

УДК 615.256.52 : 615.099-055

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА СТЕРОИДНОЙ СТРУКТУРЫ ГЕСТОБУТАНОИЛ ДЛЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ГЕСТАГЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ НА РАЗВИТИЕ ПЛОДА И ПОТОМСТВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ

Н.И. Шеина¹, В.А. Паршин¹,
Т.А. Федотчева^{1,2},
Н.Л. Шимановский¹

¹ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», 117997, г. Москва, Российская Федерация
²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 117216, г. Москва, Российская Федерация

Проведено изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития при внутрижелудочном введении нового лекарственного средства Гестобутаноил в 2-х дозах (в эквитерапевтической и 10 раз выше).

Установлено, что введение гестагена Гестобутаноил в 2-х дозах не оказывало влияния на массу тела беременных животных, которая продолжала прогрессивно увеличиваться в течение беременности. Выявлена дозовая зависимость в проявлении эмбриотропного эффекта гестагена. Введение гестагена в дозе 0.25 мг/кг (расчетная эквитерапевтическая доза) не оказывало неблагоприятного действия на развитие эмбриона и плода крыс. Воздействие гестагена в дозе 2.5 мг/кг (10 эквитерапевтических доз) оказывало негативное действие на течение беременности, которое проявлялось статистически значимым увеличением предимплантационной гибели и общей эмбриональной смертности, а также статистически значимым снижением количества плодов.

Показано, внутрижелудочное введение лекарственной формы Гестобутаноил в дозах 0.25 и 2.5 мг/кг самкам крыс с 6-го по 19-ый дни беременности не оказывало негативного влияния на раннее развитие потомства первого поколения (постнатальная смертность, динамика массы тела, развитие сенсорно-двигательных рефлексов крысят).

Ключевые слова: гестаген, Гестобутаноил, таблетки, крысы, беременность, эмбриотоксичность, потомство.

Введение. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств в соответствии с современными требованиями к их безопасности, утвержденными Министерством здравоохранения РФ, предусматривает оценку репродуктивной токсичности на экспериментальных животных. В частности, для нового разрабатываемого средства, гестагена Гестобутаноила, предназначенного для гормональной заместительной терапии гестагенной недостаточности, особенно важно оценить его действие на развитие плода и потомства, так как лекарственное средство

планируется применять для женщин с целью сохранения беременности, лечения эндометриоза и контрацепции.

Несмотря на то, что ни одно из неклинических исследований, проведенных на различных видах млекопитающих (мыши, крысы, кролики, морские свинки, лошади, приматы), не гарантирует эквивалентности токсического действия на людях, оценка эмбриотоксичности и тератогенности новых лекарственных средств на самках крыс является обязательной, так как самки крыс являются наиболее чувствительной моделью живот-

Шеина Наталья Ивановна (Sheina Natalya Ivanovna), доктор биологических наук, профессор кафедры гигиены ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, ni_sheina@mail.ru

Паршин Валерий Александрович (Parshin Valeri Alexandrovich), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ молекулярной фармакологии ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, vparshin@mail.ru

Федотчева Татьяна Александровна (Fedotcheva Tatiana Alexandrovna), доктор медицинских наук, главный научный сотрудник НИЛ молекулярной фармакологии ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, tfedotcheva@mail.ru

Шимановский Николай Львович (Shimanovsky Nikolai Lvovich), член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, заведующий НИЛ молекулярной фармакологии ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, shimannn@yandex.ru

ных для изучения данных видов токсичности [1].

Большинство лекарственных средств в той или иной мере обладают эмбриотоксичностью. Согласно статистическим данным, включающим все разрешенные FDA препараты за 2016-2017 годы, более 89% новых лекарственных средств (не считая противоопухолевых), оказывают токсические эффекты на эмбриональное развитие и плод, выявленные в доклинических исследованиях в дозах, превышающих терапевтическую для человека даже менее чем в 25 раз [2].

Стероиды с гестагеной активностью нетоксичны. Для гестагенов мегестрола ацетата, медроксипрогестерона ацетата (МПА), терапевтическая доза может достигать несколько граммов в день на человека [3]. При этом некоторым гестагенам при определенных дозах свойственно эмбриотоксическое действие. Например, однократное внутримышечное введение крысам МПА в дозах 0,3, 10, или 30 мг/кг на 6-ой день беременности вызвало уменьшение в весе крысят в большой дозе и увеличение среднего количества резорбций в помёте во всех группах, приведшее к уменьшению количества живых крысят в помёте. Однако доказательств тератогенного эффекта у выживших крысят не получено. Введение препарата в дозах 10 и 30 мг/кг внутримышечно крольчихам на 6-й день беременности привело к дозо-зависимому увеличению числа мертвых и мацерированных крольчат и более низкому весу среди живых особей в помёте. В обеих группах с препаратом было отмечено значительное увеличение случаев «волчьей пасти» [4]. В настоящее время препарат МПА – Депопровера применяется в качестве контрацептивного средства как в США, так и в Европе [5].

