

УДК 615.076.9:616.24-002.5:615.281
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-191-204>



Оригинальная статья | Original article



Изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия нового противотуберкулезного препарата тиозонид у беременных кроликов

А.Ю. Бородина^{1,✉}, К.Л. Крышень¹, А.Ю. Савченко², М.Н. Макарова¹, В.Г. Макаров¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», ул. Заводская, д. 3, к. 245, Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», пос. Светлые Горы, влд. 1, Красногорский р-н, Московская обл., 143442, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Бородина Антонина Юрьевна borodina.ay@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

Для лечения туберкулеза используют различные схемы лечения с применением противотуберкулезных препаратов. Разработано новое оригинальное противомикробное средство тиозонид, оказывающее бактериостатическое действие на штаммы *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, CN-37, CN-40 и MS-115.

Цель работы: изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия препарата тиозонид у беременных кроликов.

Материалы и методы: исследование проведено на 66 беременных самках кроликов (4 группы по 16–17 животных). Тиозонид вводили кроликам перорально с 6 по 19 сут беременности в дозах 20,6 мг/кг (терапевтическая доза, ТД), 103 мг/кг (5 ТД), 206 мг/кг (10 ТД). В качестве контрольного вещества использовали 1% раствор крахмала. После проведения плановой эвтаназии у беременных самок оценивали макроскопически органы репродуктивной системы, проводили гистологическое исследование плаценты. Живые плоды осматривали на наличие аномалий развития, определяли развитие скелета по модифицированной методике Доусона и проводили гистологическое исследование внутренних органов.

Результаты: у беременных самок на фоне применения тиозонида во всех исследуемых дозах признаков интоксикации не выявлено, гибель животных отсутствовала. Результаты макроскопического и гистологического исследований свидетельствовали об отсутствии патологических изменений репродуктивных органов самок. При оценке показателей эмбриотоксического и фетотоксического действия отличий между плодами в группах животных, получавших препарат в различных дозах, и в контрольной группе не выявлено. Аномалий развития у плодов не зарегистрировано. При исследовании развития скелета и состояния внутренних органов плодов отличий от нормы и межгрупповых отличий не обнаружено. У одной беременной самки, получавшей тиозонид в дозе 206 мг/кг, была обнаружена гибель всех плодов с поздней резорбцией. С учетом данного факта дозой, не оказывающей видимых побочных эффектов (NOAEL), целесообразно считать 103 мг/кг (5 ТД).

Выводы: препарат тиозонид не оказывает эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия.

Ключевые слова: туберкулез; тиозонид; противотуберкулезный препарат; кролики; беременность; эмбриотоксичность; фетотоксичность, тератогенность

Для цитирования: Бородина А.Ю., Крышень К.Л., Савченко А.Ю., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия нового противотуберкулезного препарата тиозонид у беременных кроликов. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):191–204. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-191-204>

A Study of Embryotoxic, Foetotoxic, and Teratogenic Effects of the Original Antituberculosis Agent Thiozonide in Pregnant Rabbits

A.Yu. Borodina^{1,✉}, K.L. Kryshen¹, A.Yu. Savchenko², M.N. Makarova¹, V.G. Makarov¹

¹ Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district,
Leningrad region 188663, Russian Federation

² Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia,
1 Svetlye Gory settlement, Krasnogorsk district, Moscow region 143442, Russian Federation

✉ Corresponding author: Antonina Yu. Borodina borodina.ay@doclinika.ru

ABSTRACT

Several treatment regimens with antituberculosis medicinal products are available for tuberculosis. Thiozonide is a newly developed original antimicrobial agent that exhibits bacteriostatic activity against *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv, CN-37, CN-40, and MS-115.

The aim of the study was to investigate the embryotoxic, foetotoxic, and teratogenic effects of thiozonide in pregnant rabbits.

Materials and methods. The study involved 66 pregnant rabbits (4 groups of 16–17 animals each). The rabbits received oral thiozonide from day 6 to day 19 of gestation at doses of 20.6 mg/kg (1 TD (therapeutic dose)), 103 mg/kg (5 TDs), and 206 mg/kg (10 TDs). The control group received a 1% starch solution. The authors conducted a macroscopic examination of the reproductive organs and a histological evaluation of the placenta in euthanised pregnant rabbits. Live foetuses underwent a check for developmental abnormalities, a skeletal development evaluation with a modified Dawson's method, and a histologic examination of the internal organs.

Results. The study showed no clinical signs of toxicity and no mortality associated with thiozonide in pregnant rabbits across all dose groups. Macroscopic and histological examinations revealed no pathological changes in the reproductive organs of pregnant rabbits. The evaluation of embryotoxic and foetotoxic effects did not identify any differences between the foetuses of the animals assigned to different doses of thiozonide and the control group. The authors found no developmental abnormalities in the foetuses. Examinations of foetal skeleton development and internal organ condition identified no differences between the groups and no abnormalities. The authors registered the death of all foetuses (late resorption) in one rabbit from the 206 mg/kg group. Therefore, the 103 mg/kg dose (5 TDs) was selected as a reasonable No Observed Adverse Effect Level (NOAEL).

Conclusions. Thiozonide has no embryotoxic, foetotoxic, or teratogenic effects.

Key words: tuberculosis; thiozonide; antituberculosis medicinal product; rabbits; pregnancy; embryotoxicity; foetotoxicity; teratogenicity

For citation: Borodina A.Yu., Kryshen K.L., Savchenko A.Yu., Makarova M.N., Makarov V.G. A study of embryotoxic, foetotoxic, and teratogenic effects of the original antituberculosis agent thiozonide in pregnant rabbits. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):191–204. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-191-204>

Введение

Туберкулез (ТБ) занимает второе место по смертности в мире среди инфекционных заболеваний. С 2020 г. смертность от туберкулеза начала расти впервые за долгое время¹. С 2020 по 2021 г. увеличилось число случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ)². Однако, по данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, к концу 2019 г. смертность от ТБ снизилась до национального минимума (5,1%), в то время как в Советском Союзе этот показатель составлял 7,7%³. Ожидается дальнейшее снижение смертности от ТБ при выполнении условия преждевременного выявления случаев заболевания [1]. Тем не менее Россия находится в первой тройке стран с ростом числа больных с МЛУ-ТБ⁴.

