

Изучение безопасности оригинального препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении крысам

А.О. Монакова^{1,2}, Г.Д. Сагарадзе¹, В.Ю. Балабаньян^{1,2}, Н.А. Басалова^{1,2}, А.А. Матичина³, А.А. Матичин³, К.Л. Крышень³, В.С. Попов^{1,2}, Ж.А. Акопян^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2,✉}

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ломоносовский проспект, 27/10, Москва, 119192, Российская Федерация

² Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ломоносовский проспект, 27/1, Москва, 119191, Российская Федерация

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

✉ Контактное лицо: Ефименко Анастасия Юрьевна efimenkoay@my.msu.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время отсутствуют эффективные и безопасные препараты для лечения идиопатического мужского бесплодия. Эффективность нового препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток (МСК) при бесплодии показана ранее на двух животных моделях: временный крипторхизм у крыс и химиотерапевтическое повреждение сперматогенеза доксорубицином у мышей.

Цель работы: изучение токсических свойств препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении препарата крысам.

Материалы и методы: секретом МСК представляет собой набор факторов, секретируемых МСК в среду для кондиционирования DMEM-LG. Для изучения токсичности при однократном применении препарата на основе секрета МСК вводили самцам крыс линии Wistar под белочную оболочку семенника в дозах, в 1,5 и 2,5 раза превышающих терапевтическую дозу (10 условных единиц (УЕ)): 15 УЕ/животное и 25 УЕ/животное соответственно; число животных в каждой группе $n=15$. Для изучения токсических свойств при многократном применении препарат вводили самцам крыс линии Wistar в мышцу бедра на 1, 6 и 12 сут исследования в дозах 15 и 25 УЕ, число животных в каждой группе $n=10$. Для оценки местной переносимости были проведены патологические и гистологические исследования семенников и мышечной ткани бедра в месте введения препарата. В качестве контроля во всех исследованиях использовали группу интактных крыс и группу крыс, которой аналогичным путем вводили среду DMEM без продуктов секреции МСК. Срок наблюдения составлял 14 сут, период отсроченного наблюдения – 42 сут.

Результаты: при однократном и многократном введении крысам препарата на основе секрета МСК не наблюдали изменений в общем состоянии животных. Однократное введение под белочную оболочку семенника оказало умеренное местнораздражающее действие, которое выражалось в патологическом изменении единичных семенных канальцев, а именно атрофии эпителия (у 70% животных через 14 сут, у 55% – в группе отсроченного наблюдения) и застое спермы (у 70% животных). Аналогичные изменения наблюдали в группе контроля с введением среды DMEM (до 80% животных). При многократном введении патологических изменений ткани не наблюдали. У животных, получавших изучаемый препарат в дозе 25 УЕ

внутримышечно, после 3-кратного введения обнаружено обратимое повышение уровня активности щелочной фосфатазы, остальные биохимические показатели у крыс во всех группах были в норме.

Выводы: препарат на основе секрета МСК обладает приемлемым профилем безопасности при локальном и внутримышечном введении крысам, поскольку не вызывает необратимых патологических изменений в изученных органах и тканях.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки; секретом мезенхимных стромальных клеток; сперматогенез; грызуны; безопасность; общая токсичность; субхроническая токсичность; местная токсичность

Для цитирования: Монакова А.О., Сагарадзе Г.Д., Балабаньян В.Ю., Басалова Н.А., Матичина А.А., Матичин А.А., Крышень К.Л., Попов В.С., Акопьян Ж.А., Ефименко А.Ю. Изучение безопасности оригинального препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении препарата крысам. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-364>

Safety Study of an Original Mesenchymal Stromal Cell Secretome-Based Medicinal Product for Spermatogenesis Restoration

A.O. Monakova^{1,2}, G.D. Sagaradze¹, V.Yu. Balabanyan^{1,2}, N.A. Basalova^{1,2}, A.A. Matichina³, A.A. Matichin³, K.L. Kryshen³, V.S. Popov^{1,2}, Zh.A. Akopyan^{1,2}, A.Yu. Efimenko^{1,2,✉}

¹ Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University Medical Research and Educational Center 27/10 Lomonosovsky Ave, Moscow 119192, Russian Federation

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, 27/1 Lomonosovsky Ave, Moscow 119991, Russian Federation

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

✉ Corresponding author: **Anastasia Yu. Efimenko** efimenkoay@my.msu.ru

ABSTRACT

Currently, there are no effective and safe medicinal products for idiopathic male infertility. Previous studies in two animal models of infertility (short-term cryptorchidism in rats and doxorubicin-induced testicular injury in mice) have shown the effectiveness of an originator medicinal product based on the mesenchymal stromal cell (MSC) secretome.

The aim of the study was to evaluate the toxicity profile of the MSC secretome-based medicinal product in rats after local intratesticular or intramuscular administration.

Materials and methods. The MSC secretome is a combination of factors secreted by MSCs in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG) for MSC conditioning. In the single-dose toxicity study, the MSC secretome-based medicinal product was injected under the testicular tunica albuginea of male Wistar rats (15 per group) at doses of 15 and 25 relative units (RU) per animal, which are 1.5 and 2.5 times higher than the therapeutic dose (10 RU). In the repeat-dose toxicity study, male Wistar rats (10 per group) received intramuscular thigh injections of the medicinal product on days 1, 6, and 12 at doses of 15 and 25 RU per animal. The local tolerance study involved histopathological examination of the testes and thighs at the injection site. All studies included control groups of intact animals and animals similarly injected with blank DMEM-LG. The early follow-up period was 14 days, and the late follow-up period was 42 days.

Results. The rats showed no changes in the general condition after single and repeated doses of the MSC secretome-based medicinal product. Single subcutaneous doses induced moderate irritation; its signs included pathological changes in individual seminiferous tubules: epithelial atrophy (70% of the animals on day 14; 55%

at late follow-up) and sperm stasis (70% of the animals). Similar changes were observed in the blank DMEM-LG group (up to 80% of the animals). There were no pathological changes in the tissues after repeated injections. A transient increase in alkaline phosphatase activity was detected in animals after their third intramuscular injection at a dose of 25 RU; the other biochemical parameters were normal in all study groups.

Conclusions. The MSC secretome-based medicinal product has a favourable safety profile following both intratesticular and intramuscular administration, as it does not cause any permanent changes in the studied organs and tissues.

Key words: mesenchymal stromal cells; mesenchymal stromal cell secretome; spermatogenesis; rodents; safety; general toxicity; subchronic toxicity; local toxicity

For citation: Monakova A.O., Sagaradze G.D., Balabanyan V.Yu., Basalova N.A., Matichina A.A., Matichin A.A., Kryshen K.L., Popov V.S., Akopyan Zh.A., Efimenko A.Yu. Safety study of an original mesenchymal stromal cell secretome-based medicinal product for spermatogenesis restoration. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-364>

Введение

Мужское бесплодие в настоящее время относится к заболеваниям с неудовлетворенной медицинской потребностью. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, число семейных бесплодных пар варьирует от 12,6 до 17,5%¹. Около 50% всех случаев бесплодия пар связаны с мужским бесплодием [1]. Причины возникновения мужского бесплодия разнообразны, в значительной части случаев бесплодие является идиопатическим [2]. Поскольку причину нарушений сперматогенеза во многих случаях установить не удается, методы лечения подбираются эмпирическим путем. Наиболее часто применяемые методы включают фармакотерапию (селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов, ингибиторы ароматазы, ингибиторы фосфодиэстеразы-5, антиоксиданты, гонадотропин, бромкриптин) и вспомогательные репродуктивные технологии [3]. Однако эти методы малоэффективны и обладают большим количеством побочных эффектов, что приводит к необходимости поиска новых, более эффективных и безопасных терапевтических подходов [4].

