

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «АОС» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТЕОПОРОЗА

Миронов А. А.¹, Мамина Н. Ш.², Воронин С. Е.¹, Байрамов А. А.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Миронов Андрей Александрович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: mironov_aa@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 25.10.2023
и принята к печати 28.11.2023.

Резюме

Актуальность. Остеопороз — одно из наиболее распространенных заболеваний, которое наряду с инфарктом миокарда, инсультом, раком и внезапной смертью занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности населения. Женщины в постменопаузальный период наиболее уязвимы и примерно в 4 раза чаще подвержены заболеванию по сравнению с мужчинами (80 % из всех пациентов), а переломы, связанные с остеопорозом, являются причинами значительного увеличения заболеваемости, инвалидности и смертности, особенно у пожилых людей. **Цель.** Изучить острую токсичность нового отечественного лекарственного препарата «Антиостеопорозное средство» (патент № 02–04–16643/15–0 от 26.02.2015) при однократном внутривенном введении половозрелым аутбредным крысам обоих полов. **Материалы и методы.** Исследование проведено на аутбредных крысах обоих полов согласно протоколу OECD 420, ГОСТ 32296–2013. О развитии токсического эффекта делали заключение на основании поведенческих тестов, клинических осмотров, изменений массы тела, по результатам патоморфологического исследования тканей органов и биохимическим показателям крови и мочи. **Результаты исследования.** По результатам исследования тестируемый препарат был отнесен по действующему веществу к 5 категории по классификации GHS (2000<ЛД₅₀ (в/ж)<5000 мг/кг). Оценка динамики массы тела экспериментальных животных показала, что однократное внутривенное введение тестируемого препарата не повлияло на данный показатель. Изучение индивидуального поведения в рамках основного исследования на 14-й день после однократного внутривенного введения тестируемого препарата показало, что однократное внутривенное введение тестируемого препарата в дозе 2000 мг/кг не оказало отсроченного влияния на общее состояние и ориентировочно-исследовательскую активность экспериментальных животных. Вскрытие и патоморфологическое исследование животных на 15-й день после однократного внутривенного введения тестируемого препарата не выявило наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с введением тестируемого препарата. Тестируемый препарат не оказал местнораздражающего действия на место введения — желудочно-кишечный тракт. Во всех тестах степень изменения показателей, вызванная тестируемым препаратом, была одинакова: статистически значимых различий в показателях регистрируемых параметров между экспериментальными животными и контрольной группой не отмечалось.

Ключевые слова: антиостеопорозное средство, безопасность, внутривенное введение, доклинические исследования, остеопороз, острая токсичность.

Для цитирования: Миронов А.А., Мамина Н.Ш., Воронин С.Е., Байрамов А.А. Изучение острой токсичности нового лекарственного препарата «АОС» для лечения остеопороза. Трансляционная медицина. 2023;10(5):363-375. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-5-363-375. EDN: GJSYF

STUDYING THE ACUTE TOXICITY OF A NEW DRUG “AOC” FOR THE TREATMENT OF OSTEOPOROSIS

Andrey A. Mironov¹, Nailya Sh. Mamina², Stepan Ye. Voronin¹,
Alekber A. Bayramov^{1,2}

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Andrey A. Mironov,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: mironov_aa@almazovcentre.ru

Received 25 October 2023; accepted
28 November 2023.

Abstract

Background. Osteoporosis is one of the most common diseases, which, along with myocardial infarction, stroke, cancer, and sudden death, occupies a leading place in the structure of morbidity and mortality of the population. Postmenopausal women are most vulnerable and are approximately 4 times more likely to be affected than men (80 % of all patients), and osteoporosis-related fractures are responsible for a significant increase in morbidity, disability, and mortality, especially in the elderly. **Objective.** To study the acute toxicity of the new drug “Antiosteoporosis drug” (patent No. 02-04-16643/15-0 dated February 26, 2015) with a single intragastric administration to mature outbred rats of both sexes. **Design and methods.** The study was conducted on outbred rats of both sexes according to protocol OECD 420, GOST 32296-2013. The development of a toxic effect was concluded based on behavioral tests, clinical examinations, changes in body weight, the results of pathomorphological examination of organ tissue and biochemical parameters of blood and urine. **Results.** According to the results of the study, the tested drug was classified according to the active substance into category 5 according to the GHS classification (2000<LD50 (i/g)<5000 mg/kg). An assessment of the dynamics of body weight in experimental animals showed that a single intragastric administration of the test drug had no effect on this indicator. The study of individual behavior as part of the main study on the 14th day after a single intragastric administration of the test drug showed that a single intragastric administration of the test drug at a dose of 2000 mg/kg did not have a delayed effect on the general condition and indicative research activity of experimental animals. Autopsy and pathological examination of animals on the 15th day after a single intragastric administration of the test drug did not reveal the presence of any residual effects associated with the administration of the test drug. The tested drug did not have a local irritant effect on the injection site — the gastrointestinal tract. In all tests, the degree of change in indicators caused by the test drug was the same: there were no statistically significant differences in the recorded parameters between the test drug and the control group.