Проблема формирования МЛУ-ТБ, остро стоящая во всем мире, обусловлена длительностью лечения ТБ (до двух лет), высокой стоимостью лекарственных препаратов, низкой переносимостью противотуберкулезных препаратов резервного ряда, а также необходимостью проведения интенсивной химиотерапии [2]. Поэтому разработка, исследования и внедрение новых противотуберкулезных препаратов с высокой активностью и низкой токсичностью остается актуальной задачей. Перспективным кандидатом для лечения ТБ является оригинальный препарат тиозонид (АО «Фарм-Синтез», Россия) химическое название {{1R,2S + 1S,2R}-1-(6-бром-2-хлор-хинолил-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(нафталин-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол), синтетическое противомикробное средство для перорального применения [3]. Оказывает бактериостатическое действие на чувствительные штаммы *Mycobacterium tuberculosis* типа H37Rv и на штаммы CN-37, CN-40 и MS-115, резистентные к препаратам первой линии [4]. Предполагается, что под воздействием тиозонида блокируется специфический бактериальный фермент, отвечающий за синтез АТФ в клетке *M. tuberculosis* [5].

Особое внимание на этапе доклинических и клинических исследований уделяется влиянию исследуемого препарата на организм

беременных и плода. Многие антибактериальные препараты, применяемые в том числе для лечения туберкулеза, могут оказывать тератогенное действие. Их применение у беременных в клинической практике ограничено или запрещено [6]. Лекарственные препараты в зависимости от их тератогенных свойств ранее подразделялись на категории в соответствии с правилами маркировки препаратов, отпускаемых по рецепту, установленных Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA)⁵:

- категория А – отсутствие риска в исследованиях на людях, исследования не показали риска для плода в первом триместре беременности и в более поздних триместрах;
- категория В – исследования на животных не показали риска для плода, адекватных исследований у беременных женщин нет;
- категория С – исследования на животных показали негативное воздействие на плод, хорошо контролируемых исследований на людях нет, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин;
- категория D – имеются риски для плода человека, основанные на данных исследований на людях, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин;
- категория X – противопоказан при беременности, исследования на животных и людях продемонстрировали аномалии плода.

В 2014 г. вступили в силу новые рекомендации FDA по маркировке лекарственных средств, упраздняющие буквенную систему классификации оценки потенциального риска для беременных и кормящих женщин⁶. Тем не менее представленная классификация удобна для сравнительной оценки рисков клинического применения отдельных лекарственных средств.

В *таблице 1* представлены примеры принадлежности ряда антибиотиков к перечисленным категориям [6].

Проявление тератогенных эффектов может быть различным. Например, в исследовании

¹ Всемирный день борьбы с туберкулезом 2022 г. <https://www.who.int/ru/campaigns/world-tb-day/2022>

² Туберкулез. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>

³ Туберкулез. <https://zdrav.expert/index.php/Статья:Туберкулез>

⁴ Там же.

⁵ Labeling and prescription drug advertising: content and format for labeling for human prescription drugs. FDA; 1979.

⁶ Content and Format of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products; Requirements for Pregnancy and Lactation Labeling. FDA-2006-N-0515 (formerly Docket No. 2006N-0467). FDA; 2014.

Таблица 1. Категории антибактериальных препаратов в зависимости от тератогенных свойств (адаптировано из [6])

Table 1. Categories of antibacterial medicinal products according to teratogenic properties (adapted from [6])

Название группы препаратов или препарата <i>Antibacterial medicinal products (group of products)</i>	Категория в зависимости от тератогенных свойств* <i>Category according to teratogenic properties*</i>
Аминогликозиды / <i>Aminoglycosides</i>	D
Бедаквилин / <i>Bedaquiline</i>	B
Изониазид / <i>Isoniazid</i>	C
Клиндамицин / <i>Clindamycin</i>	B
Пиразинамид / <i>Pyrazinamide</i>	C
Рифампицин / <i>Rifampicin</i>	C
Тетрациклины / <i>Tetracyclines</i>	D
Тигециклин / <i>Tigecycline</i>	D
Цефалоспорины / <i>Cephalosporins</i>	B
Этамбутол / <i>Ethambutol</i>	B

Примечание. В – исследования на животных не показали риска для плода, адекватных исследований у беременных женщин нет; С – исследования на животных показали негативное воздействие на плод, хорошо контролируемых исследований на людях нет, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин; D – имеются риски для плода человека, основанные на данных исследований на людях, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин.

* В соответствии с классификацией Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration)⁷.

Note. B: animal reproduction studies have failed to demonstrate a risk to the foetus, and there are no adequate and well-controlled studies in pregnant women. C: animal reproduction studies have shown an adverse effect on the foetus, and there are no adequate and well-controlled studies in humans, but potential benefits may warrant use of the medicinal product in pregnant women despite potential risks. D: there is positive evidence of human foetal risk based on adverse reaction data from investigational or marketing experience or studies in humans, but potential benefits may warrant use of the medicinal product in pregnant women.

* According to the Food and Drug Administration classification⁷.

J.S. Steen и соавт. [7] введение рифампицина крысам и мышам в период с 1 по 12 сут беременности в дозе, в 15 раз превышающей дозу для человека, приводило к анэнцефалии, расщеплению позвоночника и неба, тогда как у кроликов доза, в 20 раз превышающая дозу для человека, которую вводили с 6 по 15 сут беременности, не повлияла на развитие плода. Описана связь между применением рифампицина в период беременности и кровотечением у новорожденных [8]. Препараты группы тетрациклинов проникают через гематоплацентарный барьер и при использовании матерью в третьем триместре беременности могут вызывать необратимые изменения цвета костей и зубов у ребенка. Препараты группы аминогликозидов при применении во время беременности могут вызывать необратимую двустороннюю врожденную глухоту у ребенка [6, 9].

⁷ Labeling and prescription drug advertising: content and format for labeling for human prescription drugs. FDA; 1979.