В настоящее время активно исследуются возможности применения клеточной терапии, которая позволяет активировать собственные ресурсы для регенерации органов и тканей либо компенсировать недостающие клетки путем замещения или прямой дифференцировки введенных клеток с сохранением нативной структуры ткани [5]. Одним из перспективных подходов может быть применение мезенхимных стромальных клеток (МСК), эффективность которых

для лечения многих заболеваний изучается [6–8]. Однако применение клеточных продуктов сопряжено с наличием некоторых трудностей и рисков. Существует риск инфильтрации иммунных клеток в место введения при инъекции аллогенного препарата, а также повышен риск неоплазии, особенно в иммунопривилегированных зонах, в том числе в семенниках [9].

Большую часть эффектов МСК оказывают за счет секреции факторов роста, цитокинов, компонентов внеклеточного матрикса и регуляторных РНК, переносимых в основном в составе внеклеточных везикул [10, 11]. Таким образом, поскольку механизм действия МСК не предполагает непосредственной дифференцировки в другие клетки, альтернативой клеточной терапии МСК может быть использование продуктов секреции МСК. Преимуществом применения секрета МСК является снижение рисков, связанных с клеточной терапией, а также упрощение процессов производства и хранения [12–14]. В исследованиях [9, 15, 16] была отмечена терапевтическая эффективность секрета МСК в виде частичного восстановления сперматогенеза и фертильности самцов в животных моделях нарушений сперматогенеза различного генеза, что делает его перспективным агентом для применения в медицине.

Секретом МСК относится к биологическим лекарственным препаратам, поскольку производится биологическим источником, а именно клетками. В соответствии с Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза² традиционные подходы, используемые

¹ <https://www.who.int/ru/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>

² Решение Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

для исследования токсичности лекарственных препаратов, могут не в полной мере подходить для биологических лекарственных препаратов. Причиной этого являются уникальность и разнообразие структурных и биологических свойств таких препаратов, в частности, видоспецифичность, иммуногенность и непредсказуемые плейотропные эффекты. При планировании экспериментов по изучению острой токсичности секрета МСК учитывалось, что в ранее проведенных нашей группой пилотных экспериментах (результаты не опубликованы) не удалось установить летальную дозу, поэтому в исследовании использовали максимально переносимые дозы.

Цель работы – изучение токсических свойств препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении препарата крысам.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Исследовать общую токсичность при введении препарата на основе секрета МСК.
2. Исследовать локальную токсичность при однократном введении.
3. Выявить потенциальный орган-мишень токсического воздействия.
4. Изучить влияние препарата на основе секрета МСК на спермограмму при однократном и многократном введении.
5. Исследовать местную переносимость препарата на основе секрета МСК при однократном введении под белочную оболочку семенника.
6. Изучить влияние препарата на основе секрета МСК на генеративную функцию.

Материалы и методы

Изучение токсических свойств секрета МСК было проведено на крысах, поскольку исследование эффективности препарата ранее проводилось на животных данного рода [15, 16].

Животные. В исследовании были использованы крысы линии Wistar – половозрелые самцы с массой тела 276 ± 23 г и самки с массой тела $278 \pm 2,5$ г на начало эксперимента (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Проведение исследований было одобрено на заседании биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», протоколы заседаний БЭК от 07.12.2020 № 1.67/20, от 07.12.2020 № 2.67/20.

Животных содержали в стандартных условиях по 5 особей в клетке в соответствии

с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях³. Крысы получали стандартный корм и воду очищенную *ad libitum*. Исследуемый препарат и контрольную среду вводили предварительно наркотизированным животным. Наркотизацию животных выполняли путем внутримышечного введения ветеринарных препаратов Золетил 100 (Vibrac, Франция, серия 8042, годен до 03.2023 г.) и Ксила (Interchemie, Нидерланды, серии 361903, годен до 05.2024 г.) в дозах 25 и 5 мг/кг соответственно. Введение исследуемого препарата и контрольной среды выполняли при отсутствии пальпебрального и межпальцевого рефлексов.

Исследуемый препарат

Выделение МСК из жировой ткани человека. МСК, выделенные из жировой ткани здоровых доноров, были получены из коллекции биобанка Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, ID коллекции: MSU_MSC_AD (<https://human.depo.msu.ru>). Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone) и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Смену среды проводили каждые 3–4 сут. Клетки пассировали при достижении $\approx 80\%$ конфлюэнта. Все эксперименты были выполнены с клетками в течение 5 пассажей. Коллекции биоматериалов от доноров были созданы и пополняются согласно разрешению институционального локального этического комитета (Этический комитет МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, IRB00010587, протокол заседания от 04.06.2018 № 4) с получением добровольного информированного согласия у всех доноров.

Получение секрета МСК. Для получения секрета МСК жировой ткани 4–5 пассажа, достигшие 80% конфлюентности, промывали трехкратно раствором Хэнкса с солями кальция и магния («ПанЭко», Россия). В чашки добавляли среду DMEM с низким содержанием глюкозы (DMEM, low glucose (DMEM-LG), GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (Gibco, США)). Клетки культивировали в течение 7 сут, после чего кондиционированную среду, содержащую компоненты секрета МСК, собирали, очищали от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 10 мин при 300 г.

³ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. СПб; 2012.

Концентрирование секрета МСК. Для концентрирования использовали фильтры для центрифуги Amicon (#Z740186, Merck, Германия) с размером пор, предназначенным для отсеивания молекул размером меньше 10 кДа. Новые фильтры очищали и «забивали» белком за счет концентрирования 5 мл стерильной 1% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) в растворе фосфатно-солевого буфера (ПанЭко, Россия) до минимального остаточного объема. Затем фильтр промывали 3 раза за счет пропуска через него 2% раствора пенициллина-стрептомицина в фосфатно-солевом буферном растворе. Затем помещали в фильтры секретом МСК и центрифугировали его на фильтрах при скорости 3000 g и температуре +4 °C до уменьшения объема концентрата в 75 или в 125 раз по сравнению с начальным. Полученный концентрат отбирали для дальнейшего использования.

Способ введения и выбор доз. В соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств⁴ рекомендовано исследование общей токсичности фармакологического вещества на двух уровнях доз. Поскольку на данный момент нет информации о предполагаемой терапевтической дозе, в исследовании были использованы дозы, исходя из результатов изучения эффективности на модели крипторхизма у крыс [15, 16]: превышающая терапевтическую дозу (10 условных единиц (УЕ)) в 1,5 раза (15 УЕ) и в 2,5 раза (25 УЕ). Были использованы две дозы, поскольку необходимо показать дозозависимость токсических эффектов. Перед введением исследуемый препарат смешивали с коллагеновым гелем Аппликолл в объемном соотношении 1:4. Препарат вводили в максимально возможном объеме в оба семенника по 100 мкл в дозах 15 и 25 УЕ [15]. Объем для внутримышечного введения тестируемого препарата составил 0,8 мл/кг в дозах 15 или 25 УЕ. В качестве контрольного вещества использовали среду DMEM-LG (DMEM с низким содержанием глюкозы), поскольку она является «растворителем», в которую клетки при кондиционировании выделяют компоненты своего секрета. Контрольное вещество вводили животным в объеме, эквивалентном максимальному объему введения тестируемого препарата при выбранных путях введения.

Дизайн исследования. Проведена оценка общетоксических свойств и субхронической

токсичности. Оценка токсических свойств секрета МСК при однократном введении и оценка генеративной токсичности проведена на дозах 15 и 25 УЕ в соответствии с предполагаемой клинической схемой применения: однократное введение препарата в виде инъекции под белочную оболочку семенника. Для изучения субхронической токсичности препарат на основе секрета МСК вводили животным в мышцу правого бедра на 1, 6 и 12 сут эксперимента в дозах 15 и 25 УЕ. Оценивали также местнораздражающее действие препарата. Всего в исследование было включено 7 групп животных. В качестве контрольных групп для всех исследований были взяты интактные животные и животные, которым вводили контрольное вещество DMEM-LG в объеме, аналогичном объему введения препарата.

С целью определения обратимости возможных патологических изменений, возникающих при указанных способах введения тестируемого препарата, во всех исследованиях проводили наблюдение за экспериментальными животными в течение всего периода введения препарата на 1, 6 и 12 сут (всего 14 сут), а также отсрочено – 42 сут после окончания применения тестируемого препарата. Экспериментальные дизайны исследований по изучению токсических свойств при однократном и многократном введении представлены в *таблицах 1–3*.