При исследовании репродуктивной токсичности другого гестагена – гидроксипрогестерона капроата (ГПЦ) на крысах во время трех фаз развития эмбриона-плода: в течение периода развития яичника (RP1, дни 8, 14 и 20), после имплантации эмбриона (TP, дни 6 12 и 18), и, в соответствии с началом приема препарата на 16-й неделе или позже у людей, после формирования гонад, включая дифференцировку яичек (RP2, день 17) даже в максимальной дозе 150 мг/кг (в 30 раз превышающей терапевтическую) у потомства F (1) и F (2) не было выявлено каких-либо отклонений в поведенческих реакциях и в параметрах оценки развития. Это исследование подтверждает отсутствие репродуктивной токсичности и тератогенности ГПЦ [6].

Наиболее близкий по химической структуре к Гестобутаноилу гестаген мегестрола ацетат (МА) у крыс в дозе, 0,02-кратной от рекомендуемой клинической дозы (13,3 мг/ кг/сут) снижал репродуктивную способность самцов первого по-

мета, однако, данных об эмбриотоксическом действии на самок первого помета нет [3].

Гестаген номегестрол, активно использующийся в настоящее время в Европе и Австралии как в качестве контрацептивного средства, так и в гормонально-заместительной терапии в терапевтической дозе 2,5 мг/кг, также не вызывает токсического действия на животных и человека даже в дозе, в 40 раз превышающей эквивалентную терапевтическую дозу (ЭТД) [7]. Номегестрол не проявляет генотоксичности на животных [8].

Таким образом, сегодня имеются сведения об эмбриотоксическом действии некоторых гестагенов. Поэтому для вновь создаваемых гестагенов необходимо изучать возможность их эмбриотоксического действия. Разрабатываемый в ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова новый гестаген Гестобутаноил 0,002г в форме таблеток [9], относится к 4 классу малотоксичных веществ. DL₅₀ на крысах и мышах превышает 5 г/кг, при ЭТД равна 0,25 мг/кг.

Цель исследования: исследовать влияние препарата Гестобутаноил на развитие эмбриона, плода и потомства F₁ при введении крысам в течение беременности в рамках доклинического исследования инновационного лекарственного средства, разработанного в РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Материалы и методы исследования. Дозы препарата Гестобутаноил для введения готовили посредством растирания таблеток 0,002 г активной субстанции в ступке. В качестве дисперсионной среды использовали 1% водный раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) с добавлением Твин-80 в качестве эмульгатора. Приготовленную суспензию лекарственной формы (ЛФ) Гестобутаноил вводили животным внутривентриально с помощью шприца, снабженного металлическим атравматическим зондом. При этом готовили такую консистенцию суспензии, которая была бы проходима через желудочный зонд. Контролем служила суспензия вспомогательных веществ в дисперсионной среде в том же весовом соотношении, что и в готовой лекарственной форме. Общий объем суспензии составил от 1,0 до 2,0 мл на одно животное.

При выборе доз препарата руководствовались «Методическими рекомендациями по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств» [10]. Были выбраны 2 дозы по активному веществу: 0,25 мг/кг (расчетная эквитерапевтическая доза, РЭТД) и в 10 раз выше РЭТД – 2,5 мг/кг [11]. Эффекты эмбриотоксичности и эмбриолетальности оценивали после эвтаназии и вскрытия самок на 20-й день беременности.

Изучение влияния Гестобутаноила на развитие плода и потомства проходило в 2 этапа. При изучении эмбрио- и фетотоксического действия,

регистрируемого в антенатальном периоде развития, Гестобутаноил вводили внутривентрикулярно в дозах 0,25 мг/кг и 2,5 мг/кг самкам крыс в течение всей беременности (с 1-го по 19-й дни).

Показателями эмбрио- и фетотоксического действия служили предимплантационная и постимплантационная гибель, общая эмбриональная смертность, краниокаудальный размер плода и диаметр плаценты, аномалии развития плода.

На основании анализа эмбрионального материала были вычислены показатели предимплантационной, постимплантационной гибели и общей эмбриональной смертности [10].

После наружного осмотра одну группу плодов фиксировали в 96% спирте и после просветления раствором щелочи и промывания водой окрашивали ализарином. А после обезвоживания в смесях глицерина с 96% этиловым спиртом эта группа использовалась для изучения костного скелета по Dowson.

Другая группа плодов была зафиксирована в жидкости Буэна и использована для изучения развития внутренних органов на микроанатомических срезах по Wilson-Дыбану (на уровне вибрисс, глазных яблок, боковых и четвертого желудочков головного мозга, выше передних лап, ниже передних лап, на уровне сердца и легких, желудка, печени, почек). Исследовались также мочевой пузырь, мочеточники и органы репродуктивной системы. При осмотре плодов регистрировали патологические изменения (подкожные кровоизлияния и отек подкожной клетчатки, нарушения развития скелета и т.д.) [12-14].

