

1.2 Аналіз можливої репродуктивної токсичності пропоксазепаму на самицях білих щурів: вплив на потомство

Розробка лікарського засобу є поетапним процесом, що включає отримання даних щодо його безпеки та оцінку ефективності препарату на тваринах і людях. Завдання доклінічної оцінки безпеки зазвичай включають характеристику токсичного впливу на органи-мішені, дозозалежність, взаємозв'язок з експозицією, і, за необхідності, потенціал зворотності дії. Ці дані використовуються для встановлення безпечної стартової (початкової) дози, діапазону доз для клінічних випробувань, а також визначення параметрів клінічного моніторингу потенційних побічних ефектів.

Застосування лікарських засобів у період вагітності на сьогодні залишається одним із найменш вивчених, але дуже важливих питань клінічної фармакології. У свою чергу, антимікробні, психотропні та анальгетичні лікарські засоби займають особливе місце у клінічній практиці, оскільки призначаються дуже часто завдяки своєму безпосередньому впливу на відповідні біомішені. При цьому адекватна та своєчасна терапія відіграє ключову роль у збереженні життя та запобіганні негативним наслідкам як для матері, так і для дитини. Тому актуальною проблемою є визначення можливих основних показників поонатального розвитку потомства експериментальних тварин, які отримували різні дози відповідного препарату, що було предметом вивчення на прикладі інноваційної сполуки пропоксазепам, яка володіє анальгетичними та протизапальними властивостями [17].

Репродуктивна здатність щурів-самиць була вивчена у відповідності до Настанови ICH S5(R2) [18] та Настанови OECD Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment ENV/JM/MONO(2008)16 [19], у обсязі вимог ДП "Державний експертний центр МОЗ України" (Наказ МОЗ №944 від 14.12.2009) [20] та з дотриманням правил Належної Лабораторної Практики. Умови дослідження дозволили отримати інформацію щодо впливу досліджуваного тест-зразка на репродуктивну функцію

білих щурів самиць та постнатальний розвиток потомства F0 за умов повторних внутрішньошлункових уведень.

Статевозрілі віргінні самиці, відібрані для експерименту, були поміщені до кліток відповідно до дозових груп по 4 особини у кожен на період введення тест-зразка. На період парування самиці були розсажені в індивідуальні клітки. Розподіл самиць та самців на групи був наступний: контроль (0,5% метилцелюлоза), пропоксазепам– 0,90; 4,50 та 9,00 мг/кг маси тіла. Усі помітні ознаки незадовільного стану здоров'я та відхилень у поведінці реєструвались щоденно у період досліджень між 10-00 год. та 12-00 год. та о 17-00. У вихідні дні спостереження за тваринами проводилось один раз на день між 10-00 та 12-00. Реєстрували початок, тривалість та ступінь виразності будь-яких відхилень від норми чи загибель тварини. Спостереження за тваринами тривали протягом усього періоду експозиції досліджуваного препарату, під час спаровування із інтактними самцями, протягом вагітності та постнатального розвитку потомства. Індивідуальна маса тіла самиць щурів до вагітності реєструвалась відразу після отримання та починаючи від першого дня введення препарату. Зміни маси тіла враховували при визначенні доз тест-зразка, а також для визначення відносної маси репродуктивних органів.

Через 16 днів від початку введення тест-зразку проводилось дослідження його впливу на естральний цикл самиць (протягом 2-3 естральних циклів). Після закінчення дослідження естрального циклу самиць на стадії проєструсу підсаджували до інтактних самців для спаровування. Для парування тварин розсаджували у клітки в співвідношенні 1 : 1. Першим днем вагітності вважали день виявлення сперматозоїдів у вагінальному мазку самиць. Через 19 днів від дня настання вагітності було проведено евтаназію 16 самиць з кожної групи (шляхом цервікальної дислокації) та лапаротомію. Безпосередньо перед евтаназією всі тварини були зважені.

У знеживлених самиць після лапаротомії були вилучені роги матки з яєчниками для дослідження. Був проведений підрахунок жовтих тіл та місць імплантації, вилучені і зважені плоди, визначена кількість живих та мертвих

плодів, їх стать, наявність аномалій розвитку. Решта піддослідних самиць, що були спаровані з інтактними самцями, була залишена до природних пологів за постійного спостереження за їх станом.

Дослідження впливу пропоксазепаму на розвиток потомства показало (табл. 1), що введення даної сполуки самицям щурів в усіх трьох дозах не викликає суттєвих негативних змін показників постнатального розвитку в перший день постнатального життя їх потомства.