Key words: acute toxicity, antiosteoporotic agent, intragastric administration, osteoporosis, preclinical studies, safety.

For citation: Mironov AA, Mamina NSh, Voronin SE, Bayramov AA. Study of acute toxicity of a new drug “AOS” for the treatment of osteoporosis. Translational medicine. 2023; 10(5):363-375. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-5-363-375. EDN: GJSYF

Список сокращений: МПК — минеральная плотность кости, ОП — остеопороз.

Введение

Разработанный новый отечественный лекарственный препарат «Антиостеопорозное средство» (ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, патент № 02–04–16643/15–0 от 26.02.2015 «Антиостеопорозное средство») — средство для лечения остеопороза, одного из наиболее распространенных заболеваний, которое наряду с инфарктом миокарда, инсультом, раком и внезапной смертью занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности населения. Переломы, связанные с остеопорозом, являются основной причиной нетрудоспособности и инвалидности, особенно у пожилых людей, что значительно увеличивает расходы на здравоохранение [1–6]. Женщины в постменопаузальный период наиболее уязвимы и примерно в 4 раза чаще подвержены заболеванию по сравнению с мужчинами (80 % из всех пациентов) [1, 2].

Остеопороз — это системное метаболическое заболевание скелета, характеризующееся снижением массы костей и нарушениями микроархитектоники костной ткани, которое приводит к значительному увеличению хрупкости костей и возможности их переломов [7, 8]. По данным International Osteoporosis Foundation (IOF) (2010 г.), ОП страдают около 75 млн человек в Европе, США и Японии [9, 10]. По прогнозам IOF, к 2050 году, в связи с увеличением продолжительности жизни во всем мире, количество случаев перелома костей тазобедренного сустава вследствие ОП вырастет на 240 % у женщин и на 310 % — у мужчин. Инвалидность вследствие ОП в странах Европы по частоте превышает таковую от рака (за исключением рака легких) и сравнима с инвалидностью от различных хронических неинфекционных заболеваний (ревматоидный артрит, астма и артериальная гипертензия) [3, 11, 12].

Согласно исследованиям НИИ ревматологии РАМН, в России ОП имеют 33,8 % женщин и 26,9 % мужчин старше 50 лет, у 43,3 % женщин и 44,1 % мужчин определяются признаки остеопении. Таким образом, ОП в России страдают 14 млн человек (10 % населения страны), у 20 млн состояние МПК соответствует остеопении, и 34 млн жителей страны имеют реальный риск остеопоротических переломов. Ожидается, что в связи с постарением населения число больных ОП в России вырастет на 1/3 к 2050 году [13]. Оценка мировой тенденции показала, что только за счет старения популяции земного шара частота переломов, на-

пример шейки бедра, в период с 2005 по 2050 годы должна увеличиться в два раза [6].

В последние десятилетия проблема ОП приобрела особое значение из-за увеличения в популяции людей пожилого и старческого возраста и, в частности, количества женщин в постменопаузальном периоде. Около одной трети общей продолжительности жизни женщин приходится на период постменопаузы, что увеличивает вероятность развития как переломов, так и сенильного остеопороза. В связи с ростом числа пожилых людей это заболевание становится медико-социальной проблемой [14, 15].

Недостаточную эффективность предложенных программ профилактики и лечения остеопороза можно объяснить более сложными механизмами его развития, чем простой дефицит кальция. Поэтому необходимо использовать для лечения и профилактики ОП такие методы, препараты, которые отвечают биологии возрастного развития и патофизиологии развития ОП. Существенным вкладом в решение проблемы остеопороза может стать создание препаратов на основе уникальных биологически активных соединений.

Новым подходом в профилактике и лечении сенильного и постменопаузального остеопороза, и дефицита витамина Д3 в частности, является применение в лекарственной терапии комплекса кислых солей янтарной кислоты, потенциально влияющего на усвоение макро- и микроэлементов костной тканью, на биотрансформацию витамина Д3 и повышающего биодоступность его активных форм в организме [4, 16–18]. Из природных субстратов-метаболитов кислые соли сукцината являются наиболее сильными модуляторами орфановых рецепторов, кальциевых каналов L-типа, активируют аккумуляции Ca^{2+} внутри клетки эндоплазматическим и саркоплазматическим ретикуломом и митохондриями, активируют лимитирующий этап в метаболизме холестерина — вход в митохондрий и последующую биотрансформацию в активные формы стероидов [17, 19–21]. В экспериментальном исследовании сукцинат-содержащий комплексный препарат повышал индекс массы костной ткани, увеличивал синтез эстрогенов и андрогенов в условиях гормонального дефицита [20, 21]. Ожидаемый результат от внедрения технологии — эффективная терапия в профилактике и лечении ОП, дефицита витамина Д3 и, соответственно, снижение количества опорно-двигательных, эндокринных и кардиоваскулярных заболеваний, уменьшение риска инвалидизации и преждевременной смерти [18, 19, 22–25].