⁸ ICH S5 (R3) Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2020.

Вышеперечисленные примеры подчеркивают важность и необходимость исследования новых противотуберкулезных средств на предмет их тератогенного действия. Исследования эмбрио- и фетотоксичности являются неотъемлемой частью общей программы доклинических исследований новых лекарственных средств. Согласно современным требованиям в качестве тест-системы необходимо использовать не менее двух видов животных, как правило, крыс и кроликов⁸.

Цель работы – изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия препарата тиозонид у беременных кроликов.

Материалы и методы

Животные. Для проведения эксперимента использовали 80 половозрелых ранее нерожавших самок (4 группы по 20 самок) и 40 самцов

кроликов породы Советская шиншилла в возрасте 6 мес. (ФГУП ОПХ «Манихино», Московская область). Самцы использовались только для оплодотворения самок. По результатам диагностики беременности и патоморфологического исследования животных беременность наступила у 66 самок: в группе 1 – у 17 самок, в группе 2 – у 16 самок, в группе 3 – у 17 самок и в группе 4 – у 16 самок. Самки, у которых беременность не наступила, были исключены из статистического анализа. Проведение исследования было одобрено на заседании биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол заседания БЭК от 12.01.2022 № 2.1/22). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных⁹ и Директивой 2010/63/EU¹⁰. Кроликов размещали индивидуально в решетчатых клетках со сплошным дном и индивидуальной кормушкой и поилкой, в качестве подстилки использовались древесные гранулы. Температура в помещении вивария 15–22 °С, влажность >45%, световой режим 12 ч темноты и 12 ч света. Кролики получали полнорационный комбикорм и воду *ad libitum*.

Исследуемый препарат. Тестируемый препарат тиозонид, капсулы, 100 мг для перорального применения (производитель АО «Фарм-Синтез», Россия; серия 7010721). В качестве контрольного вещества использовали 1% раствор крахмала (носитель для тестируемого препарата).

Выбор доз и способ введения. Терапевтическая доза (ТД) препарата для человека составляет 400 мг/сут (4 капсулы по 100 мг) или 400 мг/60 кг ≈ 6,7 мг/кг массы тела. ТД для кролика с учетом метаболических коэффициентов¹¹ составила:

$$\text{ТД для кролика} = (6,7 \times 37) / 12 \approx 20,6 \text{ мг/кг}, \quad (1)$$

где 6,7 мг/кг – ТД в сутки для человека; 37 – метаболический коэффициент для человека; 12 – метаболический коэффициент для кролика.

В данном исследовании был изучен следующий диапазон доз: 20,6 мг/кг (ТД),

103 мг/кг (5 ТД), 206 мг/кг (10 ТД). Препарат вводили самкам в виде суспензии капсульной массы в носителе (1% раствор крахмала) 1 раз/сут перорально шприцом без иглы в объемах от 0,6 до 5,6 мл/кг. Контрольное вещество вводили животным в объеме 5,6 мл/кг.

Дизайн исследования. Дизайн исследования был подготовлен в соответствии с рекомендациями ICH S5 (R3)¹² и Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств¹³. Всего было сформировано 4 группы по 20 самок: животные группы 1 получали контрольное вещество (1% раствор крахмала), животные групп 2–4 – тестируемый препарат тиозонид в дозах 20,6, 103 и 206 мг/кг соответственно.

Первым этапом эксперимента являлось оплодотворение самок для получения не менее 16 беременных самок на группу¹⁴. После регистрации спаривания и определения 1 сут беременности (день садки), самкам с 6 сут (имплантация яйцеклетки) по 19 сут беременности перорально вводили исследуемый препарат и контрольное вещество. На протяжении всего эксперимента ежедневно осуществляли клиническое наблюдение за животными, массу тела регистрировали 2 раза в неделю. В интервале с 15 по 19 сут после спаривания проводили оценку наличия беременности, включающую в себя пальпацию брюшной полости и проведение ультразвукового исследования с помощью аппарата Mindray DP-50 (Mindray, Китай).

Эвтаназию беременных самок всех групп осуществляли на 28–29 сут беременности с помощью передозировки анестетиков (пропофол в дозе 9 мг/кг внутривенно, затем Риделат®-С 4 мг/кг внутривенно) с последующим извлечением жизненно важных органов. Выбранный способ эвтаназии соответствует указаниям Директивы 2010/63/EU.

Патоморфологическое и гистологическое исследование. После проведения плановой эвтаназии проводили макроскопическое исследование органов репродуктивной системы самок,

⁹ Белозерцева ИВ, Блинова ДВ, Красильщикова МС, ред. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. М.: ИРБИС, 2017.

¹⁰ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.

¹¹ Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Guidance for Industry. FDA; 2005.

¹² ICH S5 (R3) Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2020.

¹³ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. М: Гриф и К; 2012.

¹⁴ ICH S5 (R3) Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2020.

выполняли подсчет количества желтых тел в обоих яичниках, количества мест имплантации, количества живых и мертвых плодов с определением ранней или поздней резорбции. Все живые плоды осматривали с целью выявления возможных аномалий развития, определяли пол, массу тела, краниокаудальный размер. По завершении осмотра плоды были эвтаназированы путем внутримышечного введения препарата Риделат®-С в дозе 4 мг/кг с последующим извлечением внутренних органов.

У половины плодов определяли состояние и уровень развития скелета по методике Доусона, модифицированной в отделе эмбриологии НИИЭМ АМН СССР¹⁵ [10]. Для макроскопического исследования скелета были выполнены цифровые фотографии тотальных препаратов плодов в режиме макросъемки в двух проекциях на фотоаппарате Canon Power Shot SX260HS (Canon, Япония) с разрешением 12,1 Мпикс. Отмечали степень развития, фиксировали возможные аномалии скелета (сращенные, удвоенные, дефектные позвонки и ребра), задержку/снижение оксификации, число точек окостенения в различных костных образованиях. Уровень оксификации оценивали по глубине окраски отделов: костей черепа, грудного отдела, грудных и тазовых конечностей, включая кости поясных конечностей. Оценивали наличие/отсутствие оксификации подъязычной кости и костей грудины; фиксировали число оксифицированных позвонков хвоста, пястных костей и костей плюсны, проксимальных и дистальных фаланг каждой конечности.