Регистрация массы тела. Процедуру взвешивания животных (взрослых особей и потомства) осуществляли на электронных весах Vibra AJ-1200CE (Shinko Denshi, Япония): максимальный предел взвешивания – 1200 г, минимальный предел взвешивания – 0,5 г, цена поверочного деления 0,1 г, класс точности 2.

Регистрация сроков развития интоксикации и клинический осмотр животных. Регистрировали результаты осмотра животного в клетке, осмотра животного при фиксации в области холки, осмотра места введения. Клинический осмотр животного выполняли в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Затем отмечали проявление и выраженность признаков интоксикации.

Оценка потребления корма и воды. Готовили навеску корма и выдавали фиксированный объем воды исходя из числа животных в клетке содержания и нормы потребления одним животным: 20 г корма на 1 животное в сутки; 30 мл воды на 1 животное в сутки. Спустя сутки проводили оценку потребления корма и воды методом вычета из остатка исходного.

⁴ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

Таблица 1. Характеристика групп животных для исследования токсичности препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при однократном введении под белочную оболочку семенника крысы

Table 1. Design of animal groups for the single-dose toxicity study of the mesenchymal stromal cell secretome-based medicinal product in rats following subcutaneous administration

№ группы <i>Group</i>	Количество животных <i>Number of animals</i>	Препарат для введения <i>Product for injection</i>	Доза <i>Dose</i>	Эвтаназия животных <i>Euthanasia</i>
1	15	Нет <i>No</i>	Не применимо (интактные животные) <i>Not applicable (intact animals)</i>	На 14 сут – по 5 животных каждой группы; на 42 сут – оставшиеся животные <i>5 animals from each group on day 14, the remaining animals on day 42</i>
2	15	Препарат на основе секрета МСК <i>MSC secretome-based medicinal product</i>	15 УЕ/животное <i>15 RU/animal</i>	
3	15		25 УЕ/животное <i>25 RU/animal</i>	
4	10	Контрольное вещество DMEM-LG <i>DMEM-LG control</i>	0,8 мл/кг <i>0.8 mL/kg</i>	

Примечание. МСК – мезенхимные стромальные клетки; УЕ – условные единицы; DMEM-LG – среда DMEM с низким содержанием глюкозы.

Note. MSC, mesenchymal stromal cells; RU, relative units; DMEM-LG, low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium.

Таблица 2. Характеристика групп животных для исследования токсичности препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при многократном внутримышечном введении самцам крыс

Table 2. Design of animal groups for the repeat-dose toxicity study of the mesenchymal stromal cell secretome-based medicinal product in male rats following intramuscular administration

№ группы <i>Group</i>	Количество животных <i>Number of animals</i>	Препарат для введения <i>Product for injection</i>	Доза <i>Dose</i>	Эвтаназия животных <i>Euthanasia</i>
5	10	Препарат на основе секрета МСК <i>MSC secretome-based medicinal product</i>	15 УЕ/животное <i>15 RU/animal</i>	На 14 сут – по 5 животных каждой группы, на 42 сут – оставшиеся животные. <i>5 animals from each group on day 14, the remaining animals on day 42</i>
6	10		25 УЕ/животное <i>25 RU/animal</i>	
7	10	Контрольное вещество DMEM-LG <i>DMEM-LG control</i>	0,8 мл/кг <i>0.8 mL/kg</i>	

Примечание. МСК – мезенхимные стромальные клетки; УЕ – условные единицы; DMEM-LG – среда DMEM с низким содержанием глюкозы.

Note. MSC, mesenchymal stromal cells; RU, relative units; DMEM-LG, low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium.

Оценка индивидуального поведения животных. Оценку индивидуального поведения самцов крыс проводили в тесте «открытое поле» с учетом ориентировочно-исследовательского, эмоционального, стереотипного и двигательного компонентов по поведенческому атласу для грызунов [17].

Анализ мочи. Животных помещали в метаболические клетки на 4 ч. На данный период животным был обеспечен доступ к корму и воде.

Перед помещением в метаболические клетки животным обеспечивали водную нагрузку путем однократного внутрижелудочного введения питьевой воды в объеме 1 мл/100 г массы тела.

Общий анализ мочи включал в себя проведение качественных реакций для определения патологических компонентов мочи. Оценку результата анализа осуществляли путем визуальной регистрации изменения цвета реакции. Общий анализ мочи проводили по следующим

Таблица 3. График проведения манипуляций

Table 3. Schedule of manipulations

Манипуляции <i>Manipulations</i>	Сутки эксперимента <i>Days</i>
Оценка токсических свойств препарата при однократном и многократном введении <i>Single and repeated dose toxicity evaluation</i>	
Регистрация массы тела <i>Registration of body weight</i>	1 (до введения препарата), далее – еженедельно <i>Day 1 (before administration) and then weekly</i>
Введение препарата или контрольного вещества под белочную оболочку семенника животным групп № 2–4 <i>Subtunicular administration of the test product or the control substance in groups 2–4</i>	1
Внутримышечное введение препарата или контрольного вещества животным групп № 5–7 <i>Intramuscular administration of the test product or the control substance in groups 5–7</i>	1, 6, 12
Клиническое наблюдение с оценкой интоксикации <i>Clinical observation with an assessment of intoxication</i>	Ежедневно <i>Daily</i>
Клинический осмотр <i>Clinical examination</i>	Еженедельно <i>Weekly</i>
Оценка потребления корма и воды <i>Assessment of food and water intake</i>	Еженедельно <i>Weekly</i>
Оценка индивидуального поведения <i>Assessment of individual behaviour</i>	10, 38
Сбор образцов мочи для общего анализа <i>Collection of urine samples for urinalysis</i>	11, 39
Взятие образцов крови для гематологического анализа <i>Blood sampling for haematological analysis</i>	13, 41
Измерение уровня глюкозы в периферической крови <i>Peripheral blood glucose measurement</i>	14, 42
Взятие образцов крови для биохимического анализа <i>Blood sampling for biochemical analysis</i>	14, 42
Оценка спермограммы животных группы № 6 <i>Evaluation of spermograms in group 6</i>	14, 42
Эвтаназия 5 животных каждой группы <i>Euthanasia of 5 animals from each group</i>	14
Эвтаназия оставшихся животных <i>Euthanasia of the remaining animals</i>	42
Оценка генеративной токсичности препарата (группы № 1–3) <i>Reproductive toxicity evaluation (groups 1–3)</i>	
Процедура спаривания <i>Mating procedure</i>	1-е поколение: 15–28 2-е поколение: 109–122 <i>Generation 1: 15–28</i> <i>Generation 2: 109–122</i>
Определение дня беременности <i>Gestation day determination</i>	1-е поколение: 16–28 2-е поколение: 110–122 <i>Generation 1: 16–28</i> <i>Generation 2: 109–122</i>
Регистрация массы тела беременных самок крыс <i>Registration of body weight of pregnant rats</i>	1–3, 10–11, 16–19 сут беременности <i>Gestation days 1–3, 10–11, 16–19</i>
Оценка потребления корма и воды беременных самок и их потомства после отсадки от матерей <i>Evaluation of food and water intake by pregnant rats and their offspring after weaning</i>	Еженедельно <i>Weekly</i>
Эвтаназия 5 самцов из каждой группы <i>Euthanasia of 5 males from each group</i>	14

Продолжение таблицы 3

Table 3 (continued)

Манипуляции <i>Manipulations</i>	Сутки эксперимента <i>Days</i>
Эвтаназия оставшихся самцов <i>Euthanasia of the remaining males</i>	42
Оценка спермограммы <i>Spermogram evaluation</i>	14, 42
Эвтаназия 50% беременных самок каждой группы 1-го и 2-го поколений и оценка эффективности оплодотворения <i>Euthanasia of 50% of pregnant rats from each group of generations 1 and 2 and evaluation of the fertilisation rate</i>	20–21
Наблюдение за потомством 1-го и 2-го поколений <i>Observation of the offspring of generations 1 and 2</i>	1–45 сут после рождения <i>Postnatal days 1–45</i>
Отсадка матерей от потомства <i>Weaning</i>	25–30 сут после рождения <i>Postnatal days 25–30</i>

параметрам: кровь (амидопириновая проба), белок (взаимодействие с пирогалловым красным), глюкоза (глюкозооксидазный метод), билирубин (с диазониевой солью сульфаниловой кислоты (метод Маллоя-Эвелина)), кетоны (реакция с нитропруссидом натрия и уксусной кислотой). Относительную плотность мочи определяли с помощью рефрактометра AMTAST VUR3T (AMTAST Inc., США). Уровень pH определяли с помощью универсальных индикаторных полосок (DF[®], Китай).

