

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)



SECHENOV
UNIVERSITY

КОНФИДЕНЦИАЛЬНО

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
член-корр. РАН, д.м.н., профессор

_____ А.А. Свистунов

«___» _____ 2022 г.

ИТОГОВЫЙ ОТЧЕТ

Исследование острой токсичности на мышах

Код исследования: PRC-118-atm

	Ф.И.О.	Дата	Подпись
Проведено:	Харькова О.О.		
	Специалист Центра ДКИ		
Составлено:	Харькова О.О.		
	Специалист Центра ДКИ		
Согласовано:	Морозова Е.Л.		
	Сотрудник СОК		
Утверждено:	Недорунов А.А.		
	Руководитель Центра ДКИ		

Москва, 2022

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 2 из 26

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подразделение: Центр доклинических исследований, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Место нахождения: 118418, Москва, Нахимовский пр., 45.

Телефон-факс: +7(499) 248-01-81

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 3 из 26

ЗАКЛЮЧЕНИЕ РУКОВОДИТЕЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наименование исследования: «Исследование острой токсичности на мышах».

Руководитель исследования (ФИО): Харькова Ольга Олеговна

Адрес: 118418, Москва, Нахимовский пр., 45.

Настоящей подписью заверяю, что результаты исследований, представленные в данном отчете достоверны. Исследование проведено в соответствии с Решением Совета ЕЭК №81 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Руководитель исследования:

Подпись

Харькова О.О.
Расшифровка подписи

« »
Дата

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 4 из 26

ОТЧЕТ ОБ ОБЕСПЕЧЕНИИ КАЧЕСТВА

Исследование выполнялось согласно ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с требованиями OECD Principles on Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM (98) 17).

В ходе проведения доклинического исследования PRC-118-atm «Исследование острой токсичности на мышах» проведены три инспекционные проверки. Отчеты о проведенных инспекционных проверках были переданы руководителю исследования и руководству лаборатории 26.10.2022. С результатами проверки руководитель исследования был ознакомлен в течение 24-х часов после окончания процедуры аудита.

06.10.2022 была проведена проверка протокола доклинического исследования PRC-118-atm.

11.10.2022 были проверены все процедуры на соответствие их выполнения протоколу исследования. В ходе аудита отклонений от протокола не было выявлено.

25.10.2022 была осуществлена проверка первичных данных исследования ДКИ PRC-118-atm и записей по лабораторному исследованию с данными и записями, на соответствие протоколу исследования. В ходе мониторингового визита отклонений от протокола исследования не выявлено.

Представленные в Отчете данные в полной мере соответствуют первичным данным исследования. Отклонений, влияющих на целостность, качество данных и интерпретацию результатов, выявлено не было.

ДКИ PRC-118-atm и Отчет соответствуют требованиям GLP.

ФИО	Подпись	Дата
Морозова Е.Л.		
Пятигорская Н.В.		

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 5 из 26

ОТВЕТСТВЕННЫЙ ПЕРСОНАЛ

Выполняемые функции	Должность	ФИО	Подпись
Руководитель исследования:	Специалист по доклиническим исследованиям	Харькова О.О.	
ПЕРСОНАЛ, ВЫПОЛНЯЮЩИЙ ИССЛЕДОВАНИЯ			
Уход и манипуляции с животными	Специалист по доклиническим исследованиям	Фокеев Ю.Ф.	
Провизор	Специалист по доклиническим исследованиям	Подколзина П.Л.	
Клиническая патология и ветеринарный контроль	Вет.врач.	Померанцева Т.Я.	
Соответствие принципам GLP	Специалист СОК	Морозова Е.Л.	

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 6 из 26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GLP	— «Good Laboratory Practice» — «Надлежащая лабораторная практика»
ЛД10	— пороговая доза (минимальная смертельная доза), вызывающая гибель членов испытываемой группы в 10% случаев
ЛД16	— токсическая доза, вызывающая гибель членов испытываемой группы в 16% случаев
ЛД50	— полуметальная доза, средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы (50% случаев)
ЛД84	— токсическая доза, вызывающая гибель членов испытываемой группы в 84% случаев
ЛД99	— минимально абсолютно смертельная доза, вызывающая гибель членов испытываемой группы в 99% случаев
СОП	— Стандартные операционные процедуры
М	— групповое среднее арифметическое
SEM	— стандартная ошибка среднего
КИ	— Клинические исследования
ЦДКИ	— Центр доклинических исследований, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)
БЭК (ЭК)	— Биоэтическая комиссия

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 7 из 26

ОГЛАВЛЕНИЕ

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ	2
ОТЧЕТ ОБ ОБЕСПЕЧЕНИИ КАЧЕСТВА	4
ОТВЕТСТВЕННЫЙ ПЕРСОНАЛ	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ОГЛАВЛЕНИЕ	7
РЕЗЮМЕ	8
1. ВВЕДЕНИЕ	10
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ	10
3. РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ	10
4. СТАНДАРТЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ОБРАЩЕНИЕ С ЖИВОТНЫМИ	11
5. КОМИССИЯ ПО БИОЭТИКЕ	11
6. ДАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
7. АРХИВИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8. ДАННЫЕ ОБ ИССЛЕДУЕМОМ ВЕЩЕСТВЕ	12
8.1. Исследуемый препарат	12
8.2. Плацебо	13
9. ТЕСТ-СИСТЕМА	13
9.1. Вид, количество, пол, возраст животных	13
9.2. Обоснование выбора вида животных	13
9.3. Источник получения животных	13
9.4. Карантин/Акклиматизация	13
9.5. Условия содержания животных	14
9.6. Подстил	14
9.7. Корм и вода	14
9.8. Клетки для содержания животных	14
9.9. Материалы и оборудование, необходимые для проведения исследования	14
10. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ	15
10.1. Идентификация животных и распределение по группам	15
10.2. Процедура введения вещества	16
11. НАБЛЮДЕНИЯ И ИЗМЕРЕНИЯ В ХОДЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	16
11.1. Клинический осмотр	16
11.2. Масса тела	17
11.3. Патоморфология	17
11.3.1. Эвтаназия	17
11.3.2. Некропсия	17
11.4. Анализ данных	17
12. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ НА МЫШАХ	18
12.1. Внешний вид и клиническое состояние мышей	18
12.2. Прирост массы тела	19
12.3. Макроскопическое исследование	20
13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	21
14. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	23
ПРИЛОЖЕНИЯ	24
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Индивидуальные значения массы тела мышей	24
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Заключение комиссии по биоэтике	26

