

# ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ БОРХЛОРИНА

О.И. Коняева<sup>1</sup>, Н.Ю. Кульбачевская<sup>1</sup>, В.А. Чалей<sup>1</sup>, Н.П. Ермакова<sup>1</sup>,  
А.А. Николина<sup>1</sup>, Т.И. Малова<sup>2</sup>, В.М. Бухман<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ООО «ВЕТА-ГРАНД»; Россия, 123056 Москва, ул. Красина, 27, стр. 2

**Контакты:** Ольга Ивановна Коняева [natkulba@mail.ru](mailto:natkulba@mail.ru)

**Цель исследования** — изучение эмбриотоксичности, тератогенности и репродуктивной токсичности лиофилизированной лекарственной формы борхлорина на крысах.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на 210 неинбредных крысах-самках и 105 неинбредных крысах-самцах с массой тела 250–300 г. В работе использована лиофилизированная лекарственная форма борированного хлорина  $e_6$  под названием «Борхлорин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 2,5 мг». Препарат вводили ежедневно внутривенно в течение 48 дней (самцам) и в течение 15 дней (самкам) в 2 суммарных дозах, соответствующих терапевтической дозе (ТД) для мышей при пересчете на крыс и 10 ТД. В качестве контроля были использованы интактные крысы, а также крысы-самцы и самки, получавшие внутривенно 0,9 % раствор натрия хлорида в режимах, соответствующих режиму введения препарата, и в объемах, соответствующих максимальному объему вводимого раствора.

**Результаты исследования.** Изучено повреждающее действие лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина на генеративную функцию крыс — выявление возможного отрицательного действия препарата на стадии прогестоза (формирование мужских и женских гамет). Установлено, что лиофилизированная липосомальная лекарственная форма борхлорина обладает повреждающим действием на репродуктивную функцию самцов и самок и внутриутробное развитие плодов (эмбриотоксичность) крыс по индексу способности к оплодотворению и зачатию и по индексу постимплантационной гибели плодов. Постимплантационная гибель плодов в наибольшей степени выражена у самок, получавших препарат в суммарной дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами. Леофилизированная липосомальная лекарственная форма борхлорина не вызывает предимплантационную гибель плодов, не оказывает тератогенного действия.

**Заключение.** Леофилизированная лекарственная форма борхлорина обладает повреждающим действием на репродуктивную функцию самцов и самок и внутриутробное развитие плодов (эмбриотоксичность) неинбредных крыс по индексу способности к оплодотворению и зачатию и по индексу постимплантационной гибели плодов. Леофилизированная лекарственная форма борхлорина не вызывает предимплантационную гибель плодов, не оказывает тератогенного действия, влияния на физическое развитие потомства и скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания потомства.

**Ключевые слова:** борхлорин, эмбриотоксичность, тератогенность, репродуктивная токсичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-50-59

## REPRODUCTIVE TOXICITY OF THE LYOPHILIZED LIPOSOMAL DOSAGE FORM OF THE BORCHLORIN

O.I. Konyayeva<sup>1</sup>, N.Yu. Kulbachevskaya<sup>1</sup>, V.A. Chaley<sup>1</sup>, N.P. Ermakova<sup>1</sup>, A.A. Nikolina<sup>1</sup>, T.I. Malova<sup>2</sup>, V.M. Bukhman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>LLC «VETA-GRAND»; housing 2, 27 Krasin Str., Moscow 123056, Russia

**Introduction.** The study investigates the embryotoxicity, teratogenicity and reproductive toxicity of lyophilized dosage form borchlorin on rats.

**Materials and methods.** The research was conducted on 210 outbred female rats and 105 outbred male rats weighing 250–300 g. We used a lyophilized dosage form borated chlorin  $e_6$  called «Borchlorin liposomal, lyophilisates for dispersion for injection 2.5 mg». The drug was administered intravenously daily for 48 days (males) and 15 days (females) in 2 corresponding total doses for therapeutic dose in mice and rats based on the 10-therapeutic doses. As a control, intact rats were used, as well as rats — males and females who received intravenous 0.9 % sodium chloride solution into the mode corresponding to the mode of administration, and in the amounts corresponding to the maximum volume of the injected solution.