Микроскопическое исследование мочевого осадка не проводили в связи с отсутствием положительной реакции на «кровь». Был проведен количественный анализ определения белка с помощью анализатора микропланшетного CLARIOstar[®] (BMG LABTECH, Германия, чувствительность – 0,16 мг/мл).

Лишение корма. Животных лишали корма на 16 ч перед взятием образцов крови для измерения уровня глюкозы и эвтаназией. Доступ к воде не был ограничен на протяжении всего эксперимента.

Методы оценки гематологических показателей. Образцы крови собирали в пробирки с ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) в объеме 0,2 мл. В образцах цельной крови, полученных из хвостовой вены крыс, на гематологическом анализаторе Mythic 18 Vet (Orphee, Швейцария) определяли следующие параметры: количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество тромбоцитов, количество лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов.

Методы оценки биохимических показателей крови. Биохимические показатели крови определяли на биохимическом анализаторе Random Access A-25 (BioSystems, Испания) в сыворотке

крови с использованием реагентов фирмы BioSystems (Испания). Для исследования использовали кровь, которую отбирали в день эвтаназии из сердца в вакуумные пробирки для взятия проб крови (Improvacuter[®]) с активатором свертывания и гелем. Для получения сыворотки кровь центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Полученную сыворотку переносили во вторичные пробирки, которые затем загружали в анализатор. В образцах определяли следующие параметры: аламиновая трансаминаза (АЛТ), аспарагиновая трансаминаза (АСТ), мочевины, общий белок, креатинин, общий холестерин, альбумин, глобулин, отношение альбумины/глобулины (расчетные значения), триглицериды, общий билирубин, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, креатинкиназа.

Для измерения уровня глюкозы образцы крови отбирали путем пункции хвостовой вены. Определение уровня глюкозы в образовавшейся капле крови проводили с помощью глюкометра One Touch Select[®] Plus (LifeScan, США) и тест-полосок OneTouch Select[®] Plus (LifeScan, США).

Процедура спаривания. На 15 сут эксперимента к самцам крыс групп № 1–3 подсаживали интактных самок согласно схеме эксперимента, в соотношении самец : самка – 1 : 2. Также по достижении потомством экспериментальных животных возраста 10 недель самцы и самки одной группы от разных родителей были ссажены между собой в соотношении самец : самка – 1 : 2. Спустя 20–24 ч после подсадки самок извлекали из клетки для проверки на наличие спермы и/или вагинальной пробки. Наличие спермы определяли путем микроскопического экспресс-анализа нативных препаратов мазков-смыслов из влагалища самки. В случае обнаружения

сперматозоидов в мазке (и/или влагилицной пробки) у самки в первичной карте фиксировали дату начала беременности. В случае отсутствия сперматозоидов в мазке самку оставляли с самцом еще на сутки, после чего повторяли процедуру забора вагинального лаважа.

Эвтаназия. В соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза⁵ животных эвтаназировали с применением CO₂ с последующим обескровливанием полостей сердца (самцы) или перерезанием основных кровеносных сосудов (беременные самки). Данный вид эвтаназии животных сопровождается минимумом боли, страдания и дистресса и был проведен компетентными сотрудниками.

Патоморфологическое исследование. Макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов самцов и самок с последующей гистологической оценкой следующих органов: аорта, сердце, трахея, легкие с бронхами, тимус, слюнные железы, пищевод, желудок, двенадцатиперстная кишка, тонкий кишечник, подвздошная кишка, слепая кишка, толстый кишечник, поджелудочная железа, печень, селезенка, почки, мочевой пузырь, желчный пузырь, надпочечники, семенники, левый придаток семенника (эпидидимис), простата, семенные пузырьки, паховые лимфатические узлы, щитовидная и паращитовидная железы, головной мозг, спинной мозг, гипофиз, периферические нервы, глаза, Гардерова железа, кожа, кость с костным мозгом (бедренная кость с сохранением эпифиза), скелетные мышцы, органы с макроскопическими изменениями, обнаруженными при некропии, пейеровы бляшки, ткани бедренной мышцы (место введения животных групп № 5–7). Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч. После фиксирования органов в 10% растворе формалина производили выделение необходимых фрагментов ткани, которые были уложены в гистологические кассеты и промыты в проточной воде. Далее фрагменты тканей по общепринятой методике были обезвожены в спиртах восходящей концентрации и залиты в парафин. Затем изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином [18]. Гистологический анализ микропрепаратов проводили при помощи светооптического

микроскопа Accu-Score 3000 Series (Accu-Score, США). Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры ToupCam UCMS05100KPA и программного обеспечения ToupView 3.7.7892 (ToupTek, Россия).

Оценка протекания беременности. После проведения плановой эвтаназии самок на 20–21 сут беременности подсчитывали число желтых тел в яичниках, число мест имплантации в матке, число живых и погибших плодов. На основании полученных данных патоморфологического исследования рассчитывали предимплантационную смертность (эмбриотоксическое действие), под которой понимали разность между числом желтых тел в яичниках и числом мест имплантации в матке, а также постимплантационную смертность (фетотоксическое действие) как разность между числом мест имплантации в матке и числом живых плодов⁶.

Оценку эффективности оплодотворения осуществляли по индексу плодовитости (ИП), индексу беременности (ИБ) и оплодотворяющей способности самцов (ОС) для каждой группы экспериментальных животных согласно формулам (1), (2) и (3), приведенным ниже:

$$\text{ИП} = \frac{\text{Число оплодотворенных самок}}{\text{Число сажених самок}} \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{ИБ} = \frac{\text{Число беременных самок}}{\text{Число оплодотворенных самок}} \times 100\%, \quad (2)$$

$$\text{ОС} = \frac{\text{Число беременных самок}}{\text{Число сажених самок}} \times 100\%, \quad (3)$$

Оценка местной переносимости. Визуально оценивали макроскопические изменения тканей семенников (группы № 1–4) и мышц бедра (группы № 5–7) с последующей гистологической оценкой тканей, непосредственно контактирующих с исследуемым препаратом и контрольным веществом.

Оценка спермограммы. В ходе некропии у самцов крыс извлекали правый придаток (эпидидимис), отделяя его от брыжейки. Далее эпидидимис помещали на предметное стекло и надрезали обе его доли, после чего помещали в пробирку и заливали 3 мл фосфатно-солевого буфера. Затем проводили инкубацию при температуре +37 °С и 5% содержании CO₂ в течение

⁵ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.

⁶ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

15 мин в CO₂-инкубаторе лабораторном Shel Lab 3517-2 (Sheldon Manufacturing, США).

Исследование образцов спермы проводили согласно следующим методикам.

Подсчет сперматозоидов на предметном стекле. На предметное стекло наносили 10 мкл спермы после инкубации в фосфатно-солевом буфере, каплю накрывали покровным стеклом (22×22 мм). Число сперматозоидов подсчитывали в трех полях зрения микроскопа (×400): полученное усредненное значение считали равным концентрации сперматозоидов в 1 мл эякулята (×10⁶/мл)⁷.

Определение подвижности сперматозоидов проводили в этом же препарате. Подсчитывали число сперматозоидов, совершающих активные поступательные и колебательные движения, и число неподвижных сперматозоидов. Полученный результат выражали в процентах от общего числа сперматозоидов и заносили в первичные карты.