У оставшихся плодов изучали состояние внутренних органов (головной мозг, сердце, легкие, желудок, кишечник, печень, почки, семенники, яичники) путем гистологического исследования препаратов по методике Вильсона в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР¹⁶. Извлеченные органы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч [11]. Материал проходил стандартную обработку с целью изготовления гистологических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 5–7 мкм [12]. Для макроскопического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Кроме того, гистологическому исследованию была подвергнута плацента самок. Анализ гистологических препаратов проводили при помощи светооптического

микроскопа Accu-Scope® 3000-LED Microscope Series (Accu-Scope, США) при увеличении 40, 100 и 400. Микрофотографирование проводилось при помощи цифровой фотокамеры Toupcam UCMOS05100KPA (Китай) и программного обеспечения ToupView 3.7.7892 (Китай).

Анализ данных. Статистический анализ данных выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения Prism 9.1.1 (GraphPad Software, США). Для оценки данных с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ – тест Брауна–Форсайта и однофакторный тест ANOVA по Уэлчу (Brown–Forsythe and Welch’s ANOVA tests), post-hoc тест Даннета (post-hoc Dunnett’s test) – и двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA tests) с последующим post-hoc тестом Даннета. Для анализа данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали критерий Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test) с дальнейшим применением post-hoc теста Данна (Dunn’s test). Оценку распределения по полу у живых плодов проводили с помощью точного критерия Фишера. Различия определяли при уровне значимости $p < 0,05$ ¹⁷.

Результаты и обсуждение

Результаты клинического наблюдения и анализа данных массы тела беременных самок показали, что на всех сроках беременности, в том числе в дни перорального введения исследуемых препаратов, клинических признаков развития интоксикации отмечено не было, наблюдался равномерный прирост массы тела во всех группах. Гибель животных в эксперименте отсутствовала.

При анализе данных, полученных после плановой эвтаназии на 28–29 сут эксперимента, у беременных самок, которым вводили препарат тиозонид во всех исследуемых дозах, не было выявлено статистически значимых отличий от животных контрольной группы по количеству желтых тел, количеству мест имплантации, количеству живых и мертвых плодов с ранней и поздней резорбцией. При оценке показателей эмбриотоксического действия (разность между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке) и фетотоксического действия (разность между количеством мест имплантации в матке и количеством живых плодов) статистически значимых отличий между

¹⁵ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

¹⁶ Там же.

¹⁷ Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.

животными в исследуемых группах также не выявлено. Во всех группах у плодов не зарегистрировано аномалий развития (табл. 2). Целостность всех плодов была сохранена, анатомическое строение соответствовало норме. Голова, хвост, грудные и тазовые конечности полностью сформированы, по 4 пальца на каждой тазовой конечности и по 5 пальцев на каждой грудной конечности с зачатками когтей. Волосьяной покров отсутствовал, веки сомкнуты плотно, наружный слуховой проход закрыт ушной раковиной. Соотношение самцов и самок среди исследованных плодов во всех группах было практически идентично и составило примерно 1:1, показатели массы тела и краниокаудальный размер статистически не отличались между группами (табл. 3).

Необходимо отметить, что после эвтаназии была обнаружена гибель всех плодов с поздней

резорбцией у одной беременной самки из группы 4, получавшей тиозонид в дозе 206 мг/кг. Это не повлияло на результаты статистического анализа, тем не менее данный факт может являться биологически значимым эффектом. Клиническое наблюдение за самкой не выявило отклонений от нормы ни по одному из регистрируемых показателей на протяжении всего эксперимента. Причиной пренатальной смертности могли явиться эндокринные факторы, такие как низкий уровень прогестерона и эстрадиола [13], определение которых не предусмотрено в стандартных протоколах исследований. Важным фактором, влияющим на течение беременности и смертность плодов, является стресс, который нельзя исключить у лабораторных животных в связи с проводимыми с ними манипуляциями [14]. Поскольку данный случай был выявлен у животного из группы, получавшей максимальную

Таблица 2. Показатели эмбрио- и фетотоксического действия препарата тиозонид в исследовании на беременных кроликах

Table 2. Embryotoxic and foetotoxic effects of thiozonide observed in pregnant rabbits

Показатель <i>Parameter</i>	Характеристика групп <i>Characteristics of groups</i>			
	Группа 1 <i>Group 1</i> <i>n=17</i>	Группа 2 <i>Group 2</i> <i>n=16</i>	Группа 3 <i>Group 3</i> <i>n=17</i>	Группа 4 <i>Group 4</i> <i>n=16</i>
	1% раствор крахмала <i>1% starch solution</i>	Тиозонид 20,6 мг/кг <i>Thiozonide, 20.6 mg/kg</i>	Тиозонид 103 мг/кг <i>Thiozonide, 103 mg/kg</i>	Тиозонид 206 мг/кг <i>Thiozonide, 206 mg/kg</i>
Количество желтых тел <i>Corpora lutea</i>	9,0 (7,5;10,0)	8,5 (7,25;9,75)	8,0 (4,50;9,0)	9,0 (8,0;10,75)
Количество мест имплантации <i>Implantation sites</i>	8,0 (7,00;9,0)	8,0 (6,0;8,0)	7,0 (6,0;8,0)	7,5 (6,0;9,0)
Количество живых плодов <i>Live foetuses</i>	8,0 (6,5;9,0)	8,0 (6,0;8,0)	7,0 (4,50;8,0)	7,0 (2,75;8,75)
Количество погибших плодов <i>Dead foetuses</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,75)
Количество ранних резорбций <i>Early resorptions</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)
Количество поздних резорбций <i>Late resorptions</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)
Предимплантационная смертность <i>Pre-implantation mortality</i>	1,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;2,0)	1,0 (0,0;1,0)	2,0 (0,0;3,0)
Постимплантационная смертность <i>Postimplantation mortality</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)
Количество плодов с внешними аномалиями <i>Foetuses with external abnormalities</i>	0	0	0	0

Примечание. Данные представлены в формате *Me (Q1;Q3)* – медиана и квартильный размах; *n* – количество животных в группе.