Таблица 1. Летальные эффекты (пало/всего) препарата при внутрижелудочном введении крысам

Доза препарата, мг/кг /пол	Предварительное исследование	Основное исследование
	2000	2000
Соли янтарной кислоты, самцы	0/1	0/5
Соли янтарной кислоты, самки	0/1	0/5

С учетом данных об эффективности разработанного препарата, его применение будет способствовать сокращению числа переломов (в частности, шейки бедра у возрастной группы пожилых людей), процент которых на сегодня по отношению к суммарному количеству случаев перелома составляет 30 %, и снижению затрат, связанных с инвалидизацией и лечением, на 10–15 %, что имеет высокую социальную значимость.

Дизайн исследования

Формирование групп и введение препарата

Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп отбор животных осуществлялся при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Для этого необходимое количество животных, из числа переданных в эксперимент, случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел (программное обеспечение Statistica 10.0), получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен порядковый номер. Индивидуальная маркировка животных была осуществлена методом отметки на хвосте.

Перед введением была приготовлена навеска тестируемого препарата для приготовления суспензии в 1%-ном растворе крахмала в концентрации 100 мг/мл. Препараты были введены животным внутрижелудочно с помощью шприцев с атравматичным зондом однократно в указанной дозе. Объемы для введения рассчитывали на основании данных массы тела животных. Разовый объем введения не превысил допустимый для внутрижелудочного введения и составил 20 мл/кг (5 мл на крысу массой 250 г).

Предварительное исследование

Целью предварительного исследования являлось определение оптимальной стартовой дозы для основного исследования. На основании внутрилабораторного опыта работы со структурными аналогами тестируемого объекта предполагали наличие у него малой токсичности. Таким образом, начальная доза для предварительного исследования составила 2000 мг/кг. Тестируемый объект был введен в дозе 2000 мг/кг одному животному каждого пола.

Основное исследование

Тестируемый объект был введен однократно внутрижелудочно в дозе 2000 мг/кг пяти животным каждого пола. Период наблюдения составил 14 дней как для предварительного, так и для основного исследования. На протяжении этого времени осуществляли еженедельный клинический осмотр животных в клетке содержания, в руках и на открытой площадке, оценивали их общее состояние. На 1-й, 2-й, 7-й и 15-й дни эксперимента проводили взвешивание животных. Эвтаназию осуществляли на 15-й день после внутрижелудочного введения препарата с помощью CO₂-камеры.

Масса тела. Массу тела регистрировали непосредственно перед введением, на 2-й день, на 7-й день и непосредственно перед эвтаназией для расчета процентного отношения массы органов к массе тела.

Регистрация сроков развития интоксикации (клиническое наблюдение). При оценке острой токсичности животные находились под непрерывным наблюдением первые 30 минут после введения препарата, затем ежедневно в течение 4 часов, затем через 24 часа и далее ежедневно.

Клинический осмотр. Клинический осмотр животных проводили на 2-й, 7-й и 14-й дни. Выполняли подробный осмотр животного в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации.

Таблица 2. Влияние однократного внутрижелудочного введения тестируемого препарата на общее состояние и поведенческие реакции крыс через 24 часа после введения (количество животных с признаком/ количество животных в группе)

Показатель		Дозы препаратов, мг/кг					
		Предварительный этап			Основной этап		
		Соли янтарной кислоты		Контрольная группа		Соли янтарной кислоты	
		самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
		2000	2000	0	0	2000	2000
Количество животных		1	1	5	5	5	5
1		2	3	4	5	6	7
Осмотр в клетке							
Поведение	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	угнетение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	возбуждение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Отношение к другим животным	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	агрессия	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Осмотр при взятии животного в руки							
Реакция на раздражители	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	снижение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	повышение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Упитанность	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	истощение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ожирение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	снижение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	увеличение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Шерсть	норма (гладкая, блестящая)	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	взъерошенная	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	выпадение шерсти	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	тусклая	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	загрязненная	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	изменение цвета	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Кожные покровы	Тургор	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
		снижен	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Цвет	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
		покраснение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		бледность	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		синюшность	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		желтушность	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		кровоизлияния	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Целостность	норма (не нарушена)	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
		ссадины	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		трещины	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		раны	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Пальпируемые образования		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Слизистые оболочки	Цвет	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
		покраснение	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		бледность	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		синюшность	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		желтушность	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Нарушение целостности		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Глаза		норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
		экзофтальм (пучеглазие)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		нарушение целостности	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		выделения	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Носовая полость		норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
		серозные выделения	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		гнойные выделения	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		кровянистые выделения	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Ротовая полость		норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
		слюнотечение/ запах	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Осмотр на открытой площадке							
Положение тела в пространстве	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	вынужденное лежание	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	вынужденное блуждание по кругу	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	вынужденное движение вперед и назад	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	вынужденное стремление лежать на одном боку	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Нарушение координации движения	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	атаксия	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	гиперкинез	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Тип дыхания	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	грудной	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	брюшной	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	одышка	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Дефекация	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	диарея	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	наличие крови в кале	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	изменение цвета кала	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Моче-испускание	норма	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5
	изменение цвета	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Методы изучения поведенческих реакций. Целостность физиологической реакции крыс оценивали в тесте «Открытое поле» с учетом ориентировочно-исследовательского, эмоционального, стереотипного и двигательного компонентов по поведенческому атласу для грызунов.