Проведение гипоосмотического теста. Тест основан на набухании живых сперматозоидов, помещенных в гипотонический раствор. Мертвые сперматозоиды при этом не набухают. Для проведения теста 7 мкл спермы смешивали с 7 мкл гипоосмотического раствора (0,0368 г цитрата натрия и 0,0676 г фруктозы в 50 мл дистиллированной воды) на предметном стекле, накрывали покровным стеклом и выдерживали не более 30 мин при комнатной температуре. Полученный препарат исследовали под микроскопом (×400): подсчитывали число видоизмененных сперматозоидов с загнутыми хвостами (то есть живых) в виде четких «птичек» V (незрелых) и число сперматозоидов, не изменивших свою форму (мертвых). Полученные данные выражали в процентах от общего числа сперматозоидов.

Наблюдение за потомством начинали в пределах 24 ч после рождения. Оценка включала следующие типы исследований: 1) общие наблюдения за физическим развитием потомства; 2) изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания самкой; 3) изучение двигательного и эмоционального поведения и способности к тонкой координации движений у потомства после окончания вскармливания.

Оценка физического развития потомства. С 2 сут после рождения визуально фиксировали

день отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз, опускания семенников у самцов или открытия влагалища у самок.

Изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов. Реакцию детенышей регистрировали у части помета по следующим методикам: «переворачивание на плоскости», «отрицательный геотаксис», «избегание обрыва», «маятниковый рефлекс», тест «открытое поле» (модифицированный для крысят), «избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом», «мышечная сила», «переворачивание в свободном падении». Для оценки эмоционально-двигательного поведения и способности к тонкой координации движений у детенышей в возрасте 40–45 сут использовали тест «открытое поле»⁸.

Анализ данных. Для всех данных была применена описательная статистика: данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения были рассчитаны среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), которые вместе со значением n (количество значений в выборке) представлены в итоговых расчетах. В случае несоответствия данных закону нормального распределения были рассчитаны медиана (Me) и квартильный размах ($Q_1; Q_3$).

Межгрупповые различия были проанализированы параметрическими или непараметрическими методами в зависимости от типа распределения.

Для оценки данных с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и дисперсионный анализ с повторными измерениями: зависимые данные предварительно были проверены на сферичность дисперсий с помощью теста Моучли. В случае невыполнения предположения о сферичности дисперсий применяли дисперсионный анализ с эpsilon-корректировкой методом Гейссер–Гринхаус. Последующее межгрупповое сравнение осуществляли с использованием критерия Тьюки с поправкой на неодинаковый объем выборок. Независимые данные были проверены на гомогенность дисперсий с помощью критерия Левене. В случае невыполнения предположения о гомогенности дисперсий был применен дисперсионный анализ с поправкой Велч. Последующее межгрупповое

⁷ WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO; 2010. P. 271.

⁸ Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

сравнение осуществляли с использованием критерия Тьюки. При проведении анализа данных неодинаковых по объему выборок использовали аналогичный критерий с поправкой на неодинаковый объем выборок.

Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением средних рангов. Для анализа частоты встречаемости был применен точный критерий Фишера. Различия были определены при уровне значимости 0,05. Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение

Случаев гибели и интоксикации животных после введения препарата на основе секрета МСК не зарегистрировано. Регистрировали статистически значимое увеличение массы тела у самцов на 21 сут эксперимента относительно данных на 1 сут, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния препарата на динамику массы тела животных.

Препарат на основе секрета МСК при однократном введении под белочную оболочку семенника в исследуемых дозах не оказал клинически значимого влияния на показатели индивидуального поведения экспериментальных животных на протяжении всего эксперимента. При многократном внутримышечном введении тестируемого препарата в исследуемых дозах у части животных на 38 сут эксперимента наблюдали тенденцию к снижению количества посещенных квадратов в тесте «Открытое поле», которое достигло статистической значимости при применении препарата в дозе 25 УЕ. У всех экспериментальных животных показатели потребления корма и воды соответствовали показателям животных интактной группы.

Влияние препарата на показатели общего анализа мочи. Влияния препарата на основе секрета МСК при однократном введении под белочную оболочку семенника и многократном внутримышечном введении в исследованных дозах на показатели общего анализа мочи экспериментальных животных не обнаружено.

Влияние препарата на гематологические и биохимические показатели крови. Анализ данных показал, что на 41 сут эксперимента в группе животных, которым тестируемый препарат вводили однократно под белочную оболочку семенника

в дозе 15 УЕ, был статистически значимо снижен показатель процентного содержания гранулоцитов и повышен показатель процентного содержания лимфоцитов в сравнении с животными интактной группы. Значения данных показателей находились в пределах внутрилабораторных норм для данного вида животных: процентное количество лимфоцитов – 59–87%, процентное количество гранулоцитов – 13,5–37,6%. Учитывая, что наблюдаемые изменения не имели дозозависимого характера, найденные отличия признаны клинически незначимыми [19, 20].

На 14 сут выявлена обратимая тенденция к повышению активности щелочной фосфатазы (значимо повышается на 14 день и снижается на 42 день эксперимента) в группе животных, получавших тестируемый препарат в дозе 15 УЕ, при сравнении с результатами интактных животных. Уровень активности щелочной фосфатазы у крыс, получавших тестируемый препарат в дозе 25 УЕ, на 24% превышал верхний предел внутрилабораторных норм для данного вида животного (79–287 Ед/л). Клинически значимого влияния введения препарата и контрольного вещества на остальные гематологические и биохимические показатели не выявлено.

Результаты патоморфологического исследования

Патолого-анатомическое исследование на 14 сут эксперимента. В группе, получавшей контрольное вещество DMEM-LG внутримышечно, у одного самца крысы правый семенник был уменьшен в объеме, дряблой консистенции (рис. 1). У всех остальных животных во всех экспериментальных группах макроскопических изменений в исследованных органах обнаружено не было.

Гистологическое исследование на 14 сут эксперимента. В группе № 2, в которой животным вводили препарат однократно в дозе 15 УЕ под белочную оболочку семенника, у одного самца крысы обнаружены очаги некроза гепатоцитов с мононуклеарной (преимущественно лимфоцитарной) воспалительной инфильтрацией (рис. 2А). У одного самца были обнаружены признаки нефропатии (детализацию наблюдаемых изменений проводили), однако это не повлияло на биохимические показатели мочи (рис. 2В).

В группе животных, которые получили контрольное вещество внутримышечно в количестве 0,8 мл/кг, у одного самца крысы также обнаружены очаги некроза гепатоцитов с очаговой мононуклеарной (преимущественно лимфоцитарной) воспалительной инфильтрацией.



Рис. 1. Вскрытая брюшная полость самца крысы, семенники выведены за пределы мошонки: черная стрелка – уменьшенный правый семенник; синяя стрелка – нормальный семенник

Fig. 1. Dissected abdomen of a male rat with the testes brought out of the scrotum; the black arrow indicates the reduced right testis, and the blue arrow indicates the normal left one

У одного самца наблюдались атрофические процессы эпителия отдельных семенных канальцев (рис. 2С).

Патологоанатомическое исследование по окончании периода отсроченного наблюдения (42 сут эксперимента). У животных всех экспериментальных групп в исследованных органах макроскопических изменений не было обнаружено.

Гистологическое исследование по окончании периода отсроченного наблюдения (42 сут эксперимента). У одного самца крысы в группе № 3, получившего тестируемый препарат в дозе 25 УЕ однократно путем введения под белочную оболочку семенника, была обнаружена очаговая мононуклеарная (преимущественно лимфоцитарная) воспалительная инфильтрация в предстательной железе (рис. 3). У всех остальных животных во всех группах гистологическое строение исследуемых органов соответствовало норме.

На основании того что патологические изменения не обладали дозозависимым характером и встречались у единичных животных, которым вводили как тестируемый препарат, так

и контрольное вещество, обнаруженные патоморфологические изменения можно отнести к спонтанным и не связанным с введением тестируемого препарата [19, 20].

Таким образом, в результате патоморфологического исследования однократное введение под белочную оболочку семенника и многократное внутримышечное введение препарата на основе секрета МСК в исследуемых дозах не оказали клинически значимого влияния на морфологическое строение внутренних органов самцов крыс.

Результаты оценки местной переносимости

Однократное введение. У всех животных при осмотре семенников макроскопических изменений не было обнаружено.