Note. Results are presented as the median and quartile range (*Me (Q1;Q3)*). *n*, number of animals per group.

Таблица 3. Масса тела, краниокаудальный размер, распределение по полу плодов кроликов (после плановой эвтаназии самок кроликов на 28–29 сут беременности)

Table 3. Foetal body weight, craniocaudal size, and sex (after scheduled euthanasia of pregnant rabbits on gestation day 28–29)

Показатель <i>Parameter</i>	Характеристика групп <i>Characteristics of groups</i>			
	Группа 1 <i>Group 1</i> n=130	Группа 2 <i>Group 2</i> n=116	Группа 3 <i>Group 3</i> n=105	Группа 4 <i>Group 4</i> n=99
	1% раствор крахмала <i>1% starch solution</i>	Тиозонид 20,6 мг/кг <i>Thiozonide, 20.6 mg/kg</i>	Тиозонид 103 мг/кг <i>Thiozonide, 103 mg/kg</i>	Тиозонид 206 мг/кг <i>Thiozonide, 206 mg/kg</i>
Масса тела*, г <i>Body weight*, g</i>	32,35 (29,740;35,923)	30,77 (27,075;34,995)	33,73 (29,365;37,505)	31,50 (27,600;34,080)
Краниокаудальный размер*, мм <i>Craniocaudal size*, mm</i>	84 (80,0;90,0)	85 (80,0; 87,8)	84 (79,0;88,5)	85 (82,0;89,0)
Распределение плодов по полу, самцы/самки <i>Foetal sex ratio, male/female</i>	61/69	60/56	54/51	47/52

Примечание. n – количество животных в группе.

* Данные представлены в формате *Me (Q1;Q3)* – медиана и квартильный размах.

Note. n, number of animals per group.

* Results are presented as the median and quartile range (*Me (Q1;Q3)*).

дозу, нельзя исключить и негативное влияние тестируемого препарата. С учетом обнаруженного факта дозой, не оказывающей видимых побочных эффектов (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL), в данном исследовании целесообразно считать 103 мг/кг, что эквивалентно 5 ТД. На основании полученных данных препарат тиозонид по тератогенным свойствам может быть отнесен к категории В¹⁸.

При макроскопическом исследовании патологических изменений в матке и яичниках не отмечали, анатомия и физиология половых органов самок соответствовали стадии беременности. Матка была значительно увеличена в объеме, хорошо прощупывались развитые плоды. Эндометрий был утолщен, гиперемирован, маточные железы увеличены. Просматривалась хорошо развитая сосудистая сеть. Яичники были без патологических изменений.

Гистологическое строение плаценты соответствовало сроку беременности и не отличалось от нормы у самок всех групп. Децидуальная зона была представлена обширными участками некроза, очагами кальцификации, массивными кровоизлияниями и тромбами в мелких сосудах (рис. 1). Таким образом, введение тестируемого препарата тиозонид во всех исследуемых

дозах не приводило к патологическим изменениям репродуктивных органов самок кролика.

При исследовании скелета плодов отличий от нормы и межгрупповых отличий не обнаружено. Развитие костных тканей нормальное. В черепе отчетливо просматривались лобные и теменные кости, решетчатая кость, кости нижней челюсти. Затылочная, клиновидная и чешуйчатые кости находились на начальных стадиях окостенения и были плохо различимы. Большинство костей лицевой части черепа и верхняя челюсть на этом этапе развития не кальцифицированы и при данной окраске не выявлялись.

Позвоночник плодов не окостеневший, за исключением поперечных отростков позвонков в шейном, грудном и поясничном отделах. Позвонки крестца и хвостового отдела полностью хрящевые. Ребра – частично окостеневшие, частично хрящевые. Грудина – полностью хрящевая.

Пояс грудных конечностей был представлен хорошо сформированными лопаткой и ключицей. В поясе тазовых конечностей просматривалась только подвздошная кость. Отчетливо просматривались кости конечностей (рис. 2).

При гистологическом исследовании головного мозга и внутренних органов плодов

¹⁸ Labeling and prescription drug advertising: content and format for labeling for human prescription drugs. FDA; 1979.

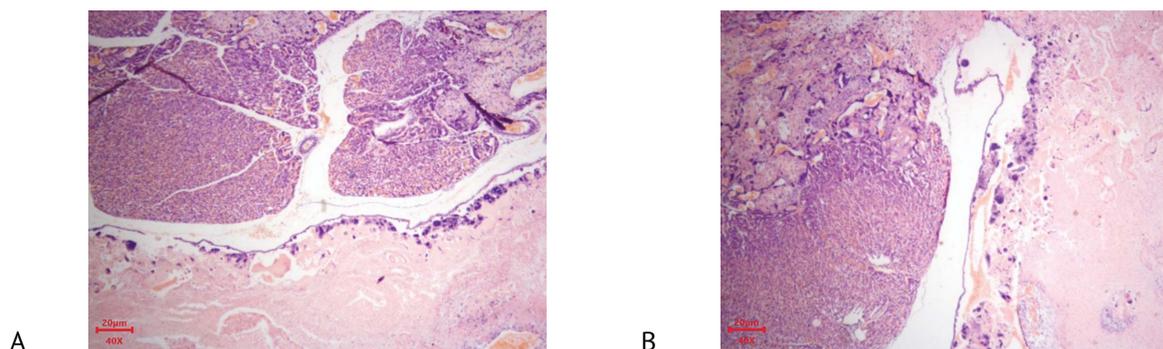


Рис. 1. Гистологическое исследование плаценты. (А) Плацента самки кролика из контрольной группы животных. (В) Плацента самки кролика из группы животных, получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 1. Placental histology: (A) the placenta of a rabbit from the control group; (B) the placenta of a rabbit from the 206 mg/kg thiozonide group. Haematoxylin and eosin staining