Патоморфологические исследования. Патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое и микроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов. Осмотр места первичного контакта препарата с тканями организма позволил оценить местнораздражающее действие тестируемого препарата.

Результаты исследования

Токсикометрия. Клиническая картина интоксикации. Зависимые от доз летальные эффекты препарата на основе янтарной кислоты представлены в таблице 1.

Гибель животных и картина интоксикации отмечены не были. Таким образом, тестируемый препарат по действующему веществу был отнесен к 5 категории по классификации GHS (2000 <LD₅₀ (в/ж) < 5000 мг/кг).

Влияние исследуемого препарата на общее состояние и поведенческие реакции крыс. На 2-й, 7-й и 14-й дни после введения препарата, как в предварительном, так и в основном исследовании, при

Таблица 3. Локомоторная активность крыс в тесте «Открытое поле» в основном эксперименте на 14-й день после однократного внутрижелудочного введения препарата на основе солей янтарной кислоты ($M \pm m$, $n=10$)

Группы	Доза, мг/кг	Количество		
		посещенных квадратов	пристеночных стоек	свободных стоек
Контрольная группа	0	39,5 $\pm$ 4,2	9,3 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 0,5
Соли янтарной кислоты	2000	34,5 $\pm$ 4,0	8,8 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,4

Таблица 4. Результаты статистической обработки данных по локомоторной активности крыс в тесте «Открытое поле» после однократного введения препарата на основе солей янтарной кислоты (ANOVA)

Показатель	Значение F-критерия	Значение p
Количество посещенных квадратов	$F_{1,18}=0,73$	0,40
Количество пристеночных стоек	$F_{1,18}=0,15$	0,71
Количество свободных стоек	$F_{1,18}=0,20$	0,66

Таблица 5. Локомоторная активность крыс в тесте «Открытое поле» в основном эксперименте на 14-й день после однократного введения препарата на основе солей янтарной кислоты ($Me(Q1;Q3)$, $n=10$)

Группы	Доза, мг/кг	Количество			
		центровых посещений	груминга	уринаций	дефекаций
Контрольная группа	0	1,5(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	1,0(1,0;1,0)	1,0(0,0;1,0)
Соли янтарной кислоты	2000	1,5(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	1,0(0,0;1,0)

проведении клинических осмотров экспериментальные животные по всем определяемым показателям не отличались от нормы. Результаты первого клинического осмотра (через 24 часа после введения) представлены в таблице 2. Результаты клинических осмотров на 7-й и 14-й дни были аналогичны первому.

Данные осмотра описывают изменения в общем состоянии и поведении животных через 24 часа после введения препарата. Внешний вид и поведение животных экспериментальных групп не отличались в группах, получивших тестируемый препарат и контрольное вещество. Отношение к другим животным было стандартным, без признаков агрессии. Реакция на взятие в руки была стандартно низкой во всех группах. Ориен-

тировочно-исследовательскую активность крыс изучали в конце периода наблюдения для регистрации отсроченного влияния однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата на поведение.

Поскольку никаких половых различий в ориентировочно-исследовательской активности крыс не наблюдали, данные по поведенческим реакциям животных приведены без разделения по полу.

При тестировании в установке «Открытое поле» животные через 14 дней после однократного введения тестируемого препарата демонстрировали преимущественно уравновешенный тип поведения, с умеренной локомоторной и поисковой активностью без проявления признаков тревожности. Результаты приведены в таблицах 3–6.