**Results of the study.** To study the damaging effect of lyophilized liposomal formulation borchlorin on the generative function in rats — the identification of the possible negative effect of the drug on the progenesis stage (formation of male and female gametes). It was found that lyophilized liposomal formulation borchlorin has a damaging effect on the reproductive function of male and female and fetal deve-

lopment (embryotoxicity) rats on the index's ability to fertilization and conception and the index of postimplantation fetal loss. Postimplant death of the fetuses in most pronounced in females treated with a total dose of the drug, therapeutic doses corresponding to 10, coupled with intact males. The lyophilized liposomal formulation borchlorin pre-implantation does not cause the death of the fetus, has no teratogenic effects.

**Conclusion.** The lyophilized dosage form borchlorin has a damaging effect on the reproductive function of male and female and fetal development (embryotoxicity) neinbrednyh rats on the index's ability to fertilization and conception and the index of postimplantation fetal loss. The lyophilized dosage form borchlorin pre-implantation does not cause the death of the fetus, has no teratogenic effects, effects on the physical development of the offspring, and the rate of maturation of the sensory-motor reflexes during the feeding of offspring.

**Key words:** borchlorin, embryotoxicity, teratogenicity, reproductive toxicity, rats

## Введение

Борированный хлорин  $e_6$  разработан и синтезирован в институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (патент № 2406726 от 20 декабря 2010 г.). В фотосенсибилизатор (хлорин  $e_6$ ) был введен бор, обладающий нейтронозахватными свойствами. Борхлорин позволяет проводить фотодинамическую терапию и, при необходимости, дополнить ее бор-нейтрон-захватной терапией. Разработанный препарат является оригинальным и обладает уникальными свойствами. В ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России разработана лиофилизированная липосомальная лекарственная форма (ЛЛЛФ) — препарат Борхлорин. В лаборатории фармакологии и токсикологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведено доклиническое токсикологическое изучение ЛЛЛФ борхлорина с целью оценки ее безопасности и прогноза побочных и токсических эффектов при клиническом применении больным.

**Цель исследования** — изучение эмбриотоксичности, тератогенности и репродуктивной токсичности ЛЛЛФ борхлорина на лабораторных животных (крысы).

### Задачи исследования:

- изучение повреждающего действия ЛЛЛФ борхлорина на генеративную функцию крыс — выявление возможного отрицательного действия препарата на стадии прогенеза (формирование мужских и женских гамет);
- исследование потомства в конце антенатального периода развития;
- исследование потомства в постнатальный период развития;
- оценка эмбриотропного действия ЛЛЛФ борхлорина, регистрируемого в постнатальном периоде развития.

## Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому

изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств, руководством по доклиническому изучению новых фармакологических веществ и руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [1–3].

### Характеристика тест-системы

Исследования проводились на 210 неинбредных крысах-самках и 105 неинбредных крысах-самцах с массой тела 250–300 г, полученных из аккредитованного питомника лабораторных животных ООО «Кролинфо». Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Кормление проводили в одно и то же время.

### Исследуемый препарат

В исследованиях использована созданная в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России ЛЛЛФ борированного хлорина  $e_6$  под названием «Борхлорин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 2,5 мг». В качестве растворителя служила вода для инъекций. Для клинического использования ЛЛЛФ борхлорина рекомендована при однократном внутривенном (в/в) применении.

### Процедура введения

Для изучения репродуктивной активности крыс-самцов ЛЛЛФ борхлорина вводили ежедневно в/в в течение 48 дней в фиксированной концентрации 0,25 мг/мл (2,5 мг во флаконе растворяли в 9,2 мл воды для инъекций) в 2 дозах: суммарная доза 2,5 мг/кг (разовая доза 0,05 мг/кг) доза, соответствующая терапевтической дозе (ТД) для мышей при пересчете на крыс (ТД для мышей — 5 мг/кг), и суммарная доза 25 мг/кг (разовая доза 0,5 мг/кг), соответствующая 10 ТД.

