное действие терапевтических доз ЛПИС на периферическое кровообращение [1]. Влияние ЛПИС в терапевтической дозе на эмбриональное развитие крыс подтвердило предположение об отсутствии негативного влияния ввиду низкой тканевой кумуляции.

При введении ЛПИС в максимальной дозе (1950 ЕД/кг) число желтых тел, мест имплантации и преимплантационная гибель не отличались от контрольных значений. При этом число плодов имело выраженную тенденцию к снижению, достоверно возростала постимплантационная гибель по сравнению с контролем и фоном (табл. 2).

Фетоплацентарный комплекс беременной самки уязвим для 10-кратного повышения дозы ЛПИС. Высокие дозы ЛПИС вызывают избыточную перфузию материнской части плаценты с формированием локальной гиперемии и последующего отека, что понижает диффузию в фетоплацентарном комплексе. Это предположение согласуется с особенностями формирования и функционирования фетоплацентарного комплекса крыс, у которых с 16 дня беременности происходит уменьшение материнской части плаценты до 32 % со снижением капиллярной перфузии [2].

Установлен дозозависимый эмбриотоксический эффект ЛПИС. Введение беременным крысам ЛПИС в максимальной дозе (1950 ЕД/кг) влияет на скорость процессов оссификации (табл. 3). На 20 день беременности выявилось снижение числа точек окостенения плюсны, количества плодов со сформировавшимися костями черепа по сравнению с контрольными и фоновыми показателями. При уменьшении дозы до терапевтической количество точек оссификации в экспериментальной группе уже не отличалось от величины показателя в контрольной и фоновой

Таблица 3

Влияние ЛПИС на состояние процессов оссификации плодов, полученных от самок, которым вводили ЛПИС с 1 по 19 день беременности

Группа	Количество точек оссификации, <i>n</i>					Количество плодов со сформировавшимися костями черепа, %
	плюсна	пясть	крестец	грудина	ребра	
ЛПИС (195 ЕД/кг), <i>n</i> = 51	2,92 ± 0,06	2,49 ± 0,08	1,82 ± 0,15	1,90 ± 0,10	13,00 ± 0,00	90,20
ЛПИС (1950 ЕД/кг), <i>n</i> = 51	2,65 ± 0,12*#	2,25 ± 0,11	1,45 ± 0,17	1,53 ± 0,11	13,00 ± 0,00	72,55*#
Контроль, <i>n</i> = 56	3,00 ± 0,00	2,48 ± 0,07	1,93 ± 0,13	2,13 ± 0,09	13,00 ± 0,00	94,64
Исторический контроль, <i>n</i> = 263	2,93 ± 0,03	2,90 ± 0,02	1,30 ± 0,08	2,05 ± 0,07	13,00 ± 0,00	83,27

Таблица 4

Патологические изменения внутренних органов плодов, полученных от самок, которым вводили ЛПИС с 1 по 19 день беременности

Группа	Количество плодов в группе, <i>n</i>	Количество плодов с аномалиями, %					
		с обширными кровоизлияниями	с умеренными кровоизлияниями	с полнокровием сосудов печени	с холестаазом	с умеренными расширениями желудочков головного мозга	с гемоперикардом
ЛПИС (195 ЕД/кг), <i>n</i> = 6	66	7,58*#	35,15#	74,24*#	27,27*#	4,55#	12,12
ЛПИС (1950 ЕД/кг), <i>n</i> = 6	60	10,00*#	31,67#	48,33#	0,0	3,33#	21,67*#
Контроль, <i>n</i> = 6	58	1,72#	34,48#	39,66#	0,0	3,45#	10,34
Исторический контроль, <i>n</i> = 25	270	23,03	10,00	23,70	12,96	11,48	8,15

группах. Анализ данных осмотра внутренних органов плодов методом Вильсона (*n* = 184, из них 126 плодов экспериментальных групп) показал, что введение ЛПИС в максимальной дозе с 1 по 19 день беременности приводило к возрастанию числа плодов с гемоперикардом (по сравнению с контролем и фоном) с обширными кровоизлияниями (по сравнению с контролем) (табл. 4). При снижении дозы до терапевтической число кровоизлияний не повышается. Совершенно очевидно, что ЛПИС обладает уникальной способностью к фетоплацентарному транспорту и проявляет свои фибринолитические свойства в крови эмбрионов.

Таким образом, можно утверждать, что ЛПИС в терапевтической дозе является безопасным для репродуктивного здоровья женщины. Одна-

ко установленный факт дозозависимой эмбриотоксичности 10-кратной терапевтической дозы (1950 ЕД/кг) безусловно настораживает. С позиции клинициста можно рассматривать безопасный вариант применения ЛПИС в повышенной дозе только в случае продолжения гормональной контрацепции или использования барьерных методов, исключающих беременность. Можно позволить себе рассуждать о некоей безопасной промежуточной дозе, но фактологический материал проведенного исследования исключает подобного рода допущения. Возможно, компании-производителю ЛПИС следует провести дополнительные доклинические исследования для установления предельно безопасной терапевтической дозы для репродуктивной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мадонов П.Г., Кинит Д.Н., Ершов К.И. и др. Опыт клинического применения нового лекарственного препарата Тромбовазим в сосудистой хирургии // Ангиол. и сосуд. хирургия. 2015. 21. (1). 99–104.
2. Мацюк Я.Р., Барабан О.В. Структура плаценты крыс в разные сроки нормально протекающей беременности // Журн. Гродненск. гос. мед. ун-та. 2012. (1). 54–58.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Ред. Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев, О.Л. Верстакова и др. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
4. Integration of Study Results to Assess Concerns about Human Reproductive and Developmental Toxicities. 2001. <https://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/992079gd.pdf>.

EXPERIMENTAL STUDY OF IMMOBILIZED SUBTILYZINES INFLUENCE ON REPRODUCTIVE TOXICITY. I. ANTENATAL PERIOD

Tatyana Annovna EMEDOVA, Svetlana Vladimirovna MISHENINA, Pavel Gennad'evich MADONOV, Tatyana Gennad'evna BOROVSKEYA², Anna Vladimirovna VYCHUZHANINA², Valeriya Aleksandrovna MASHANOVA²

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

² Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine
634028, Tomsk, Lenin av., 3

The study of the possible embryotoxic properties of immobilized subtilisins realized in the antenatal period showed that its administration to female rats at a dose of 195 U / kg throughout the pregnancy period did not reveal toxic effects. At a dose of 1950 U / kg, the death of embryos after implantation increased, and the number of external hemorrhages, pathological changes in internal organs, and inhibition of ossification increased in living embryos.

Key words: immobilized subtilisins, reproductive toxicity, antenatal period.

Emedova T.A. – post-graduate student of the department of obstetrics and gynecology

Mishenina S.V. – candidate of medical sciences, associated professor of the department of pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor, head of department of for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: madonov@scpb.ru

Borovskaya T.G. – doctor of biological science, professor, head of laboratory of pharmacology of genital system, e-mail: repropharm@yandex.ru

Vychuzhanina A.V. – candidate of biological science, senior research associate of laboratory of pharmacology of genital system

Mashanova V.A. – junior researcher of laboratory of pharmacology of genital system