Таблица 6. Результаты статистической обработки данных по локомоторной активности крыс в тесте «Открытое поле» после однократного введения препарата на основе солей янтарной кислоты (критерий Краскела–Уоллиса)

Показатель	Значение Н-критерия (1, N = 20)	Значение p
Количество центровых посещений	<0,001	0,99
Количество груминга	0,11	0,74
Количество мочеиспусканий	0,11	0,74
Количество дефекаций	0,15	0,70

Таблица 7. Влияние однократного внутрижелудочного введения препарата на основе солей янтарной кислоты на массу тела крыс-самцов

Группа	Доза, мг/кг	День после введения			
		1-й	2-й	7-й	15-й
Предварительное исследование (n=1)					
Соли янтарной кислоты	2000	197	192	206	221
Основное исследование (M±m, n=5)					
Контрольная группа	0	211,0±5,9	211,2±5,9	222,0±6,3	234,0±5,8
Соли янтарной кислоты	2000	214,6±5,4	213,2±5,0	226,2±5,3	236,6±6,0

Таблица 8. Влияние однократного внутрижелудочного введения препарата на основе солей янтарной кислоты на массу тела крыс-самок

Группа	Доза, мг/кг	День после введения			
		1-й	2-й	7-й	15-й
Предварительное исследование (n=1)					
Соли янтарной кислоты	2000	200	206	210	225
Основное исследование (M±m, n=5)					
Контрольная группа	0	209,0±4,7	208,4±4,8	218,2±5,8	230,6±5,9
Соли янтарной кислоты	2000	206,6±5,3	206,4±4,7	214,8±4,8	223,8±5,2

Данные имели нормальное распределение. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил влияние фактора «Группа» на определяемые показатели ($p > 0,05$, табл. 4).

Данные не имели нормального распределения. После однократного внутрижелудочного введения препарата не было отмечено влияния факто-

ра «Группа» на исследуемые показатели ($p > 0,05$, табл. 6).

Таким образом, однократное внутрижелудочное введение тестируемого препарата не оказало отсроченного влияния на индивидуальное поведение экспериментальных животных, полученные данные не отличались от нормы.

Таблица 9. Результаты статистической обработки данных по массе тела экспериментальных животных в основном исследовании (ANOVA с повторными измерениями)

Самцы		Самки	
F	p	F	p
$F_{3,24} = 0,54$	0,66	$F_{3,24} = 0,79$	0,51

Влияние исследуемого препарата на динамику массы тела экспериментальных животных. Влияние препарата на основе солей янтарной кислоты на массу тела экспериментальных животных представлено в таблицах 7–9.

Данные имели нормальное распределение. После однократного внутрижелудочного введения препарата не было отмечено влияния введения препарата на массу тела экспериментальных животных ($p > 0,05$, табл. 9).

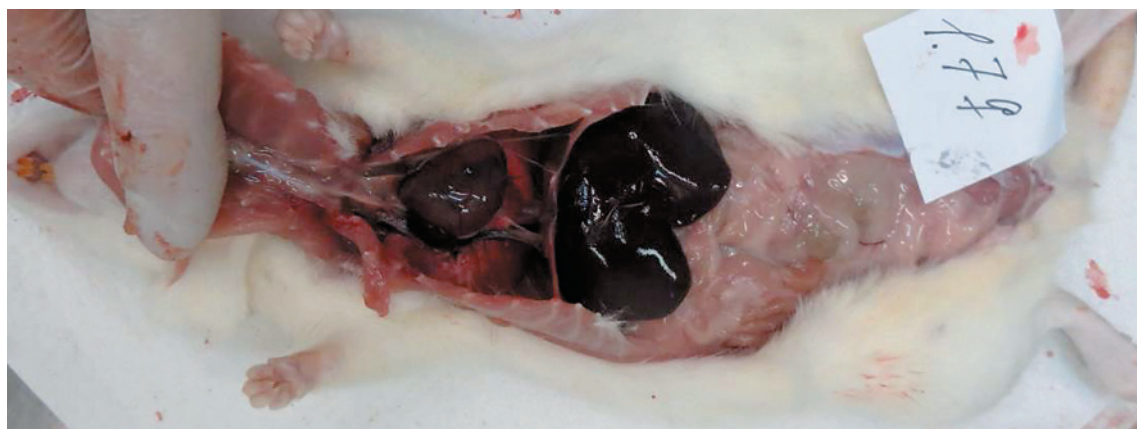
Таким образом, было показано, что однократное внутрижелудочное введение тестируемого препарата не повлияло на динамику массы тела экспериментальных животных, полученные данные не отличались от нормы.

Данные макроскопии. Макроскопическая картина была аналогичной у всех экспериментальных животных (в соответствии с рис. 1 и 2), выглядела следующим образом.

Трупы крыс с нормостеническим телосложением. Шерсть блестящая, сухая, чистая. Естественные отверстия без особенностей. Видимые слизистые бледные, местами синюшные, блестящие, равномерного кровенаполнения. Кожные покровы бледные, сухие, местами с цианотичным оттенком. Брюшина, плевра, перикард — гладкие, блестящие. В брюшной полости, полости перикарда, плевральных полостях — свободной жидкости нет.