Для изучения репродуктивной активности ЛЛЛФ борхлорина на крысах-самках препарат вводили ежедневно в/в 15-кратно в фиксированной концентрации 0,25 мг/мл в тех же суммарных дозах

(соответствующих ТД и 10 ТД для мышей), что и самцам (разовые дозы 0,17 и 1,7 мг/кг соответственно). В качестве контроля были использованы интактные крысы, а также крысы-самцы и самки, получавшие в/в 0,9 % раствор натрия хлорида в режимах, соответствующих режиму введения ЛЛЛФ борхлорина, и в объемах, соответствующих максимальному объему вводимого препарата.

#### Время проведения экспериментов

Эксперимент проводился в период май – сентябрь 2016 г.

#### Критерии оценки репродуктивной токсичности

В каждой группе использовали 30 крыс-самок и 15 крыс-самцов. По окончании введения препарата крыс-самок подсаживали к самцам в соотношении 2 : 1 сроком на 2 эстральных цикла (10 дней). Оплодотворение регистрировали с помощью вагинальных мазков. Во время эксперимента наблюдали за состоянием и поведением беременных самок.

Беременных самок контрольных и опытных групп (по 20 крыс из каждой группы) выводили из эксперимента методом дислокации шейных позвонков на 20–21-й день беременности (оставшихся беременных самок – по 10 крыс из каждой группы – оставляли до родов). После вскрытия брюшной полости удаляли матку и переносили ее в чашку Петри. После вскрытия матки подсчитывали количество живых, мертвых, резорбцированных плодов и количество мест имплантации. Под биноклем проводили наружный осмотр плодов с целью выявления внешних аномалий. Плоды взвешивали и определяли краниокаудальный размер (мм). В яичниках подсчитывали количество желтых тел. На основании этих данных определяли уровень пред- и постимплантационной смертности зародышей.

Предимплантационную смертность (%) определяли по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантаций в матке; постимплантационную смертность (%) – по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. Для оценки способности к оплодотворению и зачатию вычисляли индекс, характеризующий отношение числа беременных животных к числу ссаженных, выраженный в % (индекс плодовитости).

$$\text{Предимплантационная смертность, \%} = \frac{\text{Количество желтых тел} - \text{количество мест имплантации}}{\text{Количество желтых тел}} \times 100 \%$$

$$\text{Постимплантационная смертность \%} = \frac{\text{Количество мест имплантации} - \text{количество живых плодов}}{\text{Количество мест имплантации}} \times 100 \%$$

$$\text{Индекс плодовитости} = \frac{\text{Число оплодотворенных самок}}{\text{Число ссаженных самок}} \times 100 \%$$

Для исследования внутренних органов и костной системы с целью выявления аномалий развития плоды делили на 2 части. Одну часть фиксировали в жидкости Боуэна и после фиксации подвергали внешнему осмотру и исследованию внутренних органов (в том числе головного мозга) по методике Вильсона в модификации отдела эмбриологии НИИ экспериментальной медицины РАМН с использованием толстых бритвенных срезов на разных уровнях головы и туловища плода. Другую часть плодов фиксировали в 96 % этиловом спирте и после 10-дневной фиксации исследовали состояние внутренних органов по методу Стейплса, которые в дальнейшем удаляли из тел зародышей. Затем плоды для выявления аномалий развития скелета подвергали обработке по методу Доусона, модифицированному отделом эмбриологии НИИ экспериментальной медицины РАМН, с окраской ализарином красным [1–3].

Плоды, внутренние органы и скелет исследовали с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9.

Оставшихся беременных самок (по 10 крыс из каждой группы) оставляли до родов и наблюдали за физическим развитием потомства до окончания вскармливания (35 дней).

Проводили ежедневное наблюдение за развитием потомства, регистрировали общее физическое состояние и поведение, динамику массы тела и гибель крысят. Оценка включала следующие регистрируемые показатели развития потомства: размер помета, число живых и мертвых новорожденных, гибель новорожденных, масса тела (7, 14, 21, 30-й день), отлипание ушной раковины (со 2-го дня), появление первичного волосяного покрова (с 4-го дня), прорезывание резцов (с 6-го дня), открытие глаз (с 12-го дня), опускание семенников (с 23-го дня), открытие влагалища (с 28-го дня), переворачивание на плоскости (со 2-го дня), отрицательный геотаксис (с 5-го дня), избегание обрыва (с 9-го дня), переворачивание в свободном падении (с 20-го дня), тест «открытое поле» (35-й день).