После однократного введения под белочную оболочку семенника тестируемого препарата в обеих исследуемых дозах и контрольного вещества патологические изменения на 14 сут эксперимента выражались атрофией эпителия (70% животных через 14 сут, 55% в группе отсроченного наблюдения) и застоем спермы в отдельных семенных канальцах (у 70% животных). Также у некоторых животных дополнительно наблюдали дегенеративные изменения эпителия с деформированными клетками Сертоли и мелкими очагами обызвествления (рис. 4). Дегенеративные изменения сперматогенного эпителия проявлялись в виде дезорганизации слоев, вакуолизации половых клеток. При этом в просвете канальцев вне аллюминального компартмента отмечали появление гигантских многоядерных клеток и мелкие очаги обызвествления. Также определялись деформированные, вакуолизованные и утратившие свою пирамидальную форму клетки Сертоли. Поражения затрагивали лишь единичные семенные канальцы. После однократного введения тестируемого препарата в дозе 15 УЕ встречаемость атрофии эпителия и застоя спермы в канальцах была статистически значимо выше в сравнении с интактными животными.

На 42 сут эксперимента по окончании периода отсроченного наблюдения животные, получившие тестируемый препарат в исследуемых дозах или контрольное вещество однократно под белочную оболочку семенника, имели аналогичные патологические изменения в единичных семенных канальцах (за исключением дегенеративных изменений сперматогенного эпителия). Анализ данных показал, что на 42 сут

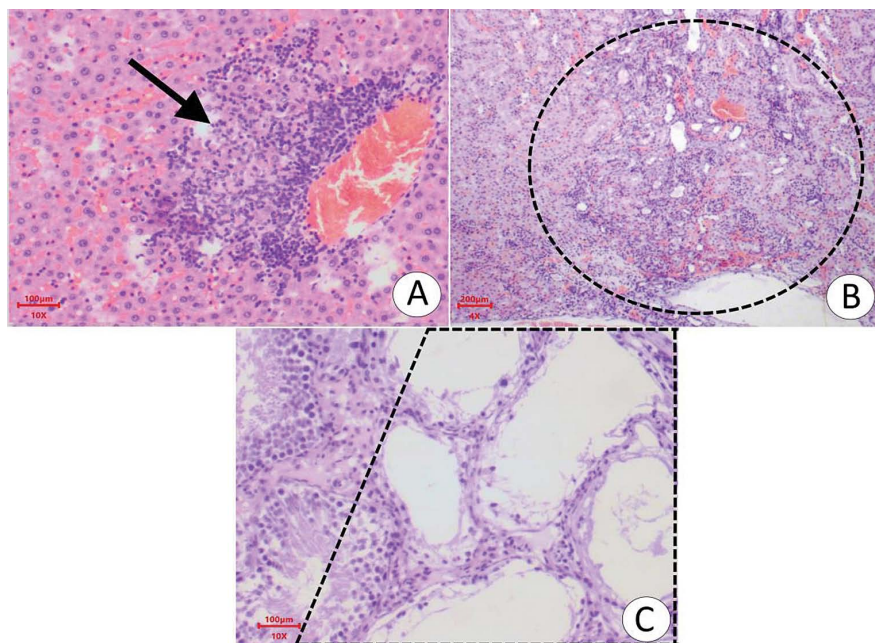


Рис. 2. Срезы тканей самцов крыс, 14 сут эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. (A) срез печени: очаг некроза гепатоцитов с мононуклеарной, преимущественно лимфоцитарной воспалительной инфильтрацией (стрелка). (B) срез почки: нефропатия (очерченная область). (C) срез семенника: атрофия сперматогенного эпителия отдельных семенных канальцев (очерченная область)

Fig. 2. Sections of tissues of male rats on day 14. Haematoxylin and eosin staining. (A) Liver section with an arrow indicating a focus of hepatocellular necrosis with mononuclear, predominantly lymphocytic inflammatory infiltration. (B) Kidney section with a circle indicating nephropathy. (C) Testicular section with a rectangle indicating epithelial atrophy of individual seminiferous tubules

эксперимента встречаемость признаков атрофии эпителия и застоя спермы в канальцах была статистически значимо выше у животных, получавших тестируемый препарат в дозе 25 УЕ или контрольное вещество, по сравнению с интактными животными.

Данные о патоморфологических изменениях в месте введения при однократном применении препарата на основе секретомы МСК в дозах 15 и 25 УЕ под белочную оболочку семенника на всем протяжении исследования объединены в *таблице 4*.

Таким образом, препарат на основе секретомы МСК в исследуемых дозах и контрольное вещество DMEM-LG при однократном введении под белочную оболочку семенника оказывали умеренное местнораздражающее действие, которое сохранялось на протяжении 42 сут (периода отсроченного наблюдения). При этом патологические изменения затрагивали единичные семенные канальцы. Выявленные на 14 сут эксперимента патологические изменения в семенниках после введения тестируемого препарата в дозе 15 УЕ были обнаружены у всех самцов группы, в то время как на 42 сут их частота была

ниже. Максимальные отклонения после введения тестируемого препарата в дозе 25 УЕ наблюдали в конце эксперимента (42 сут).

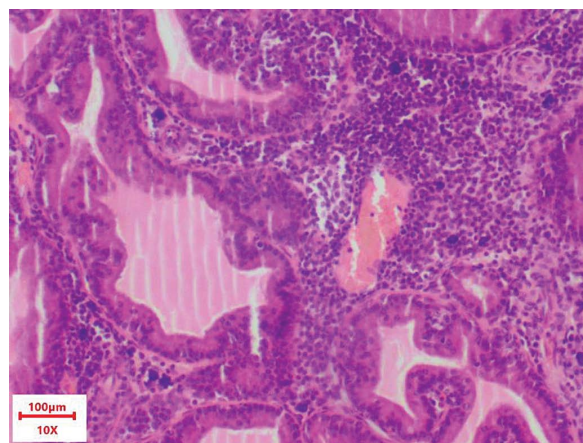


Рис. 3. Срез предстательной железы самца крысы. Очаговая мононуклеарная (преимущественно лимфоцитарная) воспалительная инфильтрация предстательной железы. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 3. Section of the prostate gland of a male rat. Focal mononuclear, predominantly lymphocytic, inflammatory infiltration. Haematoxylin and eosin staining.

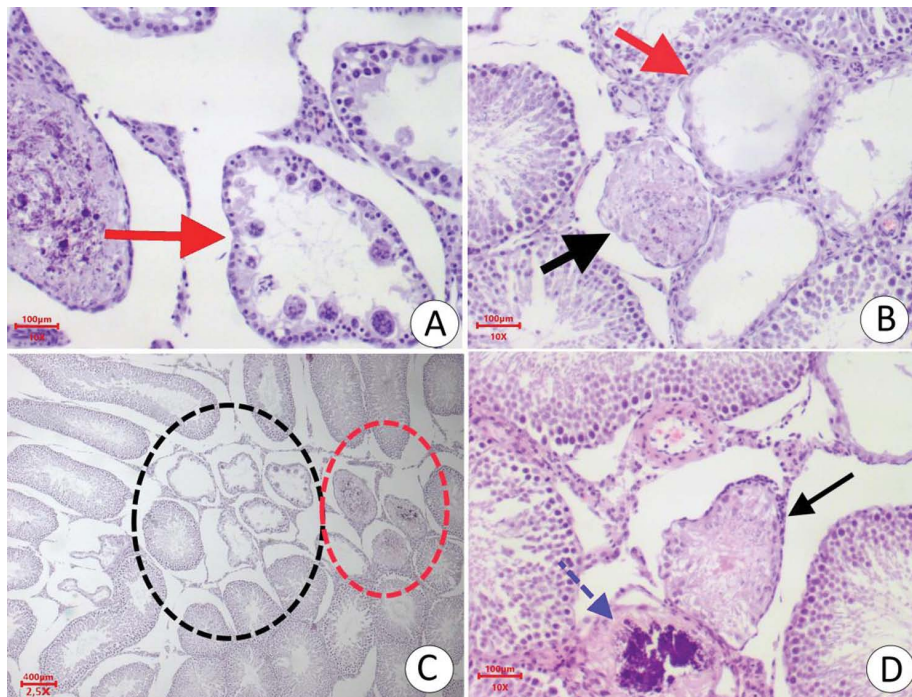


Рис. 4. Срезы семенников самцов крыс, 14 сут эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. (А) красной стрелкой отмечен каналец с дегенеративными изменениями эпителия, с деформированными клетками Сертоли. (В) красной стрелкой отмечен каналец с атрофическими изменениями эпителия, черной — каналец с застоем спермы. (С) Черным овалом отмечены каналцы с дегенеративными изменениями эпителия, с деформированными клетками Сертоли, красным — каналца с застоем спермы и с мелкими очагами обызвествления. (D) черной стрелкой отмечен каналец с атрофическими изменениями эпителия, синей — обызвествление каналца.