При изучении эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в постнатальном периоде развития, препарат Гестобутаноил вводили внутривентрикулярно в дозах 0.25 мг/кг (РЭТД) и 2.5 мг/кг (в 10 раз выше РЭТД) самкам крыс в период органогенеза и фетогенеза (с 6 по 19 день беременности).

Регистрировали общее физическое состояние и поведение самок во время беременности, дату наступления родов и продолжительность беременности. За 3–4 дня до родов беременные самки были рассажены по одной в клетку и обеспечены подходящей подстилкой для устройства гнезда. Определяли количество плодов и общую массу тела новорожденных крысят в помете. В каждом помете оставляли по 6–8 новорожденных, на 30-й день после рождения крысят отсаживали от матерей. Были вычислены средняя масса крысят в течение первого месяца, коэффициент выживаемости и лактации [10].

Исследование крысят в постнатальном периоде развития включало следующие типы исследований: общие наблюдения за физическим развитием потомства, изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период

вскармливания самкой; изучение двигательной активности и эмоциональной реакции, способности к координации движений у потомства после окончания вскармливания. Были использованы тест «переворачивания на плоскости», тест «избегания обрыва» и тест «мышечной силы» на 8-ой день развития и поведение в «открытом поле» на 14-й и 28-ой дни развития

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с помощью программы Statistica 7.0. В случае нормального распределения данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего значения (m), которые представлены в таблицах.

Для сравнения выборок при нормальном распределении совокупностей использовали параметрический t-критерий Стьюдента для парных выборок (для зависимых выборок) или непарных выборок (независимых). В случае значительных отклонений распределения признака от нормального закона, а также при малых объемах выборки применяли непараметрические критерии: для двух зависимых выборок – критерий Уилкоксона, в случае двух независимых выборок – критерий Манна-Уитни. Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [17].

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что введение Гестобутаноила в обеих дозах не оказывало существенного влияния на массу тела беременных животных, и она продолжала прогрессивно нарастать в период проведения эксперимента.

Однако, несмотря на то, что первоначальная масса животных при введении Гестобутаноила в дозе 2.5 мг/кг была несколько больше по сравнению с другими группами животных, можно отметить общую тенденцию снижения прироста массы крыс по триместрам беременности при введении гестагена в большой дозе (табл.1).

На 20-ый день беременности беременных крыс каждой группы подвергали некропии с дальнейшим анализом эмбрионального материала. В процессе анализа эмбрионального материала крыс, подвергшихся воздействию Гестобутаноила в течение всей беременности, было подсчитано количество желтых тел в яичниках, мест имплантаций, резорбций и плодов в полости матки. Определяли массу и кранио-каудальный размер плодов, диаметр и массу плаценты. Проводили выявление возможных кровоизлияний, отеков подкожной клетчатки и аномалий развития органов и скелета плодов. Вычисляли пред- и постимплантационную гибель и общую эмбриональную смертность по общей методике.

В таблице 2 приведены средние статистические данные анализа эмбрионального материала крыс после внутривентрикулярного введения Гестобута-

Таблица 1

Динамика массы тела (г) беременных при внутрижелудочном введении Гестобутаноила по дням и триместрам беременности

Группа животных	Дни беременности			
	1	7	14	20
контроль	206.4±5.1	233.1±6.4	268.5±4.9	316.4±4.2
0.25 мг/кг	207.6±4.6	233.3±3.3	261.1±5.1	308.6±5.1
2.5 мг/кг	213.5±5.6	237.9±3.6	266.8±8.0	309.1±9.3
	Триместры беременности, дни			
	1-7	8-14	15-20	1-20
контроль	26.7±2.1	36.6±3.7	46.1±3.9	110.2±5.5
0.25 мг/кг	24.5±2.3	27.8±1.8	47.5±2.0	101.0±4.8
2.5 мг/кг	24.4±4.1	28.9±4.1	42.3±3.7	93.8±5.4

ноил в течение беременности в дозах 0.25 мг/кг и 2.5 мг/кг.

Внутрижелудочное введение исследуемого гестагена в дозе 0.25 мг/кг не вызывало изменений таких показателей эмбриотоксического эффекта у крыс, как количество желтых тел беременности, мест имплантации, количества резорбций. Величина предимплантационной, постимплантационной гибели и общей эмбриональной смертности в этой группе не превышала аналогичных показателей контрольной группы. Масса тела и кранио-каудальный размер плодов, масса и диаметр плаценты, а также фето-плацентарный коэффициент были идентичны контрольным значениям этих показателей.