#### Методы статистической обработки данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии. За достоверные принимали различия при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

В результате проведенных исследований по репродуктивной активности крыс-самцов, получавших ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, в течение 48 дней введения препарата не выявлено каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений в поведенческих реакциях. При спаривании с интактными крысами-самками изменений сексуального поведения у крыс-самцов, получавших ЛЛЛФ борхлорина, не наблюдалось по сравнению с контрольными животными; эмоциональное состояние и поведенческие реакции крыс-самцов не отличались от поведения контрольных животных.

При изучении репродуктивной активности крыс-самцов после применения ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, при спаривании с интактными самками выявлено отрицательное действие на генеративную функцию самцов. Индекс способности к оплодотворению и зачатию отличался от значений контрольных групп на  $\approx 25\%$  (крысы-самцы, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в ТД) и на  $\approx 35\%$  (крысы-самцы, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в 10 ТД). Установлено отсутствие предимплантационной гибели зародышей. Процент предимплантационной гибели зародышей у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в обеих изученных дозах, составлял  $0\%$  и не отличался от значений контрольных

животных. В то же время установлена постимплантационная гибель плодов у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина. Процент постимплантационной гибели плодов у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, был практически одинаковым и составлял  $11,2$  и  $8,0\%$  соответственно, что более чем в  $2-2,5$  раза превышало процент постимплантационной гибели плодов контрольных животных. При наружном осмотре живых плодов внешних видимых аномалий развития плодов отмечено не было. Масса тела плодов и краниокаудальный размер не отличались от значений контрольных групп (табл. 1).

При изучении репродуктивной активности крыс-самок во время и после введения ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, не выявлено каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений в поведенческих реакциях. Сексуальное поведение крыс-самок после применения ЛЛЛФ борхлорина не отличалось от поведения контрольных животных.

При изучении репродуктивной активности крыс-самок после применения ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, при спаривании с интактными самцами выявлено отрицательное не зависящее от дозы действие на генеративную функцию самок. Индекс способности к оплодотворению и зачатию отличался от значений

**Таблица 1.** Результаты изучения репродуктивной токсичности неинбредных крыс-самцов, после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина спаренных с интактными самками

Показатель	Самцы			
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	Интактный контроль
Общее количество вскрытых самок	20	20	20	20
Количество беременных самок	15	13	20	19
Индекс способности к оплодотворению и зачатию (%)	75	65	100	95
Количество живых плодов*	7,9	9,2	10,7	11,9
Количество резорбций	5	1	0	1
Количество желтых тел в яичниках*	7,9	7,2	8,6	12,3
Количество мест имплантации*	8,9	10,0	11,0	12,5
Количество мертвых плодов	15	1	0	0
Предимплантационная гибель (%)	0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)	11,2	8,0	2,7	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)	$6,1 \pm 1,9$	$6,5 \pm 1,9$	$6,8 \pm 1,3$	$7,1 \pm 1,2$
Краниокаудальный размер (мм)	$37,0 \pm 8,9$	$39,0 \pm 7,1$	$39,0 \pm 6,9$	$40,0 \pm 5,9$

**Примечание.** NaCl –  $0,9\%$  раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. \*Среднее количество на 1 беременную самку.

**Таблица 2.** Результаты изучения репродуктивной токсичности неинбредных крыс-самок, после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина спаренных с интактными самцами

Показатель	Самки			
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	Интактный контроль
Общее количество вскрытых самок	20	20	20	20
Количество беременных самок	15	17	20	19
Индекс способности к оплодотворению и зачатию (%)	75	85	100	95
Количество живых плодов*	11,0	7,2	10,6	11,9
Количество резорбций	4	2	1	1
Количество желтых тел в яичниках*	10,8	12,1	10,3	12,3
Количество мест имплантации*	11,5	12,1	11,1	12,5
Количество мертвых плодов*	2,0	3,8	3,0	0
Предимплантационная гибель (%)	0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)	0	40,0	4,5	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)	5,3 ± 1,7	5,6 ± 1,8	6,6 ± 1,3	7,1 ± 1,2
Краниокаудальный размер (мм)	38,0 ± 8,9	39,0 ± 10,0	40,0 ± 9,7	40,0 ± 5,9

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. \*Среднее количество на 1 беременную самку.