Fig. 4. Sections of testes of male rats on day 14. Haematoxylin and eosin staining. (A) The red arrow marks the tubule with degenerative changes in the epithelium, with deformed Sertoli cells. (B) The red arrow shows the tubule with atrophic changes in the epithelium, and the black arrow indicates the tubule with sperm stasis. (C) The black oval highlights tubules with degenerative changes in the epithelium, with deformed Sertoli cells; the red oval indicates tubules with sperm stasis and small foci of calcification. (D) The black arrow points to the tubule with atrophic changes in the epithelium, and the blue dashed arrow demonstrates tubular calcification.

Наблюдаемые поражения единичных семенных каналцев встречались у животных, которым вводили как тестируемый препарат в обеих исследуемых дозах, так и контрольное вещество DMEM-LG, которое входит в состав тестируемого препарата. В связи с этим выявленные изменения, вероятно, связаны с процедурой введения или действием отдельных компонентов среды роста DMEM-LG.

Многократное введение. При осмотре места введения (мышцы бедра) и окружающих тканей у всех животных макроскопических изменений не было обнаружено. По окончании многократного введения (на 14 сут эксперимента) и периода и отсроченного наблюдения (на 42 сут эксперимента) у всех выведенных из эксперимента животных гистологическое строение мышцы бедра соответствовало норме.

Влияние тестируемого препарата при исследуемых способах введения на показатели спермограммы и генеративную функцию экспериментальных животных и их потомства

Препарат на основе секрета МСК не оказал влияния на показатели спермограммы экспериментальных животных. Вместе с тем, учитывая, что препарат планируется применять при бесплодии, при проведении комплексного токсикологического исследования оценивали влияние препарата на основе секрета МСК на генеративную функцию при однократном введении. Установлено, что во всех экспериментальных группах, независимо от пути введения, наблюдали факт копуляции половых партнеров. Наибольшее число случаев копуляции во всех экспериментальных группах было зафиксировано

Таблица 4. Патоморфологические изменения в семенниках крыс после однократного введения под белочную оболочку семенника препарата на основе секретомезенхимных стромальных клеток или контрольного вещества DMEM-LG

Table 4. Pathology findings in rat testes following a single subtunical dose of the mesenchymal stromal cell secretome-based medicinal product or the DMEM-LG control

Характеристика изменений в семенниках <i>Characteristics of testicular changes</i>	Количество животных в группе / количество животных с изменениями в семенниках <i>Animals per group / animals with testicular changes</i>			
	Интактные животные <i>Intact animals</i>	При введении препарата <i>With medicinal product</i>		При введении DMEM-LG <i>With DMEM-LG</i>
		15 UE / 15 RU	25 UE / 25 RU	
14 сут после введения препарата / Post-injection day 14				
Дегенеративные изменения эпителия канальцев <i>Degenerative changes in the tubular epithelium</i>	0/5	1/5	2/5	1/5
Атрофия эпителия канальцев <i>Atrophy of the tubular epithelium</i>	0/5	5/5	2/5	1/5
Застой спермы <i>Sperm stasis</i>	0/5	5/5 ^a	2/5	3/5
Очаги обызвествления канальцев <i>Foci of calcification in the tubules</i>	0/5	1/5	1/5	2/5
42 сут после введения препарата / Post-injection day 42				
Застой спермы <i>Sperm stasis</i>	0/10	4/10	6/10 ^a	4/5 ^a
Атрофия эпителия канальцев <i>Atrophy of the tubular epithelium</i>	0/10	4/10	7/10 ^a	4/5 ^a
Очаговое обызвествление канальцев <i>Focal calcification of the tubules</i>	0/10	4/10	7/10 ^a	3/5 ^a

Примечание. UE – условная единица; DMEM-LG – среда DMEM с низким содержанием глюкозы.

^a Статистически значимое отличие от животных интактной группы, точный критерий Фишера, уровень значимости $p < 0,05$.

Note. RU, relative units; DMEM-LG, low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium.

^a Statistically significant difference from the animals of the intact group, Fisher's test, $p < 0.05$.

на следующий день после подсадки самок к самцам. Беременность самок во всех группах протекала нормально. В процессе эвтаназии в каждой экспериментальной группе было подсчитано число желтых тел в яичниках, число мест имплантации в матке, число живых и погибших плодов, рассчитаны значения пред- и постимплантационной смертности. Статистически значимых различий между группами не наблюдали. Уровень смертности потомства за весь период наблюдения (от рождения до полуторамесячного возраста) во всех группах не превышал 2,3% и статистически значимо не отличался между группами. У потомства оценивали такие показатели физического развития, как масса тела и ее динамика, сроки проявления физических признаков, таких как отлипание ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, начало полового созревания (опускание семенников у самцов или открытие влагалища у самок).

Данные параметры были синхронны в пометах всех экспериментальных групп.

Таким образом, однократное введение под белочную оболочку семенника тестируемого препарата в исследуемых дозах самцам крыс не повлияло на протекание беременности у спаренных с ними самок и не оказало негативного воздействия на пренатальное и постнатальное развитие их потомства.

На следующем этапе исследования изучали аналогичные параметры генеративной функции потомства. Анализ данных показал, что введение препарата на основе секретомезенхимных стромальных клеток не повлияло на протекание беременности и на пренатальное и постнатальное развитие эмбрионов у потомства экспериментальных животных.

Выводы

Анализ результатов изучения токсических свойств и местной переносимости препарата на основе секретомезенхимных стромальных клеток при однократном

введении под белочную оболочку семенника в дозах 15 и 25 УЕ и при многократном внутримышечном введении в дозах 15 и 25 УЕ самцам крыс линии Wistar показал следующее.

1. Тестируемый препарат при применении в исследуемых дозах и путях введения не оказал клинически значимого негативного влияния на общее состояние экспериментальных животных, динамику массы тела, потребление корма и воды, показатели индивидуального поведения, общего анализа мочи, гематологии. Гибель животных на протяжении всего эксперимента отсутствовала. У животных, которым многократно внутримышечно вводили тестируемый препарат в обеих исследуемых дозах, наблюдали обратимое увеличение активности щелочной фосфатазы. При применении препарата в дозе 25 УЕ изменения были статистически значимыми.

2. При однократном введении под белочную оболочку семенника изучаемый препарат в исследуемых дозах и контрольное вещество оказали умеренное местнораздражающее действие, которое выражалось в атрофии эпителия, застое спермы в отдельных семенных канальцах, у некоторых животных в сочетании с дегенеративными изменениями эпителия с деформированными клетками Сертоли и мелкими очагами обызвествления. Патологические отклонения обнаруживались в единичных семенных канальцах. При трехкратном внутримышечном введении изучаемого препарата в обеих дозах и контрольного вещества патологических изменений в месте введения не обнаружено.

3. Установлено, что органом-мишенью токсического действия препарата на основе секрета МСК являются семенники. Выявленные патологические изменения в тканях семенников сохранялись на протяжении периода отсроченного наблюдения (42 сут) после однократного введения.

4. Препарат на основе секрета МСК при однократном и многократном введении не оказал токсического влияния на показатели спермограммы.