Таблиця 1.

Вплив різних доз пропоксазепаму на показники потомства в перший день постнатального життя ($M \pm m$)

Група	Контроль	Доза пропоксазепаму, мг/кг		
		0,90	4,50	9,00
Загальна кількість новонароджених	43	41	43	42
Кількість новонароджених на один приплід	10,75±1,31	10,25±0,48	10,75±1,31	10,50±0,29
Загальна кількість живих щурят	42	41	42	41
Кількість живих щурят на один приплід	10,50±1,26	10,25±0,48	10,50±0,29	10,25±0,25
Загальна кількість мертвонароджених	1	0	1	1
Кількість мертвонароджених на один приплід	0,25±0,25	0	0,25±0,25	0,25±0,25
Загальна кількість самців/ самиць у приплоді	27/16	26/15	31/12	26/16
Кількість самців/ самиць у приплоді на один приплід	6,75±1,11/ 4,00±1,91	6.50±0.87/ 3.75±0.75	7,75±1,03*/ 3,00±1,08	6.50±0.29/ 4.00±0.09

Загальна кількість новонароджених, кількість новонароджених на один приплід, загальна кількість живих щурят, кількість живих щурят на один приплід, загальна кількість мертвонароджених, кількість мертвонароджених на один приплід, загальна кількість самців/ самиць у приплоді, кількість самців / самиць у приплоді на один приплід в усіх дослідних групах вірогідно не відрізнялась від відповідних показників контрольної групи і знаходились в межах фізіологічних показників для даного виду тварин [21]. Виняток склала лише кількість самиць у приплоді на один приплід у групі, що одержувала пропоксазепам у дозі 4,50 мг/кг.

Отже, пропоксазепам не спричиняє суттєвої негативної дії на фізичний розвиток потомства до кінця вагітності і не підвищує показники смертності новонароджених в перший день постнатального життя.

За результатами вивчення смертності в ранньому постнатальному періоді потомства самиць щурів, яким вводили пропоксазепам у трьох дозах (табл. 2) на 4-й день смертність потомства в усіх дослідних групах, крім тих тварин, що отримували максимальну дозу сполуки була відсутня, а при введенні у максимальній дозі (9,00 мг/кг) вона складала 9,76%.

У той же час, введення пропоксазепаму в усіх трьох дозах призводило до однакових рівнів смертність потомства на 7-й день (у порівнянні з контролем), що не перевищували 2,44%.

На 14-й день відзначалось зростання показників смертності у експериментальних групах. Якщо у потомства самиць щурів, яким вводили пропоксазепам у дозі 0,90 мг/кг, цей показник не перевищував рівень контрольної групи, то при введенні у дозах 4,50 та 9,00 мг/кг він зростав у 4,4 – 5,6 раз. На 21-й день смертність потомства в усіх дослідних групах не виходила за межі 2,44%. Рівень загальної смертність потомства самиць щурів, яким вводили пропоксазепам у дозі 0,90 мг/кг не перевищував рівня даного показника у контрольної групи, а при введенні у дозах 4,50 та 9,00 мг/кг він зростав у 5,13 – 6,00 раз.

Таблиця 2.

Вплив пропоксазепаму на смертність щурят протягом трьох тижнів
постнатального життя (Абс, %)

Група тварин	Кількість щурят в групі на 1-й день	Смертність щурят				
		на 4-й день	на 7-й день	на 14-й день	на 21-й день	загальна
Контроль	42	0	0	3 (7,14%)	0	3 (7,14%)
Пропоксазепам, 0,90 мг/кг	41	0	1 (2,44%)	1 (2,44%)	1 (2,44%)	3 (7,32%)
Пропоксазепам, 4,50 мг/кг	42	0	1 (2,38%)	16 (38,12%)	1 (2,38%)	18 (42,9%)
Пропоксазепам, 9,00 мг/кг	41	4 (9,76%)	1 (2,44%)	9 (32,00%)	1 (21,95%)	15 (36,60%)

Дані щодо впливу введення пропоксазепаму самицям на життєздатність їх потомства в ранньому постнатальному періоді (період вигодовування самицею) свідчать, що загибель щурят у вказані в таблиці терміни життя при впливі на самиць мінімальної дози даного препарату приблизно відповідає природним фізіологічним показникам відбору нежиттєздатного організму. Те ж можна відзначити і у випадку застосування проміжної дози пропоксазепаму стосовно смертності щурят на 4-й, 7-й та 21-й дні. При введенні його самицям у дозі 9,00 мг/кг вже на 4-й день смертність потомства складала 9,76 %. Крім того, на 14-й день постнатального розвитку максимальна та проміжна дози препарату підвищували показники смертності потомства в порівнянні з контролем у 4,4-5,6 раз.