контрольных групп на  $\approx 25$  % (крысы-самки, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в ТД) и на  $\approx 15$  % (крысы-самки, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в 10 ТД). Установлено отсутствие предимплантационной гибели зародышей. Процент предимплантационной гибели зародышей у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в обеих дозах и спаренных с интактными самцами, составлял 0 % и не отличался от контрольных животных. Установлена высокая постимплантационная гибель плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в 10 ТД и спаренных с интактными самцами. Процент постимплантационной гибели плодов у животных в этой группе составлял 40 %. Постимплантационная гибель плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в ТД, отсутствовала. Процент постимплантационной гибели плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в ТД, не отличался от контрольных значений. При наружном осмотре живых плодов внешних видимых аномалий развития плодов отмечено не было. Масса тела плодов и краниокаудальный размер не отличались от значений контрольных групп (табл. 2).

При исследовании физического развития потомства, рожденного от крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и спаренных с интактными самцами, и от интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в тех же дозах,

обнаружено статистически недостоверное отставание в физиологическом приросте массы тела потомства по сравнению с контрольными животными (табл. 3). В период вскармливания этого потомства сенсорно-двигательные рефлексы были без особенностей и не отличались от рефлексов потомства контрольных животных (табл. 4, 5).

При патологоанатомическом исследовании не родившихся плодов в конце антенатального периода развития установлено отсутствие плодов с аномалиями внешнего развития, аномалиями развития костной системы, головного мозга и внутренних органов (табл. 6, 7).

При изучении эмбриотоксического и тератогенного действия ЛЛЛФ борхлорина у крыс-самок, получавших препарат в ТД и 10 ТД и спаренных с интактными самцами, и у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД и 10 ТД, уменьшения количества живых плодов не обнаружено. Количество живых плодов при изученных дозах не отличалось от показателей контрольных животных. Отмечено увеличение количества резорбций плодов в 4–5 раз у крыс-самок, получавших препарат в ТД и спаренных с интактными самцами, и у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД, по сравнению с интактными животными. При применении ЛЛЛФ борхлорина у крыс-самок, получавших препарат в ТД и 10 ТД и спаренных с интактными



**Таблица 3.** Изменение массы тела потомства, рожденного от неинбредных крыс после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Пол	Σ доза	Сутки опыта				
		7	14	21	28	35
Самки	ТД	13,5 ± 1,5	23,5 ± 2,3	36,3 ± 3,8	61,4 ± 5,3	108,7 ± 7,4
	10 ТД	11,2 ± 2,0	20,9 ± 3,4	31,5 ± 4,2	64,0 ± 6,0	116,5 ± 8,7
	NaCl	16,0 ± 3,2	31,1 ± 3,1	42,7 ± 3,5	72,1 ± 5,8	129,5 ± 8,2
Самцы	ТД	12,5 ± 2,5	23,3 ± 2,9	31,0 ± 5,0	52,9 ± 4,7	103,2 ± 18,9
	10 ТД	14,0 ± 1,9	24,1 ± 4,2	40,6 ± 4,7	61,2 ± 5,1	102,7 ± 12,3
	NaCl	15,3 ± 2,1	27,3 ± 3,5	39,9 ± 3,9	65,9 ± 4,8	118,2 ± 9,1
Интактный контроль		15,8 ± 3,1	26,8 ± 4,0	35,7 ± 4,2	67,3 ± 5,2	124,8 ± 8,9

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

**Таблица 4.** Результаты наблюдения за физическим развитием потомства, рожденного от неинбредных крыс-самок после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель		Самки			Интактный контроль
		Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Общее число новорожденных		100	115	100	114
Число мертвых плодов		0	55	30	0
Индекс гибели (%)		0	48	30	0
Число погибших новорожденных		0	10	25	26
Дни гибели новорожденных (сут)		–	1–2	1–2	2–3
Число особей разного пола	самцы	50	30	20	42
	самки	50	20	25	46
Отлипание ушной раковины (сут)		2–4	2–4	2–4	2–4
Появление первичного волосяного покрова (сут)		4–5	4–5	4–5	4–5
Прорезывание резцов (сут)		6–8	6–9	6–8	6–9
Открытие глаз (сут)		13–14	13–14	13–14	13–14
Опускание семенников (сут)		23–25	24–25	24–25	23–25
Открытие влагалища (сут)		27–29	28–30	27–29	28–30
Средняя масса тела крысят на 35-е сутки (г)		108,7 ± 7,4	116,5 ± 8,7	129,5 ± 8,2	124,8 ± 8,9