Иная картина наблюдалась при анализе показателей, характеризующих эмбриотоксичный эффект при введении гестагена в дозе 2.5 мг/кг. Выявлена устойчивая и последовательная тенденция снижения количества желтых тел беременности и мест имплантации, отмечено достоверно значимое увеличение предимплантационной гибели и общей эмбриональной смертности, снижение количества живых плодов, а также тенденция увеличения количества резорбций при введении гестагена в большой дозе. При введении Гестобутаноила в дозе 2.5 мг/кг значительно выросла общая эмбриональная смертность, в которую существенный вклад внесла предимплантационная гибель зародышей (табл. 2).

У отдельных крыс подопытной группы наблюдалась малоплодная беременность, и количество плодов колебалось от 5 до 2, что резко отличало этих крыс от контрольных особей, у которых количество плодов составляло от 10 до 13 (рис. 1).

Возможно, наблюдаемые изменения, в частности, снижение количества желтых тел, достоверное увеличение предимплантационной гибели и снижение количества плодов, подтверждают гипотезу об антиовуляторном эффекте больших доз Гестобутаноила, который обусловлен изменением гормонального баланса, с одной стороны, и иммунологическими механизмами, с другой.

Указанные эффекты могут быть вызваны уменьшением выработки лютеинизирующего гормона (ЛГ), стимулирующего созревание фолликула и овуляцию в течение менструального цикла. Так, структурный аналог Гестобутаноила (МПА) за рубежом используется в программах экстракорпорального оплодотворения для предотвращения выброса ЛГ и предотвращения овуляции с целью сохранения овуляторного резерва перед гиперстимуляцией [18]. Исследованием авторов статьи в эксперименте показано, что под действием Гестобутаноила тормозился фолликулогенез самок крыс [9]. Нарушение имплантации яйцеклетки в эндометрий происходит также за счет снижения уровня эстрогенов и уменьшения толщины эндометрия под действием Гестобутаноила, что является характерной чертой фармакодинамики гестагенов [19].

Кроме того, прогестерон и его аналоги оказывают влияние на иммунокомпетентные клетки, которые, как известно, регулируют течение беременности: в частности, натуральные киллеры играют ключевую роль в имплантации яйцеклеток. Они дифференцируются в децидуальные натуральные киллеры под действием IL-15 и секретуют цитокины и факторы роста, такие как TNF α , IL-10, GM-CSF, IL-1 β , TGF β , INF γ и другие. Под действием синтетических гестагенов меня-

Анализ эмбрионального материала после внутрижелудочного введения Гестобутаноила самкам крыс в течение всей беременности

Показатели	Контроль	0.25 мг/кг	2.5 мг/кг
Количество желтых тел	11.7±0.3	11.3±0.3	9.8±0.0.6
Количество мест имплантаций	11.4±0.3	10.7±0.3	7.8±0.6
Количество резорбций	0.6±0.4	0.4±0.2	1.3±0.3
Количество живых плодов	10.8±0.3	10.3±0.3	6.5±0.8 P<0.01
Количество мертвых плодов	0	0	0
Предимплантационная гибель, %	2.4±0.9	5.5±2.2	22.4±5.4 [†] P<0.01
Постимплантационная гибель, %	4.8±3.3	3.4±1.8	20.2±6.5
Общая эмбриональная смертность, %	6.4±3.3	8.8±1.8	34.3±8.6 [†] P<0.01
Масса плода, г	2.2±0.04	2.2±0.07	2.7±0.2
Кранио-каудальный размер, см	2.8±0.03	2.8±0.03	3.0±0.10
Масса плаценты, г	0.54±0.02	0.54±0.01	0.63±0.05
Диаметр плаценты, см	1.5±0.02	1.5±0.01	1.6±0.04
Фето-плацентарный коэффициент	0.22±0.01	0.22±0.01	0.24±0.02

ется иммуномодулирующий эффект эндогенного прогестерона. А так как они оказывают влияние на способность яйцеклетки к имплантации и слизистую матки в меньших концентрациях, чем прогестерон, то это может сопровождаться нарушением имплантации [20].

В качестве компенсаторного биологического механизма при малоплодной беременности наблюдалось небольшое увеличение массы плодов, как по абсолютному значению (до 3.92 г), так и по среднему значению (2.7 г в опыте против 2.2 г в контроле). Соответственно в определенной степени увеличены размер плодов (3.0 г против 2.8 г в контроле), масса плаценты (0.6 г против 0.5 г в контроле), диаметр плаценты (1.6 г против 1.5 г в контроле), а также фето-плацентарный коэффициент.

При анализе тотальных препаратов, фиксированных этиловым спиртом и окрашенных ализаринном (метод Dowson) для изучения развития костной системы плодов при введении гестагена в 2-х дозах в течение беременности не выявлено аномалий развития скелета. Задержка оксификации не определилась ни по одной из исследуемых точек скелета (табл. 3).

При макроскопическом осмотре и микроанатомическом исследовании (стандартные разрезы

по Wilson в модификации А.П. Дыбана) плодов крыс, подвергавшихся воздействию лекарственной формы Гестобутаноил в испытанных дозах в течение беременности, а также контрольных плодов не выявлено значимых аномалий развития внутренних органов, обусловленных действием гестагена. Как в контрольной, так и в подопытных группах в единичных случаях были отмечены кровоизлияния в брюшную полость и отек подкожной клетчатки у плодов.