Сердце плотное, не увеличено. Под эпикардом — умеренное количество желтой жировой клетчатки. Полости умеренно расширены, содержали темно-красную, жидкую кровь. Клапаны сердца, крупных сосудов и пристеночный эндокард не изменены, гладкие, блестящие. Миокард на разрезе коричневатый, волокнистый, неравномерного кровенаполнения. В просвете аорты, легочной артерии, полых венах жидкая кровь. Подчелюстные лимфатические узлы имели округлую форму, бледно-розовую окраску и умеренную плотность. Слюнные железы округлой формы, бледно-желтого цвета, умеренной плотности.

Щитовидная железа мягко-эластичная, на разрезе коричневая, зернистая, однородная. Тимус имел треугольную форму, беловатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Слизистая гортани, трахеи, бронхов гладкая, блестящая, серо-розовая, в просвете содержимого нет. Легкие тестоватые, воздушные, с геморрагиями, выраженными в различной степени. Надпочечники овальной формы, корковый слой желтый, мозговой — коричневый. Почки плотные. Капсула гладкая, блестящая, снималась легко, обнажая гладкую поверхность. Вокруг незначительно расширенной чашечно-лоханочной системы умеренное разрастание жировой клетчатки. Слизистая лоханок, мочеточников, мочевого пузыря молочно-белого цвета, гладкая, бле-

**Рис. 1. Животное № 1.7 контрольной группы**

стящая. Яичники/семенники — не изменены, поверхность органов блестящая. Язык серо-розовый, с выраженными сосочками. Слизистая пищевода продольно-складчатая, блестящая, серо-розовая. Слизистая желудка бледно-розового цвета, складчатая, содержимое желудка было представлено небольшим количеством слизи и химуса. Слизистая кишечника складчатая, серо-розового цвета, содержимое соответствовало отделам. Печень плотная, поверхность гладкая, блестящая, обычного кровенаполнения. На разрезе ткань полнокровная, коричневого цвета с четким рисунком долек. Поджелудочная железа плотная, не увеличена, дольчатость выражена. Селезенка не увеличена, плотная, капсула гладкая, блестящая. На разрезе ткань темно-вишневая, однородная, без соскоба пульпы. Головной мозг — форму сохранял, извилины сглажены, борозды уплощены, мозговые оболочки сероватого цвета, умеренно отечны, ткань мозга умеренно отечна, на разрезе сохранено правильное распределение серого и белого вещества, сосуды мозжечка умеренно полнокровны. Заключение: при вскрытии животных, подвергшихся плановой эвтаназии, наблюдали признаки быстро наступившей смерти.

Массовые коэффициенты органов были в пределах физиологической нормы. Данные имели нормальное распределение. ANOVA не выявил влияния исследуемых препаратов на массовые коэффициенты внутренних органов экспериментальных крыс-самцов и крыс-самок ($p > 0,05$).

Таким образом, было показано, что однократное внутрижелудочное введение тестируемого препарата экспериментальным животным обоего пола в дозе 2000 мг/кг не привело к изменениям макроскопической картины и массовых коэффициентов внутренних органов.

Оценка местнораздражающего действия. При проведении плановой некропии экспериментальных животных спустя 14 дней после однократного внутрижелудочного введения препарата, как в предварительном, так и в основном этапе эксперимента, признаков местнораздражающего действия на ЖКТ (гиперемия, отечность, эрозивные изменения, язвенные дефекты слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкой и толстой кишки) отмечено не было. Желудок имел обычную форму и размеры. Слизистая тела желудка была бледно-розовой, блестящей, складчатой. Слизистая тонкой и толстой кишки была блестящей, гладкой.

Выводы

Проведенное экспериментальное исследование острой токсичности препарата на основе солей янтарной кислоты для лечения остеопороза «АОС» на аутбредных крысах при внутрижелудочном пути введения в фиксированной дозе (на основании OECD 420) показало, что препарат в условиях однократного внутрижелудочного введения в дозе 2000 мг/кг не оказал токсического действия на организм лабораторных животных.

Во всех тестах степень изменения показателей, вызванная тестируемым препаратом, была одинакова: статистически значимых различий в показателях регистрируемых параметров между экспериментальной группой и группой контроля не отмечали.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