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

самцами, зарегистрировано 30 и 27 мертвых плодов соответственно, в отличие от контрольных животных. У интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД, зарегистрировано 15 мертвых плодов в отличие от контрольных животных. У интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в 10 ТД, мертвых плодов не зарегистрировано, что не отличалось от показателей контрольных животных (табл. 8, 9).

Отмечено увеличение количества резорбций плодов в 5 раз у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД, по сравнению с контрольными животными. У интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в 10 ТД, количество резорбций плодов не отличалось от значений контрольных животных. Отмечено не зависящее от дозы увеличение количества резорбций плодов у крыс-самок, получавших

**Таблица 5.** Результаты наблюдения за физическим развитием потомства, рожденного от неинбредных крыс-самцов после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель		Самцы			Интактный контроль
		Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Общее число новорожденных		115	95	110	114
Число мертвых плодов		0	0	18	0
Индекс гибели (%)		0	0	16	0
Число погибших новорожденных		5	20	10	26
Дни гибели новорожденных (сут)		1–2	1–2	2–3	2–3
Число особей разного пола	самцы	60	35	45	42
	самки	50	40	37	46
Отлипание ушной раковины (сут)		2–4	2–4	2–4	2–4
Появление первичного волосяного покрова (сут)		4–5	4–5	4–5	4–5
Прорезывание резцов (сут)		6–9	6–8	6–9	6–9
Открытие глаз (сут)		13–14	13–14	13–14	13–14
Опускание семенников (сут)		23–25	23–25	24–25	23–25
Открытие влагалища (сут)		28–30	27–29	28–30	28–30
Средняя масса тела крысят на 35-е сутки (г)		103,2 ± 18,9	102,7 ± 12,3	118,2 ± 9,1	124,8 ± 8,9

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

**Таблица 6.** Результаты патологоанатомического исследования плодов на тератогенное действие, полученных от неинбредных крыс-самцов после введения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель		Самцы			Интактный контроль
		Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Внешний осмотр плодов					
Число обследованных плодов		119	120	214	238
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0
Состояние костной системы					
Число обследованных плодов		59	60	107	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0
Состояние внутренних органов					
Число обследованных плодов		60	60	107	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

ЛЛЛФ борхлорина: в 4 раза у крыс-самок, получавших препарат в ТД и спаренных с интактными

самцами, по сравнению с контрольными животными; у крыс-самок, получавших препарат в 10 ТД

**Таблица 7.** Результаты патологоанатомического исследования плодов на тератогенное действие, полученных от неинбредных крыс-самок после введения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель		Самки			Интактный контроль
		Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Внешний осмотр плодов					
Число обследованных плодов		165	122	212	238
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0
Состояние костной системы					
Число обследованных плодов		82	61	106	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0
Состояние внутренних органов					
Число обследованных плодов		83	61	106	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

**Таблица 8.** Результаты изучения эмбриотоксического действия лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина на неинбредных крысах-самках

Показатель		Самки			Интактный контроль
		Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Количество беременных самок		15	17	20	19
Количество желтых тел*		10,8	12,1	10,3	12,3
Количество мест имплантации*		11,5	12,1	11,1	12,5
Количество живых плодов*		11,0	7,2	10,6	11,9
Количество резорбций		4	2	1	1
Количество мертвых плодов		30	27	3	0
Предимплантационная гибель (%)		0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)		0	40,0	4,5	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)		5,3 ± 1,7	5,6 ± 1,8	6,6 ± 1,3	7,1 ± 1,2
Краниокаудальный размер (мм)		38,0 ± 8,9	39,0 ± 10,0	40,0 ± 9,7	40,0 ± 5,9

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. \*Среднее количество на 1 беременную самку.

и спаренных с интактными самцами, количество резорбций плодов практически не отличалось от значений контрольных животных (табл. 8, 9).