Таким образом, изучение эмбрио- и фетотоксического эффекта гестагена Гестобутаноил в антенатальном периоде позволило выявить дозозависимость в проявлении эмбриотропного эффекта. Опираясь на полученные результаты исследования, полагаем, что доза гестагена 0.25 мг/кг (РЭТД) не оказывала неблагоприятного действия на развитие эмбриона и плода крыс.

Напротив, воздействие гестагена в дозе 2.5 мг/кг (10 РЭТД) оказывало выраженное негативное действие на ранние сроки беременности. Токсический эффект гестагена в первую очередь проявлялся с 1-го по 7-ой дни беременности, он тормозил процесс оплодотворения яйцеклетки, имплантацию ее в стенку матки, в конечном счете приводя к уменьшению количества эмбрионов и соответственно плодов.

Однако, воздействие гестагена в период органогенеза (7-14 дни) и дифференцировки органов и тканей (15-20 дни) не сопровождалось проявлением патологических изменений таких показателей как масса и кранио-каудальный размер плодов, масса и размер плаценты, величина фето-плацентарного коэффициента. Внешний осмотр плодов и количественные параметры исследования плодов методами Wilson в модификации Дыбана А. П. и Dowson не выявили тератогенного эффекта гестагена.

На основании этих данных можно полагать также, что Гестобутаноил не проникал непосредственно через плаценту и не оказывал на нее прямого действия. Наблюдаемый эмбриотоксический эффект в большой дозе обусловлен скорее всего его опосредованным гуморальным воздействием.

При исследовании эмбрио- и фетотоксического действия гестагена, регистрируемого в постнатальном периоде развития, Гестобутоноил вводили внутрижелудочно самкам крыс с 6-го по 19-й дни беременности, а затем были оставлены на роды.

На 20-ый день беременности они были отсажены в отдельные клетки до родов, которые

наступили в срок (на 22-23 день беременности). Продолжительность беременности и инстинкт материнства у подопытных самок, получавших гестаген, не отличались от аналогичных показателей у контрольных животных.

В течение первого месяца постнатального периода развития крысят было проведено изучение смертности, динамики массы тела, физического и эмоционально-двигательного развития потомства первого поколения.

Количество родившихся крысят на 1 крысу в экспериментальных группах, гибель их к 5 и 21 дню развития представлены в таблице 4. Достоверных изменений по изученным показателям не получено. Количество потомков первого поколения, способность матерей-самок к вскармливанию (коэффициент лактации) и выживаемость крысят подопытных животных, получавших гестагена в 2-х дозах, не отличались от соответствующих показателей в контрольной группе. Динамика массы тела крысят в контрольной и опытных группах в течение первого месяца жизни не выявила существенных отличий между собой (табл. 5).

Таблица 3

Оценка тератогенного эффекта гестагена Гестобутаноил при введении самкам крыс в течение беременности

Показатели		Контроль	0.25 мг/кг	2.5 мг/кг
Внешний осмотр плодов	Общее количество	108	103	65
	с гематомами	абс.	0	0
		%	0	0
Состояние внутренних органов	обследовано	58	53	33
	с нарушениями	абс.	3	4
		%	5.0	7.5
Состояние костного скелета	обследовано	50	50	32
	с нарушениями	абс.	0	0
		%	0	0

Таблица 4

Количество родившихся крысят, коэффициенты лактации и выживаемости после введения Гестобутаноила самкам крыс с 6-го по 19-й дни беременности (расчет на 1 самку)

Группа крыс	Количество родившихся крысят	Гибель крысят к 5 дню развития	Коэффициент лактации, %	Гибель крысят к 21 дню развития	Коэффициент выживаемости, %
Контроль	11.2±0.5	0.2±0.2	98.3±1.8	0.2±0.2	98.7±1.4
0.25 мг/кг	9.8±0.4	0	100±0	0	100±0
2.5 мг/кг	9.3±1.8	0.3±0.2	94.5±2.5	0.2±0.2	97.2±1.6

Физическое развитие крысят в течение 1-го месяца жизни (покрытие шерстью, появление резцов, открытие глаз, отлипание ушных раковин, открытие вагины, опускание яичек и т.д.) не отличалось от сроков, характерных для нормального физиологического развития животных этого вида.

Показатели скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов потомства, полученного от самок после введения Гестобутаноила в 2-х дозах, представлены в таблице 6. Достоверных изменений в тестах переворачивания на плоскости, избегание обрыва и измерения мышечной силы на 8-ой день развития контрольных и подопытных крысят не получено. Результаты исследования эмоционально-двигательного поведения крысят в «открытом поле» на 14-й день развития представлены также в таблице 6. Время ухода крысят из центра «открытого поля, количество перебежек и вставаний после введения гестагена в обеих дозах (0.25 и 2.5 мг/кг) не отличались от соответствующих значений контрольных животных.