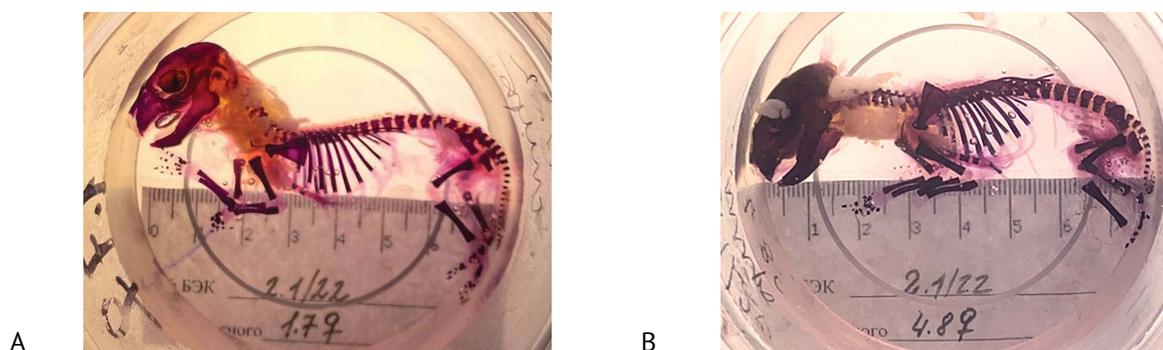


Рис. 2. Макроскопическое исследование развития скелета. (А) Скелет плода кролика из контрольной группы животных. (В) Скелет плода кролика из группы животных, получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг

Fig. 2. Macroscopic study of skeletal development: (A) a foetal skeleton from the control group; (B) a foetal skeleton from the 206 mg/kg thiozonide group

животных (сердца, легких, желудка, кишечника, печени, почек, семенников и яичников) во всех изученных группах патологических изменений морфологии органов и тканей не выявлено. Репрезентативные микрофотографии органов плодов контрольной группы животных и группы животных, получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг, представлены на *рисунке 3*.

Анализ данных патоморфологического исследования плодов кроликов показал, что в группах животных, получавших тиозонид во всех исследуемых дозах, и у животных контрольной группы патологические изменения архитектоники органов отсутствовали.

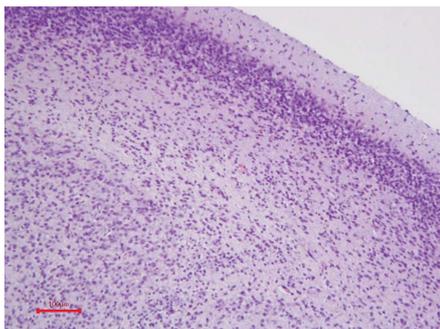
Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что тестируемый препарат тиозонид (АО «Фарм-Синтез», Россия) при многократном пероральном введении

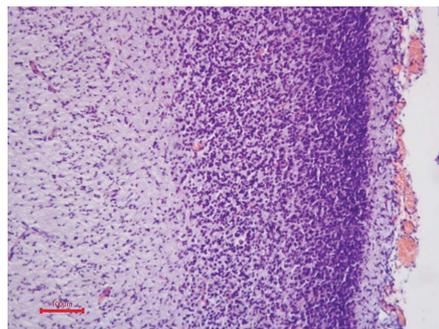
в диапазоне доз 20,6–103 мг/кг беременным самкам кроликов не оказывает эмбрио-, фетотоксического и тератогенного действия. В группе животных, получавшей тиозонид в максимальной исследуемой дозе 206 мг/кг, у одной самки во время эвтаназии была обнаружена гибель всех плодов с поздней резорбцией. Клиническое наблюдение за самкой не выявило отклонений от нормы на протяжении всего эксперимента, тем не менее нельзя исключить негативного влияния на организм беременных тестируемого препарата в высокой дозе. С учетом обнаруженного факта дозой, не оказывающей видимых побочных эффектов (NOAEL), в данном исследовании целесообразно считать 103 мг/кг, что эквивалентно 5 ТД.

На основании полученных данных препарат тиозонид по действию, оказываемому на организм беременных самок кролика, может быть отнесен к категории В