Процент постимплантационной гибели плодов у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, был практически одинаков и составлял 11,2 и 8 % соответственно, что более

чем в 2–2,5 раза превышало процент постимплантационной гибели плодов контрольных животных. Установлена высокая постимплантационная гибель плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами. Процент постимплантационной гибели плодов у животных в этой группе составлял 40 %. Постимплантационная гибель плодов



**Таблица 9.** Результаты изучения эмбриотоксического действия лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина на неинбредных крысах-самцах

Показатель	Самцы			Интактный контроль
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Количество беременных самок	15	13	20	19
Количество желтых тел*	7,9	7,2	8,6	12,3
Количество мест имплантации*	8,9	10,0	11,0	12,5
Количество живых плодов*	7,9	9,2	10,7	11,9
Количество резорбций	5	1	0	1
Количество мертвых плодов	15	1	0	0
Предимплантационная гибель (%)	0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)	11,2	8,0	2,7	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)	6,1 ± 1,9	6,5 ± 1,9	6,8 ± 1,3	7,1 ± 1,2
Краниокаудальный размер (мм)	37,0 ± 8,9	39,0 ± 7,1	39,0 ± 6,9	40,0 ± 5,9

**Примечание.** NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. \*Среднее количество на 1 беременную самку.

у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в дозе, соответствующей ТД, отсутствовала. Процент постимплантационной гибели плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в дозе, соответствующей ТД, не отличался от контрольных значений (табл. 8, 9).

Установлено отсутствие предимплантационной гибели плодов у животных во всех изученных группах (см. табл. 8, 9).

### Заключение

ЛЛЛФ борхлорина при ежедневном в/в введении крысам-самцам в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, влияет на репродуктивную функцию самцов по критериям оценки мужской фертильности, вызывая снижение способности к оплодотворению и зачатию и постимплантационную гибель плодов (индексы способности к оплодотворению и зачатию 75 и 65 %, постимплантационная гибель плодов 11,2 и 8 % соответственно).

ЛЛЛФ борхлорина при ежедневном в/в введении крысам-самкам в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, влияет на репродуктивную функцию самок по критериям оценки женской фертильности, вызывая снижение способности к оплодотворению и зачатию и дозозависимую постимплантационную гибель плодов (индексы способности к оплодотворению и зачатию 75 и 85 % соответственно). Препарат вызывает постимплантационную гибель плодов только у крыс-самок, получавших препарат в суммарной дозе 10 ТД (40 %).

ЛЛЛФ борхлорина при ежедневном в/в введении крысам-самцам и крысам-самкам в суммарных

дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, не вызывает предимплантационную гибель плодов.

Физическое развитие потомства, родившегося от интактных самок, оплодотворенных крысами-самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и от интактных самцов, спаренных с крысами-самками, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, практически не отличалось от физического развития потомства контрольных животных.

Скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания у потомства, родившегося от интактных самок, оплодотворенных крысами-самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и от интактных самцов, спаренных с крысами-самками, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, не отличалась от скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов потомства контрольных животных.

Наружный осмотр плодов, исследование головного мозга, скелета и внутренних органов плодов не выявил тератогенного действия ЛЛЛФ борхлорина во всех изученных дозах.

ЛЛЛФ борхлорина обладает эмбриотоксическим действием, вызывая постимплантационную гибель плодов у интактных самок, оплодотворенных крысами-самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и у крыс-самок, получавших препарат только в суммарной дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами.

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что ЛЛЛФ борхлорина обладает повреждающим действием на репродуктивную функцию самцов и самок и внутриутробное развитие плодов (эмбриотоксичность) неинбредных крыс по индексу способности к оплодотворению и зачатию и по индексу постимплантационной гибели плодов. Постимплантационная гибель плодов

в наибольшей степени (40 %) выражена у самок, получавших препарат в суммарной дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами. ЛЛЛФ борхлорина не вызывает предимплантационную гибель плодов, не оказывает тератогенного действия, влияния на физическое развитие потомства и скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания потомства.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Методические рекомендации по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств. Ведомости Фармакологического Комитета 1998;1:13–20.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 87–100.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. С. 80–93.