Дані щодо впливу введення пропоксазепаму самицям на зростання маси тіла їх потомства в ранньому постнатальному періоді (період вигодовування самицею) (табл. 3) свідчать, що цей показник у приплодів у відповідні терміни життя при впливі на самиць мінімальної та середньої доз даної сполуки вірогідно не відрізнялись від відповідних показників контрольної групи. Введення

пропоксазепаму в дозі 9,00 мг/кг призводило до вірогідного зниження даного показника.

Таблиця 3.

Вплив пропоксазепаму на масу тіла приплоду протягом трьох тижнів
постнатального життя (г, $M \pm m$)

	Маса тіла приплоду (г)			
	на 4-й день	на 7-й день	на 14-й день	на 21-й день
Контроль	94,05±11,66	114,52±12,21	170,83±11,00	233,95±11,72
Пропоксазепам, 0,90 мг/кг	89,83±4,62	117,00±5,80	191,12±9,56	255, 32±14,41
Пропоксазепам, 4,50 мг/кг	83,12±5,76	108,80±8,55	149,80±11,06	232,53±4,04
Пропоксазепам, 9,00 мг/кг	74,8324±5,15*	88,48±4,43*	112,35±19,01*	199,03±18,60*

Результати вивчення впливу тривалого введення досліджуваного препарату самицям на терміни появи основних ознак фізичного розвитку у їх потомства наведені в таблиці 4.

Як випливає з наведених вище даних, введення самицям щурів пропоксазепам дозозалежно впливає на терміни появи ознак, що характеризують нормальний фізичний розвиток їх потомства інтактних самок: відлипання вушних раковин, прорізання різців, відкриття очей, опускання сім'яників. Однак відзначені вірогідні зміни від показників контрольної групи не виходять за межі фізіологічної норми для даного виду тварин [21].

Крім того, в результаті спостережень за станом і розвитком щурят всіх груп, не відзначено жодного випадку з патологією зору, слуху або інших помітних зовнішніх аномалій розвитку, що проявляються в постнатальному періоді життя тварин.

Результати дослідження деяких сенсорно-рухових рефлексів потомства (рефлекси згинання, хапання, перевертання, встановлення лапи на опору, рівноваги, рогівковий, здригання, розчепірювання пальців задніх кінцівок) не виявили жодних відмінностей між контрольною та усіма дослідними групами. За

дослідженими показниками, можна зробити висновок, що тривале введення досліджуваного препарату щурам самицям не спричинює негативного впливу на швидкість дозрівання сенсорно-рухових рефлексів у їх потомства.

Таблиця 4.

Показники фізичного розвитку щурят - потомства самиць, які отримували пропоксазепам у трьох дозах (дні, $M \pm m$)

Група	Контроль	Доза пропоксазепаму, мг/кг		
		0,90	4,50	9,00
Відлипання вушних раковин	2,62±0,10	2,43±0,10	2,50±0,09	2,27±0,07*
Поява первинного волосяного покриву	4,40±0,08	4,24±0,07	4,54±0,10	4,68±0,11*
Прорізання різців	7,05±0,13	6,88±0,14	6,90±0,14	8,06±0,24*
Відкриття очей	13,56±0,10	12,85±0,11*	13,21±0,24	13,59±0,14
Опускання сім'яників	27,00±0,16	25,61±0,26*	25,65±0,15*	24,93±0,21*
Відкриття піхви	33,62±0,62	29,36±0,13*	30,56±0,18*	30,64±0,15*

Дані спостережень психомоторної поведінки щурят, проведені методом «відкритого поля», представлені в таблиці 5. (результати у таблиці представлені у вигляді: Медіана (верхній кuartиль; нижній кuartиль). Згідно отриманих даних рухова активність, що характеризувалася тривалістю латентного періоду її початку та кількістю перетнутих твариною периферичних квадратів, під дією препарату у різних дозах зазнала змін. Так, з підвищенням дози латентний період локомоторної активності зменшувався, причому у випадку 10-ти кратної дози пропоксазепаму відмінності мали статистично достовірний характер. Кількість перетнутих квадратів «Відкритого поля» також збільшувалася за застосування препарату у терапевтичній дозі, проте за подальшого збільшення дози відмінності від контрольних значень зникали.

Таблиця 5.