5. По результатам оценки местной переносимости тестируемый препарат при введении под белочную оболочку семенника в исследуемых дозах вызывает необратимые патологические изменения в единичных семенных канальцах. Поскольку патологические изменения встречались в группах с введением как тестируемого препарата, так и контрольного вещества, которые входят в состав тестируемого препарата, выявленные отклонения, вероятно, связаны с процедурой введения или действием отдельных компонентов среды роста DMEM-LG.

6. Препарат на основе секрета МСК при однократном локальном введении не влияет на протекание беременности самок, пренатальное развитие потомства, а также на генеративную функцию потомства.

Таким образом, тестируемый препарат при рассматриваемом пути введения обладает хорошей переносимостью: существенных патоморфологических изменений в органах и тканях экспериментальных животных не обнаружено.

Литература / References

1. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, et al. Male infertility. *Lancet*. 2021;397(10271):319–33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
2. Sagaradze G, Monakova A, Basalova N, Popov V, Balabanyan V, Efimenko A. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models. *Biomed J*. 2022;45(4):607–14. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.01.015>
3. Kharazi U, Badalzadeh R. A review on the stem cell therapy and an introduction to exosomes as a new tool in reproductive medicine. *Reprod Biol*. 2020;20(4):447–59. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.002>
4. Chen G, Kathrins M, Ohlander S, Niederberger C. Medical management of male infertility: now and future. *Curr Opin Urol*. 2023;33(1):10–5. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000001056>
5. Ciccocioppo R, Cantore A, Chaimov D, Orlando G. Regenerative medicine: the red planet for clinicians. *Intern Emerg Med*. 2019;14(6):911–21. <https://doi.org/10.1007/s11739-019-02126-z>
6. Vieujean S, Loly JP, Boutaffala L, Meunier P, Renaers C, Briquet A, et al. Mesenchymal stem cell injection in Crohn's disease strictures: a phase I-II clinical study. *J Crohns Colitis*. 2022;16(3):506–10. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab154>
7. Chahal J, Gómez-Aristizábal A, Shestopaloff K, Bhatt S, Chaboureaux A, Fazio A, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cell treatment in patients with osteoarthritis results in overall improvement in pain and symptoms and reduces synovial inflammation. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(8):746–57. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0183>
8. Petrou P, Kassis I, Levin N, Paul F, Backner Y, Benoliel T, et al. Beneficial effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation in active progressive multiple sclerosis. *Brain*. 2020;143(12):3574–88.

- <https://doi.org/10.1093/brain/awaa333>
9. Monakova A, Sagaradze G, Basalova N, Popov V, Balabanyan V, Efimenko A. Novel potency assay for MSC secretome-based treatment of idiopathic male infertility employed Leydig cells and revealed vascular endothelial growth factor as a promising potency marker. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9414. <https://doi.org/10.3390/ijms23169414>
 10. Sagaradze GD, Basalova NA, Efimenko AY, Tkachuk VA. Mesenchymal stromal cells as critical contributors to tissue regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:576176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576176>
 11. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:221. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0209-8>
 12. Teixeira FG, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges. *Neural Regen Res*. 2020;15(1):75–7. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264455>
 13. Liu J, Ding Y, Liu Z, Liang X. Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:258. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>
 14. Zhuang WZ, Lin YH, Su LJ, Wu MS, Jeng HY, Chang HC, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications. *J Biomed Sci*. 2021;28(1):28. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00725-7>
 15. Sagaradze G, Basalova N, Kirpatovsky V, Ohobotov D, Nimiritsky P, Grigorieva O, et al. A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):342. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1479-3>
 16. Sagaradze GD, Basalova NA, Kirpatovsky VI, Ohobotov DA, Grigorieva OA, Balabanyan VY, et al. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1428–36. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.174>
 17. Пошивалов ВП. *Фармакоэтология*. СПб: Сору-Service; 1997. Poshivalov VP. *Pharmacoeology*. St. Petersburg: Сору-Service; 1997 (In Russ.).
 18. 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, Guschin YaA. Features histological processing of organs and tissues of laboratory animals. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;(2):103–9 (In Russ.). EDN: [SFLHTJ](https://doi.org/10.1016/j.vrtph.2005.05.004)
 19. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, eds. *The laboratory rat*. Elsevier; 2005. P. 929.
 20. Dorato MA, Engelhardt JA. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2005;42(3):265–74. <https://doi.org/10.1016/j.vrtph.2005.05.004>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.О. Монакова – разработка дизайна экспериментального исследования, контроль основных точек экспериментов, написание текста рукописи; Г.Д. Сagaradze – анализ и обобщение данных литературы, разработка дизайна экспериментального исследования, планирование исследования; В.Ю. Балабанын – разработка методологии исследования, разработка дизайна экспериментального исследования, редактирование текста рукописи; Н.А. Басалова – подготовка образцов препарата, редактирование текста рукописи; А.А. Матичина – проведение экспериментов на животных, выполнение лабораторных исследований, анализ данных; А.А. Матичин – проведение экспериментов на животных, выполнение лабораторных исследований, анализ данных, редактирование текста рукописи; К.Л. Крышень – разработка дизайна экспериментального исследования; В.С. Попов – разработка дизайна и методов работы с животными; Ж.А. Акopian – идея исследования; А.Ю. Ефименко – идея, формулировка целей и задач, планирование исследования, критический пересмотр текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Anna O. Monakova* designed experiments, controlled the main points of the experiments, and drafted the manuscript. *Georgy D. Sagaradze* analysed and consolidated literature data, designed experiments, and planned the study. *Vadim Yu. Balabanyan* developed the study methodology, designed experiments, planned the study, and edited the manuscript. *Nataliya A. Basalova* carried out sample preparation and edited the manuscript. *Alena A. Matichina* performed animal experiments and laboratory analyses and analysed data. *Aleksandr A. Matichin* performed animal experiments and laboratory analyses, analysed data, and edited the manuscript. *Kirill L. Kryshen* designed experiments. *Vladimir S. Popov* designed experiments and animal handling methods. *Zhanna A. Akopyan* elaborated the study idea. *Anastasia Yu. Efimenko* elaborated the study idea, formulated the aim and objectives, planned the study, and critically revised the manuscript.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», протоколы заседаний БЭК от 07.12.2020, № 1.67/20, от 07.12.2020 № 2.67/20.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Ethics approval. The study was approved by the Bioethics Committee of the research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY” (Approvals Nos. 1.67/20 and 2.67/20 of 07.12.2020).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project within the State Assignment of the Lomonosov Moscow State University Medical Research and Educational Center.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Монакова Анна Олеговна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7123-6374>
monakova-anya@mail.ru

Сагарадзе Георгий Дмитриевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2551-5118>
georgysagaradze@gmail.com

Балабаньян Вадим Юрьевич, д-р фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>
bal.pharm@mail.ru

Басалова Наталия Андреевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>
natalia_ba@mail.ru

Матичина Алена Алексеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2996-0748>
matichina.aa@doclinika.ru

Матичин Александр Алексеевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-4942>
matichin.aa@doclinika.ru

Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Попов Владимир Сергеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5039-7152>
galiantus@gmail.com

Акопян Жанна Алексеевна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0989-7825>
zhanna.fbm@gmail.com

Ефименко Анастасия Юрьевна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>
efimenkoay@my.msu.ru

Anna O. Monakova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7123-6374>
monakova-anya@mail.ru

Georgy D. Sagaradze, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2551-5118>
georgysagaradze@gmail.com

Vadim Yu. Balabanyan, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>
bal.pharm@mail.ru

Nataliya A. Basalova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>
natalia_ba@mail.ru

Alena A. Matichina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2996-0748>
matichina.aa@doclinika.ru

Aleksandr A. Matichin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-4942>
matichin.aa@doclinika.ru

Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Vladimir S. Popov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5039-7152>
galiantus@gmail.com

Zhanna A. Akopyan, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0989-7825>
zhanna.fbm@gmail.com

Anastasia Yu. Efimenko, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>
efimenkoay@my.msu.ru

Поступила 27.03.2023

После доработки 02.06.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Online first 24.08.2023

Received 27 March 2023

Revised 2 June 2023

Accepted 6 June 2023

Online first 24 August 2023