Результаты исследования эмоционально-двигательного поведения крысят 1-го месяца развития

в «открытом поле» представлены в таблице 7. Все исследованные показатели самок и самцов F_1 подопытных животных не различались от таковых контрольных животных.

Таким образом, исследование эмбрио- и фетотоксического действия гестагена, регистрируемого в постнатальном периоде развития, показало, что введение гестагена Гестобутаноила с 6-го по 19-ый дни беременности в дозах 0.25 и 2.5 мг/кг (РЭТД и 10РЭТД) не оказывало негативного влияния на развитие потомства первого поколения, не влияло на смертность, динамику массы тела, физического и эмоционально-двигательного развития потомства первого поколения.

Выводы.

1. Изучение влияния гестагена Гестобутаноила на эмбрио- и фетогенез позволило выявить дозовую зависимость в проявлении эмбриотропного эффекта. Введение гестагена в дозе 0.25 мг/кг (расчетная эквитерапевтическая доза) не оказывало неблагоприятного действия на развитие эмбриона и плода крыс. Воздействие гестагена в дозе 2.5 мг/кг (10 эквитерапевтических доз) оказывало негативное действие на течение беременности, которое проявлялось статистически

Таблица 5

Динамика массы (г) тела крыс первого поколения, полученных от самок после введения Гестобутаноила с 6-го по 19-й дни беременности (расчет на 1 самку)

Группа животных	Дни постнатального развития			
	4-й	7-ой	14-ый	28-ой
Контроль	10.5±0.6	16.8±0.6	34.4±1.4	53.7±7.8
0.25 мг/кг	10.6±0.6	17.2±0.9	34.8±3.4	52.2±4.4
2.5 мг/кг	10.7±0.6	17.9±0.5	32.2±3.0	49.1±6.3

Таблица 6

Оценка показателей нервной системы потомства на 8-ой день и на 14-й день развития, полученных от самок, которым с 6-го по 19-ый дни беременности вводили Гестобутаноил

Исследуемые тесты	Контроль	0.25 мг/кг	2.5 мг/кг
8-ой день развития			
Переворачивание, %	100	100	100
Избегание обрыва, с	6.3±1.0	7.4±1.4	8.4±1.4
Мышечная сила, с	7.1±0.6	9.0±1.2	8.7±1.2
Тест «открытое поле», 14 день развития:			
Уход из центра, с	10.3±1.7	9.8±0.9	11.6±1.7
Количество перебежек	21.8±1.8	23.2±1.6	18.7±1.6
Количество стоек	11.2±1.3	8.3±1.3	8.1±1.3

Таблица 7

Состояние нервной системы крыс первого поколения в возрасте 1 месяца по показателям в «открытом поле» после введения Гестобутаноила самкам с 6-го по 19-ый дни беременности, самки и самцы

Группа животных	Уход из центра, с	Количество пересеченных квадратов	Количество вставаний	Количество умываний
Самки				
Контроль	1.5±0.7	26.2±3.0	8.2±1.2	2.5±0.5
0.25 мг/кг	1.8±0.4	25.8±2.5	8.8±0.9	2.3±0.4
2.5 мг/кг	4.0±0.5	23.7±5.8	8.7±1.4	1.7±0.2
Самцы				
Контроль	1.5±0.4	26.5±4.0	12.3±2.6	1.8±1.2
0.25 мг/кг	4.2±1.1	22.2±4.4	7.0±0.7	2.2±0.5
2.5 мг/кг	4.7±1.1	20.3±1.1	7.0±0.9	1.8±0.4

значимым увеличением общей эмбриональной смертности за счет увеличения предимплантационной гибели, а также статистически значимым снижением количества плодов.

2. Продолжительность беременности и инстинкт материнства у подопытных самок, получавших Гестобутаноил в 2-х дозах в течение беременности и с 6-го по 19-ый дни беременности, не отличались от аналогичных показателей у контрольных животных.