Показники емоційно-рухової активності щурят – потомства самиць, які отримували пропоксазепам у трьох дозах (Me (Q1;Q3))

Показник	Контроль	Доза пропоксазепаму, мг/кг		
		0,90	4,50	9,00
Латентний період, сек	5,62(2,99;7,6)	3,43(2,75;4,99)*	3,33(2,88;3,81)*	2,75(2,44;3,62)*
Горизонтальна активність (кількість пересічених квадратів)				
Центральні	2(1;5)	6(3;7)*	3(2;5)	2,5(2;5)
Периферичні	47(30;61)	62(48;74)*	52(32;64)	56,5(41;88)
Кількість „стійок”	19(15;27)	26(19;35)*	13,5(11;18)*	13,5(10;20)*
Кількість „зазирань у нірки”	5(4;6)	4(3;6)	4(2;6)	6(4;9)
Грумінг (кількість умивань)	3(1;4)	3(1;4)	2(1;5)	2(1;4)
Тривалість грумінгу, сек	14,1(3,2;20,8)	11(8;18)	8(1;14)*	3,3(1;10,3)
Уринації (кількість сечовиділень)	0(0;2)	0(0;2)	0(0;2)	0(0;2)
Дефекації (кількість болюсів)	4(3;5)	3(0;5)	4(1;5)	2(0;3)*

Дослідницько-пошукову активність оцінювали за показниками кількості «стійок» (піднімань на задні лапи задля збільшення простору дослідження), зазирань у «нірки» (отвори у підлозі експериментальної установки «відкрите поле»), а також кількості перетнутих центральних квадратів «поля». Дані спостережень свідчать про те, що препарат модифікував рівень дослідницької активності у різних напрямках в залежності від дози пропоксазепаму: за дози 0,90 мг/кг маси тіла спостерігалось вірогідне підвищення кількості «стійок» у експериментальних щурят порівняно з контрольною групою, проте вже за дози 4,50 мг/кг маси тіла цей показник знижується, досягаючи значень, достовірно відмінних від контрольних. Подібна ситуація мала місце і за дози 9,00 мг/кг маси тіла. Кількість перетнутих центральних сегментів «відкритого поля» за дії препарату у терапевтичній дозі 0,90 мг/кг маси тіла збільшилась до статистично відмінного від контролю рівня. Подальше збільшення дози пропоксазепаму не мало такого ефекту, даний показник залишався на рівні контрольних значень. За показником зазирань у «нірки» щурята експериментальних груп не відрізнялися від контрольних.

Емоційний стан тварин оцінювався за характеристиками грумінгу (догляд за зовнішнім покривом тіла) а також кількістю актів дефекації та уринації. За більшістю цих показників щурята експериментальних груп достовірно не відрізнялися від контрольних, за виключенням статистично значущого зменшення тривалості грумінгу у групі тварин, що отримували пропоксазепам у дозі 4,50 мг/кг маси тіла. Разом з тим ми можемо констатувати зменшення тривалості грумінгу при незмінній кількості його актів у всіх експериментальних групах. Також варто зазначити достовірне зменшення рівня дефекацій у щурят, що отримували максимальну дозу препарату.

З огляду на вищезазначене, можна припустити, що експериментальний препарат здійснює статистично значущі впливи на психомоторну поведінку потомства самиць, що одержували препарат пропоксазепам у всіх трьох дозах. Отримані результати свідчать, що рівень локомоторної активності у щурят всіх трьох дослідних груп підвищувався відносно контрольного, причому, найяскравіше ці відмінності проявилися у групі тварин, що отримували терапевтичну дозу препарату. Разом з тим дані свідчать про дозозалежні зміни рівня дослідницько-пошукової активності, коли за терапевтичної дози спостерігається вірогідне збільшення її показників, а за подальшого збільшення дози пропоксазепаму ця активність вірогідно пригнічується порівняно з контролем. Всі ці зміни супроводжуються певним підвищення рівня емоційного напруження у тварин експериментальних груп.

Таким чином, результати дослідження постнатального розвитку потомства самиць, яким вводили пропоксазепам в трьох дозах, показали, що за деякими критеріями фізичного розвитку і даними емоційно-рухової поведінки у тварин всіх дослідних груп відзначені вірогідні зміни у порівнянні із відповідними показниками норми для цього виду тварин. При цьому у досліджених тварин не спостерігалось видимих зовнішніх вад розвитку, які могли б проявитися в постнатальному періоді життя та жодних відмінностей між контрольною та усіма дослідними групами щодо сенсорно-рухових рефлексів потомства.