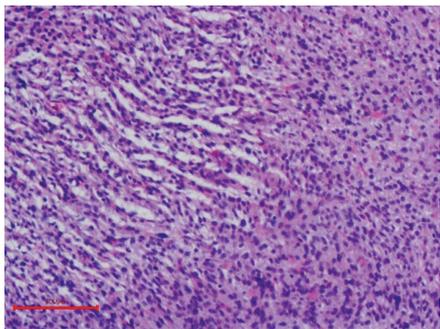
A1



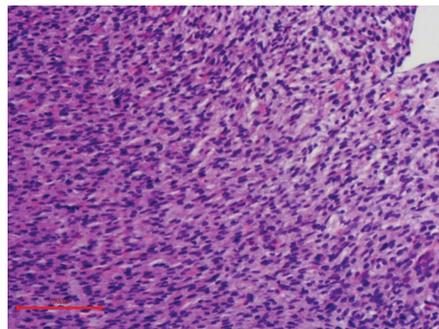
A2



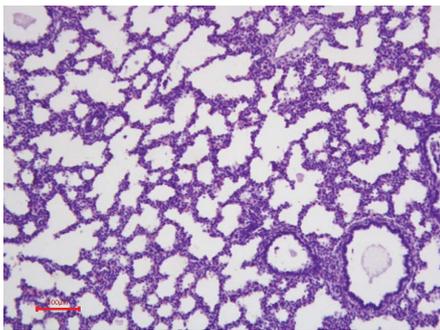
B1



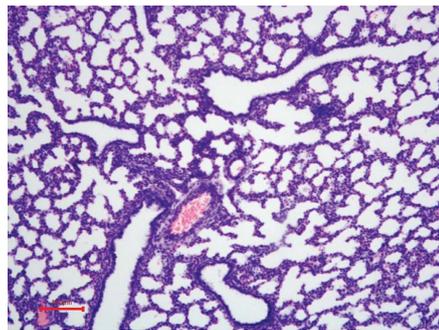
B2



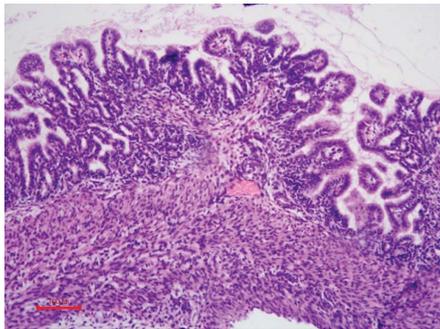
C1



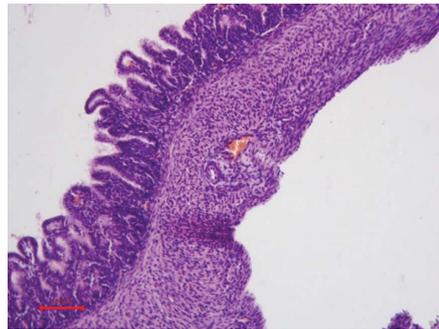
C2



D1



D2



E1



E2



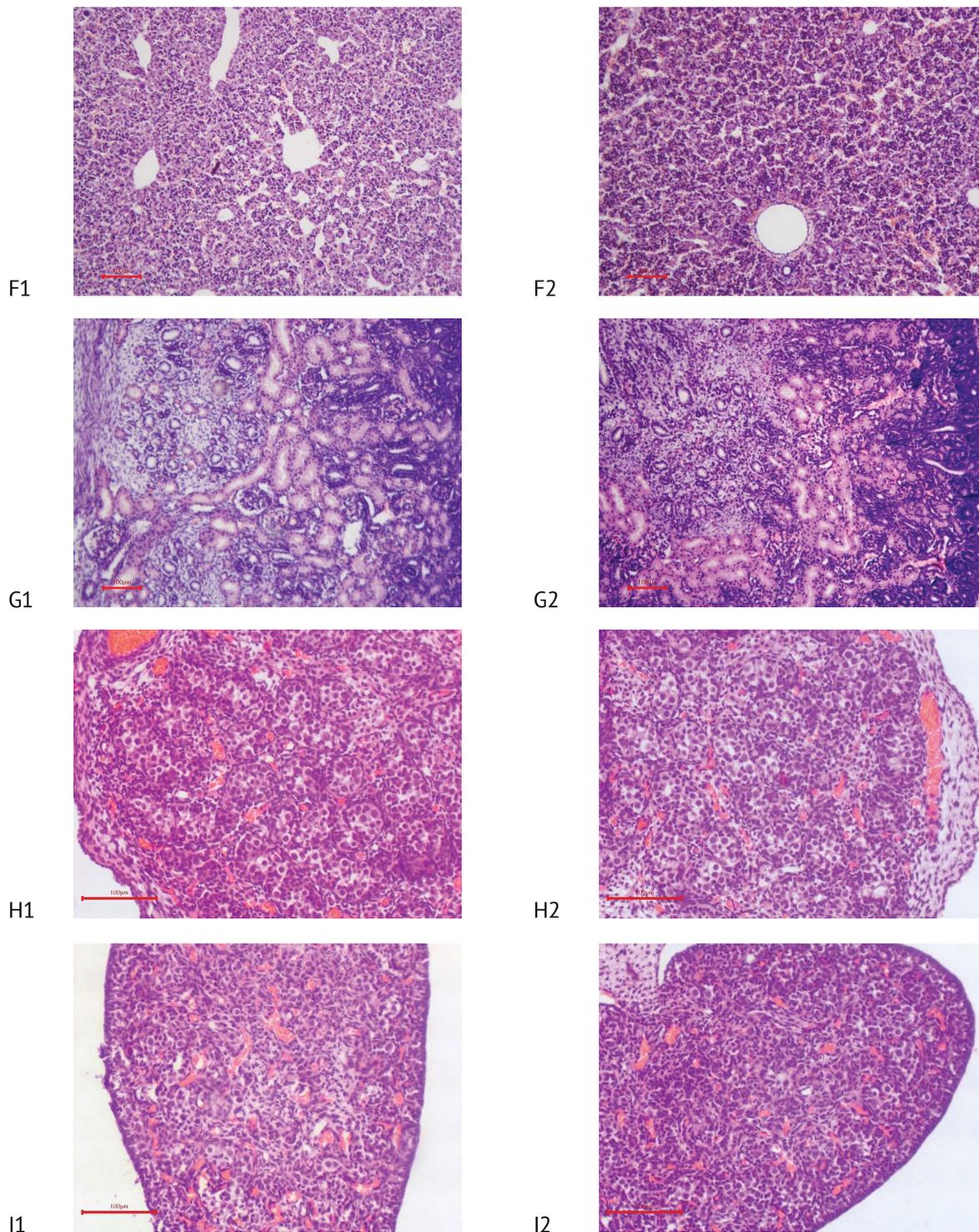


Рис. 3. Микрофотографии образцов тканей плодов животных из контрольной группы (индекс 1) и из группы получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг (индекс 2) соответственно: А1 и А2 – головной мозг; В1 и В2 – миокард; С1 и С2 – легкие; D1 и D2 – желудок; E1 и E2 – кишечник; F1 и F2 – печень; G1 и G2 – почки; H1 и H2 – семенник; I1 и I2 – яичник. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 3. Micrographs of foetal tissue samples from the control group (index 1) and the 206 mg/kg thiozonide group (index 2): A1 and A2, brain; B1 and B2, myocardium; C1 and C2, lung; D1 and D2, stomach; E1 and E2, intestine; F1 and F2, liver; G1 and G2, kidney; H1 and H2, testis; I1 and I2, ovary. Haematoxylin and eosin staining

(исследования на животных не показали риска для плода, адекватных исследований у беременных женщин нет) и рекомендован

для проведения дополнительных клинических исследований с участием беременных женщин.