3. Внутривентрикулярное введение лекарственной формы Гестобутаноил в дозах 0.25 и 2.5 мг/кг самкам крыс с 6-го по 19-ый дни беременности не оказывало негативного влияния на раннее развитие потомства первого поколения (постнатальная смертность, динамика массы тела, развитие сенсорно-двигательных рефлексов крысят).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ N 19-015-00195\19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Christian M. S., Brent R. L., Calda P. Embryo-fetal toxicity signals for 17alpha-hydroxyprogesterone caproate in high-risk pregnancies: a review of the non-clinical literature for embryo-fetal toxicity with progestins. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007, 20(2):89-112.
- Barrow P. Review of embryo-fetal developmental toxicity studies performed for pharmaceuticals approved by FDA in 2016 and 2017. *Reprod Toxicol.* 2018, 80:117-125. doi: 10.1016/j.reprotox.2018.04.008.
- FDA database (2018). Available at [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021778s018lbl.pdf].
- Jordan A. Toxicology of depot medroxyprogesterone acetate. *Contraception.* 1994, 49: 189-201.
- Heffron R., Achilles S. L., Dorfinger L. J., Haggood J. P., Kiarie J., Polis C. B., Steyn P. S. Pharmacokinetic, biologic, and epidemiologic differences in MPA- and NET-based progestin-only injectable contraceptives relative to the potential impact on HIV acquisition in women. *Contraception.* 2018. pii: S0010-7824(18)30524-9. doi: 10.1016/j.contraception.2018.12.001.
- Schardein J. L., Birch R., Hesley R., Thorsrud B. A. Multigeneration reproductive study of hydroxyprogesterone caproate (HPC) in the rat: laboratory results and clinical significance. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2012, 95(2):160-174. doi: 10.1002/bdrb.21000.
- van Diepen H. A. Preclinical pharmacological profile of nomegestrol acetate, a synthetic 19-nor-progesterone derivative. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012 8;10:85. doi: 10.1186/1477-7827-10-85
- Merck Sharp and Dohme Limited Summary of Product Characteristics: Zoely 2.5 mg/ 1.5 mg film-coated tablets. Electronic Medicines Compendium (eMC) 2011. Available from: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/27581/SPC/>
- Шейна Н. И., Паршин В. А., Рыбаков Ю. Л., Гукасов В. М., Костяева М. Г., Семейкин А. В., Самойликов П. В., Федотчева Т. А., Шимановский Н. Л. Оценка токсичности нового гестагена гестобутаноила в эксперименте на крысах и мышях. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2018. 81(11). 18-25. Sheina N.I., Parshin V.A., Rybakov U.L., Gukasov V.M., Kostiaeva M.G., Semeikin A.V., Fedotcheva T.A., Shimanovsky N.L. Evaluation of the toxicity of new progestogen gestobutanoil in an experiment on rats and mice. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2018. 81(11): 18-25.
- Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. Составители: Дурнев А.Д., Смольникова Н. М., Скосырева А. М. и др. / В «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией А.Н. Миронова и др. - М., 2012. - Ч.1. - С.80-94
- Гуськова Т. А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их доклинического исследования. 2010 // *Токсикологический вестник.* - 2010. - №5. - С.2-6
- Дыбан А. П. Раннее развитие млекопитающих. - Л.: Наука, 1988. - 228 с.
- Кириющенков Л. П., Тараховский М. Л. Влияние лекарственных средств на плод. М.: 1990. - 286 с.
- Amann R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. // *Fundam. Appl. Toxicol.* - 1982. - № 2. - P.13-16
- Menegola E., Broccia M. L., Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. // *Teratology.* - 2001. - № 64(3). - P.125-133.
- Neubert D. Reproductive toxicology: the science today. // *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* - 2002. - № 22. - P. 159-174.
- Бейли Н. Статистические методы в биологии. М.: Мир, 1963. - 271 с.
- Kuang Y, Chen Q, Fu Y, Wang Y, Hong Q, Liu Q, Ai A, Shoham Z. // Medroxyprogesterone acetate is an effective oral alternative for preventing premature luteinizing hormone surges in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2015. - №104(1).P.62-70. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.022.
- Федотчева Т. А., Шимановский Н. Л. Роль гестагенов в лечении эндометриоза. // *Проблемы эндокринологии.* - 2018. - №64(1). - С.54-61. doi: 10.14341/probi201864154-61.
- Polikarpova AV, Levina IS, Sigai NV, Zavarzin IV, Morozov IA, Rubtsov PM, Guseva AA, Smirnova OV, Shchelkunova T.A.. Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. // *Steroids.* - 2019 - №145. - P.5-18. doi: 10.1016/j.steroids.2019.02.009

REFERENCES:

1. Christian M.S., Brent R.L., Calda P. Embryo-fetal toxicity signals for 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate in high-risk pregnancies: a review of the non-clinical literature for embryo-fetal toxicity with progestins. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007, 20(2), 89-112.
2. Barrow P. Review of embryo-fetal developmental toxicity studies performed for pharmaceuticals approved by FDA in 2016 and 2017. *Reprod Toxicol.* 2018, 80, 117-125 (DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.04.008).
3. FDA database (2018). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021778s0181bl.pdf.
4. Jordan A. Toxicology of depot medroxyprogesterone acetate. *Contraception.* 1994, 49, 189-201.
5. Heffron R., Achilles S.L., Dorflinger L.J., Hapgood J.P., Kiarie J., Polis C.B., Steyn P.S. Pharmacokinetic, biologic, and epidemiologic differences in MPA- and NET-based progestin-only injectable contraceptives relative to the potential impact on HIV acquisition in women. *Contraception.* 2018. pii: S0010-7824(18)30524-9 (DOI: 10.1016/j.contraception.2018.12.001).
6. Schardein J.L., Birch R., Hesley R., Thorsrud B.A. Multigeneration reproductive study of hydroxyprogesterone caproate (HPC) in the rat: laboratory results and clinical significance. *Birth Defects Res B Dev. Reprod. Toxicol.* 2012, 95(2), 160-174 (DOI: 10.1002/bdrb.21000).
7. Van Diepen H.A. Preclinical pharmacological profile of nomegestrol acetate, a synthetic 19-nor-progesterone derivative. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012, 8, 10, 85 (DOI: 10.1186/1477-7827-10-85).
8. Merck Sharp and Dohme Limited Summary of Product Characteristics: Zoely 2.5 mg/1.5 mg film-coated tablets. *Electronic Medicines Compendium (eMC)* 2011. Available from: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/27581/SPC/>.
9. Sheina N.I., Parshin V.A., Rybakov U.L., Gukasov V.M., Kostiaeva M.G., Semeikin A.V., Fedotcheva T.A., Shimanovsky N.L. Evaluation of the toxicity of new progestogen gestobutanoil in an experiment on rats and mice. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2018, 81(11), 18-25 (in Russian).
10. Guidelines for the study of reproductive toxicity of drugs. Compilers: Durnev A.D., Smol'nikova N.M., Skosyeva A.M. etc. / in the «Guidelines for preclinical studies of pharmaceuticals» edited by Mironov A.N. etc. – M., 2012, 1, 80-94 (in Russian).
11. Gus'kova T.A. Preclinical toxicological study of drugs as a guarantee of safety of their preclinical study. *Toxicological Bulletin.* 2010, 5, 2-6 (in Russian).
12. Dyban A.P. Early development of mammals. L., Science, 1988, 228 p (in Russian).
13. Kiryuschenkov L.P., Tarakhovskiy M.L. Influence of drugs on the fetus. M., 1990, 286 p (in Russian).
14. Amann R.P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1982, 2, 13-16.
15. Menegola E., Broccia M.L., Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology.* 2001, 64(3), 125-133.
16. Neubert D. Reproductive toxicology: the science today. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* 2002, 22, 159-174.
17. Bailey N. Statistical methods in biology. M., Mir, 1963, 271 p (in Russian).
18. Kuang Y., Chen Q., Fu Y., Wang Y., Hong Q., Lyu Q., Ai A., Shoham Z. Medroxyprogesterone acetate is an effective oral alternative for preventing premature luteinizing hormone surges in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2015, 104(1), 62-70 (DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.022).
19. Fedotcheva T.A., Shimanovsky N.L. The role of gestagens in the treatment of endometriosis. *Problems of endocrinology.* 2018, 64(1), 54-61 (in Russian). (DOI: 10.14341/probl201864154-61).
20. Polikarpova A.V., Levina I.S., Sigai N.V., Zavarzin I.V., Morozov I.A., Rubtsov P.M., Guseva A.A., Smirnova O.V., Shchelkunova T.A. Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. *Steroids.* 2019, 145, 5-18 (DOI: 10.1016/j.steroids.2019.02.009).

N.I. Sheina¹, V.A. Parshin¹, T.A. Fedotcheva^{1,2}, N.L. Shimanovsky¹

EFFECT OF THE NEW STEROID DRUG GESTOBUTANOIL FOR HORMONE REPLACEMENT THERAPY OF GESTAGENOUS INSUFFICIENCY ON THE DEVELOPMENT OF FETUS AND OFFSPRING IN EXPERIMENTS ON RATS

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 119997, Moscow, Russian Federation

²All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 117216, Moscow, Russian Federation

A study of the embryo- and fetotoxic effects registered in the antenatal and postnatal periods of development after the intragastric administration of Gestobutanoil in two doses (equitherapeutic and 10 times higher) has been performed.

It has been found that the introduction of gestagen Gestobutanoil in both doses did not affect the body weight of pregnant animals, which continued to increase progressively during pregnancy. The embryotropic effect of gestagen was revealed to be dose-dependent. The introduction of gestagen in a dose of 0.25 mg / kg (calculated equitherapeutic dose) had no adverse effect on the development of the embryo and fetus of rats. The gestagen in a dose of 2.5 mg / kg (10 equitherapeutic dose) had a negative effect on the course of pregnancy, which has been manifested by a statistically significant increase in preimplantation death and total fetal mortality, as well as a statistically significant decrease in the number of fetuses.

It has been shown that intragastric administration of Gestobutanoil in doses of 0.25 and 2.5 mg / kg to female rats from the 6th to the 19th days of pregnancy did not adversely affect the early development of the first generation offspring (postnatal mortality, body mass dynamics, and development of rats' sensory-motor reflexes).

Keywords: gestagen, Gestobutanoil, tablets, rats' pregnancy, embryotoxicity, offspring.

Переработанный материал поступил в редакцию 03.03.2019 г.