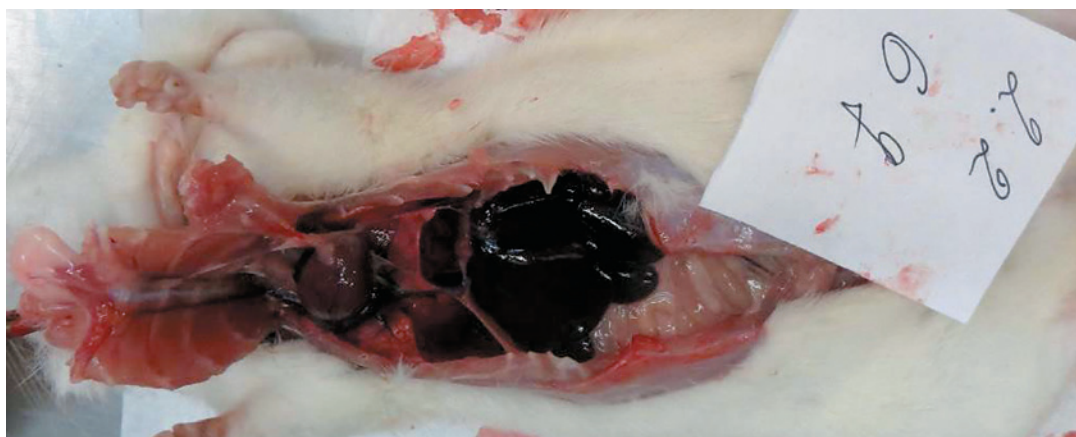


Рис. 2. Животное 2.2.6, получившее тестируемый препарат на основе солей янтарной кислоты в дозе 2000 мг/кг в ходе основного исследования

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках соглашения о предоставлении субсидии из бюджета Санкт-Петербурга на возмещение расходов (неполученных доходов) в связи с производством (реализацией) товаров № 258-23 от 19.12.2023. / The work was carried out under the agreement for providing a subsidy from the Saint Petersburg budget to compensate for expenses (lost income) related to the production (sale) of goods, No. 258-23 dated 19.12.2023.

Список литературы / References

1. Kanis JA. World Health Organization Scientific Group. Assessment of Osteoporosis at the Primary Health-Care Level Technical Report Sheffield. UK: WHO Collaborating Centre, University of Sheffield; 2008.
2. National Osteoporosis Foundation 2004. Disease statistics.
3. National Osteoporosis Foundation. Advocacy News & Updates. American's
4. Bolland MJ, Grey AB, Gamble GD, Reid IR. Effect of osteoporosis treatment on mortality: a meta-analysis // J Clin Endocrinol Metab. 2010. No. 95. P.1174–1181.
5. MacLean C, Newberry S, Maglione M, et al. Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis // Ann Intern Med. 2007. No 148. P.197–213.
6. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, et al. Risk of mortality following clinical fractures // Osteoporosis Int. 2000. No. 11. P. 556–561.
7. Gynecology. National Guide. Edited by V. I. Kulakov, G. M. Savelieva, I. B. Manukhin. Moscow: GEOTAR-MED, 2009. 670 p. In Russian [Гинекология. Национальное руководство / Под ред. В. И. Кулакова, Г. М. Савельевой, И. Б. Манухина. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2009. 670 с.].
8. Riggs BL, Melton D. Osteoporosis. Etiology, Diagnosis, Treatment. Binom Publishers, Ltd., Moscow, 2000; pp. 309–313. In Russian [Риггз Б.Л., Мелтон Д. Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение. М.: ЗАО «Издательство Бином». 2000. С. 309–313].
9. International Osteoporosis Foundation. 2010.
10. EFO and NOF. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? // Osteoporosis Int. 1997. No. 7. P. 1–32.
11. Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: 2010 Position Statement of The North American Menopause Society // Menopause. 2010. Vol. 17. No 1. P. 25–54.
12. Poshivalov VP. Pharmacotoxicology: a collection of articles. / A.V. Waldman Institute of Pharmacology, I. P. Pavlov St. Petersburg State Medical University; compiled by Prof. E. E. Zvartau. St. Petersburg: "Copy-Service", 1997. 104 p. In Russian [Пошивалов В.П. Фармакотоксология: сборник статей // Ин-т фармакологии им. А. В. Вальдмана ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова / Сост. проф. Э. Э. Звартау. СПб: "Copy-Service", 1997. 104 с.].
13. Lesnyak OM. Audit of the state of the osteoporosis problem in the Russian Federation // Preventive Medicine. 2011. No. 2. P. 7–10. In Russian [Лесняк О.М. Аудит состояния проблемы остеопороза в Российской Федерации // Профилактическая медицина. 2011. № 2. С. 7–10].
14. Kettle VM, Ark RA. Pathophysiology of the Endocrine System. Translation from English. Moscow: Binom, 2010. 335 p. In Russian [Кеттл В.М., Арки Р.А. Патолофизиология эндокринной системы. Пер. с англ. М.: Бином. 2010. 335 с.].
15. Povoroznyuk VV, Grigoryeva NV. Menopause and Osteoporosis. Kyiv: Zdorovye, 2004. 356 p. In Russian [Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. Менопауза и остеопороз. Киев: Здоровье. 2004. 356 с.].
16. Mitochondrial Processes in the Temporal Organization of Life. Collection. Edited by M. N. Kondrashova, V. V. Dymnik, Yu. G. Kaminsky, et al. Pushchino, 1978. 182 p. In Russian [Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности: сборник / Под ред. М. Н. Кондрашовой, В. В. Дыньника, Ю. Г. Каминского и др. Пушино, 1978. 182 с.].
17. Mitochondria in Pathology. Collection. Edited by M. N. Kondrashova, Yu. G. Kaminsky, E. I. Maevsky, E. V. Grishin. Pushchino, 2001. 258 p. In Russian [Митохондрии в патологии: сборник / Под ред. М. Н. Кондрашовой, Ю. Г. Каминского, Е. И. Маевского, Е. В. Гришина. Пушино, 2001. 258 с.].
18. Maevsky EI, Grishina EV, Khaustova YV, et al. Once again on drugs containing succinate // Gastroenterology of St. Petersburg. 2017. No. 1. P. 91–92. In Russian [Маевский Е.И., Гришина Е.В., Хаустова Я.В. и др. Вновь о препаратах, содержащих сукцинат // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2017. № 1. С. 91–92].
19. Maevsky EI, Roschenfeld AS, Grishina EV, Kondrashova MN. Correction of Metabolic Acidosis by Maintaining Mitochondrial Functions (monograph). Pushchino, ITEB RAS, 2001. 155 p. In Russian [Маевский Е.И., Рощенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий: монография. Пушино, ИТЭБ РАН, 2001. 155 с.].
20. Maevsky EI, Uchitel ML, Bayramov AA, et al. Correction of Hormonal Activity with Substrate Compositions in Men and Women // Gastroenterology of St. Petersburg. 2019. No. 2–3. P. 55–56. In Russian [Маевский Е.И., Учитель М.Л., Байрамов А.А. и др. Коррекция гормональной активности субстратными композициями у мужчин и женщин // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2019. № 2–3. С. 55–56].