Литература / References

1. Васильева ИА, Тестов ВВ, Стерликов СА. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 – 2020–2021 гг. *Туберкулез и болезни легких*. 2022;100(3):6–12.
Vasilyeva IA, Testov VV, Sterlikov SA. Tuberculosis situation in the years of the COVID-19 pandemic – 2020–2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2022;100(3):6–12 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12>
2. Стерликов СА, Русакова ЛИ, Сон ИМ. Исходы случаев лечения туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью: результаты трехлетнего наблюдения. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики*. 2018;(2):14–27.
Sterlikov SA, Rusakova LI, Son IM. Extensively drug-resistant tuberculosis treatment outcomes: results of the three-year observation. *Current Problems of Health Care and Medical Statistics*. 2018;(2):14–27 (In Russ.).
3. Савченко АЮ, Буренков МС, Байдин ПС, Раменская ГВ, Перова НВ, Кукес ВГ. Исследование генотоксических свойств противотуберкулезного препарата тиозонид. *Туберкулез и болезни легких*. 2021;99(6):22–7.
Savchenko AYu, Burenkov MS, Baydin PS, Ramenskaya GV, Perova NV, Kukes VG. Study of genotoxic properties of thiozonide. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2021;99(6):22–7 (In Russ.).
<http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-6-22-27>
4. Бочарова ИВ, Буренков МС, Лепеха ЛН, Смирнова ТГ, Черноусова ЛН, Демикова ОВ. Доклинические исследования специфической активности нового противотуберкулезного препарата тиозонид. *Туберкулез и болезни легких*. 2014;(6):46–50.
Bocharova IV, Burenkov MS, Lepekhina LN, Smirnova TG, Chernousova LN, Demikhova OV. Preclinical studies of the specific activity of the new antituberculosis drug thiozonide. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2014;(6):46–50 (In Russ.). EDN: [SLSSBX](#)
5. Савченко АЮ, Раменская ГВ, Буренков МС. Изучение безопасности и переносимости противотуберкулезного препарата тиозонид при однократном приеме возрастающих доз. *Качественная клиническая практика*. 2016;(3):43–8.
Savchenko AU, Ramenskaya GV, Bourenkov MS. The safety and tolerability study of thiozonide in single dose with it increasing. *Good Clinical Practice*. 2016;(3):43–8 (In Russ.).
6. Bookstaver PB, Bland CM, Griffin B, Stover KR, Eiland LS, McLaughlin M. A review of antibiotic use in pregnancy. *Pharmacotherapy*. 2015;35(11):1052–62.
<https://doi.org/10.1002/phar.1649>
7. Steen JS, Stainton-Ellis DM. Rifampicin in pregnancy. *The Lancet*. 1977;2(8038):604–5.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)91447-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)91447-7)
8. Bothamley G. Drug treatment for tuberculosis during pregnancy: safety considerations. *Drug Saf*. 2001;24(7):553–65.
<https://doi.org/10.2165/00002018-200124070-00006>
9. Постников СС. Токсические эффекты антибиотиков. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2008;87(2):21.
Postnikov SS. Toxic effects of antibiotics. *Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*. 2008;87(2):21 (In Russ.). EDN: [JQPRZR](#)
10. Дыбан АП, Баранов ВС, Акимов ИМ. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1970;59(10):89–100.
Dyban AP, Baranov VS, Akimov IM. Basic methodological approaches to testing the teratogenic activity of chemical substances. *Archives of Anatomy, Histology, and Embryology*. 1970;59(10):89–100 (In Russ.). PMID: 5511190
11. Гушин ЯА, Мужикян АА. Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;(3):88–95.
Gushchin YaA, Muzhikyan AA. Effect of fixing liquids on microscopic structure of small laboratory animals. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;(3):88–95 (In Russ.). EDN: [SUEDYE](#)
12. Мужикян АА, Макарова МН, Гушин ЯА. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;(2):103–9.
Muzhikyan AA, Makarova MN, Gushchin YaA. Features histological processing of organs and tissues of laboratory animals. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;(2):103–9 (In Russ.). EDN: [SFLHTJ](#)
13. Vicente JS, Llobat L, Viudes-De-Castro MP, Lavara R, Baselga M, Marco-Jiménez F. Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. *Theriogenology*. 2012;77(1):81–8.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.019>
14. Rosell JM, de la Fuente LF, Carbajo MT, Fernández XM. Reproductive diseases in farmed rabbit does. *Animals*. 2020;10(10):1873.
<https://doi.org/10.3390/ani10101873>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.Ю. Бородина – проведение эксперимента, сбор и анализ данных, анализ литературы, написание текста рукописи; К.Л. Крышень – планирование эксперимента, анализ данных, участие в написании текста рукописи; А.Ю. Савченко – участие в написании текста рукописи; М.Н. Макарова – участие в написании рукописи и критический пересмотр ее содержания; В.Г. Макаров – критический пересмотр содержания и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Все исследования были выполнены в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследований было одобрено на заседании биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол заседания БЭК от 12.01.2022 № 2.1/22).

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке АО «Фарм-Синтез», Российская Федерация.

Конфликт интересов. Существует потенциальный конфликт интересов в связи с финансированием данной научной работы АО «Фарм-Синтез». Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

Authors' contribution. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Antonina Yu. Borodina conducted the experiment, collected and analysed data, analysed literature, and drafted the manuscript. Kirill L. Kryshen planned the experiment, analysed data, and participated in the drafting of the manuscript. Alla Yu. Savchenko participated in the drafting of the manuscript. Marina N. Makarova participated in the drafting of the manuscript and critically revised its content. Valery G. Makarov critically revised the content of the manuscript and approved the final version for publication.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The study was approved by the Bioethics Committee of the research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" (Approval No. 2.1/22 of 12.01.2022).

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by Pharm-Sintez AO, Russian Federation.

Conflict of interest. There is a potential conflict of interest due to the financing of this scientific work by Pharm-Sintez AO. However, when writing the article, the authors were guided by considerations of the scientific value of the obtained material and declare the impartiality of the assessment of the obtained data.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Бородина Антонина Юрьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5386-7551>
borodina.ay@doclinika.ru

Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Савченко Алла Юрьевна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>
alursav@mail.ru

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Antonina Yu. Borodina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5386-7551>
borodina.ay@doclinika.ru

Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Alla Yu. Savchenko, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>
alursav@mail.ru

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.),
Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Поступила 02.03.2023

После доработки 03.04.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Received 2 March 2023

Revised 3 April 2023

Accepted 6 June 2023