21. Handbook. Physiological, Biochemical, and Biometric Norms for Experimental Animals Edited by V. G. Makarov, M. N. Makarova. St. Petersburg: LLC «Publisher LEMA». 2013. 116 p. In Russian [Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Под ред. В. Г. Макарова, М. Н. Макаровой. СПб: ООО «Издательство «ЛЕМА». 2013. 116 с.].

22. Zamaraeva TV. Method for determining the content of collagen proteins based on hydroxyproline // Modern Methods in Biochemistry. Moscow: Meditsina, 1977. P. 262–264. In Russian [Замараева Т.В. Метод определения содержания коллагеновых белков по оксипролину // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 262–264].

23. Kotelnikov GP, Bulgakov SV. Osteoporosis. Moscow: GEOTAR-Mediz, 2010. 504 p. In Russian [Котельников Г.П., Булгаков С.В. Остеопороз. М. ГЕОТАР-Медиз. 2010. 504 с.].

24. Kronenberg GM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. Endocrinology by Williams Textbook. Reproductive Endocrinology. Translation from English. Moscow: Reed Elsevier, 2011. 410 p. In Russian [Кроненберг Г.М., Мелмед Ш., Полонски К.С., Ларсен П.Р. Эндокринология по Вильямсону. Репродуктивная эндокринология. Пер с англ. М.: Рид Элсивер. 2011. 410 с.].

25. Hodgkin S. Mayo Clinic on Osteoporosis. Translation from English. Moscow: Astrel, 2007. 237 p. In Russian [Ходжкин С. Клиника Мэйо об Остеопорозе. Пер. с англ. М.: Астрель. 2007. 237 с.].

Информация об авторах:

Миронов Андрей Александрович, руководитель группы, ведущий специалист Группы сопровождения доклинических исследований Комплекса ЦДТИ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мамина Наиля Шамилевна, аспирант отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова ФГБНУ «ИЭМ»;

Воронин Степан Евгеньевич, заведующий виварием крупных животных с операционным блоком Испытательного центра Комплекса ЦДТИ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Байрамов Алекбер Азизович, д.м.н., ведущий научный сотрудник Института эндокринологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ».

Authors' Information:

Andrey A. Mironov, Head of the Preclinical Research Support Group, Center for Drug Testing and Investigation Complex, Almazov National Medical Research Centre;

Nailya Sh. Mamina, Ph.D. student at the Department of Neuropharmacology named after S. V. Anichkov, Institute of Experimental Medicine;

Stepan Ye. Voronin, Head of the Vivarium of Large Animals with an Operating Unit, Testing Center, Center for Drug Testing and Investigation Complex, Almazov National Medical Research Centre;

Alekber A. Bayramov, D.M.Sc., Senior Researcher at the Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research Centre, Senior Researcher at the Department of Neuropharmacology of the acad. S. V. Anichkov, Institute of Experimental Medicine.