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 8 из 26

РЕЗЮМЕ

В настоящем Отчете представлены результаты исследования острой токсичности при однократном пероральном введении на мышах.

На исследования было получено *Nadsoniella nigra*, серия 5, дата август 2022, годность 12 месяцев. Исследование проводили при пероральном пути введения на половозрелых аутбредных мышах обоего пола в следующих дозах: 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2000 мг/кг, в объеме 50 мл/кг животного (растворитель – физиологический раствор). Группе контроля вводили растворитель в объеме 50 мл/кг животного (физиологический раствор).

На протяжении эксперимента гибели животных не зафиксировано. Во всех группах животные выглядели здоровыми, активно поедали корм, адекватно реагировали на раздражители, проявляли исследовательский интерес. Шерстный покров густой, ровный и блестящий, плотно прилегал к поверхности тела, выпадения или ломкости шерсти не выявлено. Мышечный тонус не отличался повышенной возбудимостью. Ушные раковины без корок, не воспалены, подергиваний не замечено. Зубы обычного цвета, без поломок. Мыши были средней упитанности, истощением не страдали. Область живота в объеме не увеличена. Дыхание ровное, незатрудненное. Слюноотделение в норме. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, мышечный тонус, рефлексы соответствовали физиологической норме. Поведение опытных животных не отличалось от контрольных.

Из-за отсутствия гибели животных расчёт летальных доз (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄) невозможен. На основании гибели животных, исследуемый препарат можно отнести к 4 классу токсичности (малотоксичный) по «Классификации токсичности по Hodge и Sterner (1943)» при пероральном введении.

Статистический анализ данных массы тела мышей показал, что исследуемые препараты статистически достоверно не влияли на динамику набора массы тела мышей при пероральном введении (критерий Краскела-Уоллиса, $p > 0,05$).

Некропсия, проведенная на 14 сутки исследования, не выявила отклонений в структуре внутренних органов мышей, макроскопическое исследование животных экспериментальных групп, получавших исследуемые препараты пероральном в трех дозах, не выявило отличий от контрольной группы.

Таким образом, в настоящем исследовании показана высокая безопасность *Nadsoniella nigra*, серия 5, дата август 2022 при однократном пероральном введении на аутбредных мышах обоего пола.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 9 из 26

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 10 из 26

1. ВВЕДЕНИЕ

Объектом исследования являлась *Nadsoniella nigra*, серия 5, дата август 2022.

Метод определения класса острой токсичности основан на биометрических оценках с фиксированными дозами так, чтобы было возможно оценить вещество по степени опасности и систематизировать результаты. Метод, принятый в 1996 году, был в значительной степени подтвержден *in vivo*, в отличие от данных по, полученных из литературы, как в масштабах страны, так и в международном масштабе. Верхний лимит дозы ограничен испытанием предельно-допустимой дозы в 2000 мг/кг.

Цель острой токсичности – определение LD50, класса токсичности исследуемого соединения. Однако, в принципе метод не предназначен для подсчета точной LD50, но позволяет определить заданный интервал воздействия, когда предполагается летальный исход, так как смертность относительно количества животных остается главным ожидаемым результатом такого исследования.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель исследования:

Изучение токсичности исследуемых препаратов при однократном пероральном введении мышам.

Задачи исследования:

- Определить переносимые, максимально переносимые и при возможности летальные дозы исследуемого препарата при однократном введении мышам обоего пола при пероральном пути введения. На основании данных, полученных в ходе изучения токсичности при однократном введении препарата, определить чувствительность мышей к токсическому действию препаратов (рассчитать коэффициент видовой чувствительности), широту терапевтического действия, широту токсического действия, широту смертельного действия, оценить местную переносимость;
- На основании анализа полученных данных сделать вывод о степени опасности исследуемых препаратов при однократном введении мышам обоего пола.

3. РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ

Основными документами, регламентирующими объем, схему и процедуру проведения экспериментов являются:

- Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 11 из 26

- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»;
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (Под общей редакцией Хабриева Р.У. – 2 -изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина»»), Москва 2005;
- ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. Миронова А.Н., М., ФГБУ «НЦЭМСП»- 2012 г., в 2-х томах), Москва 2012;

4. СТАНДАРТЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ОБРАЩЕНИЕ С ЖИВОТНЫМИ

- ГОСТ 34566-2019 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия - ГОСТ от 23 августа 2019 г.
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8-е издание, NRC 2011);
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных Phoenix Control Vivarium Sourcebook (5-е издание, 2008);
- ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

5. КОМИССИЯ ПО БИОЭТИКЕ

На 118-ом заседании Комиссии по биоэтике, которое состоялось 27.09.2022, была подтверждена необходимость проведения исследования острой токсичности препарата при однократном введении на мышах. Протокол 118-го заседания Комиссии по биоэтике приложен к итоговому отчету в Приложении 3.

Общее количество животных – мыши 80 голов (40 самцов и 40 самок).

Согласно принципам 3R (снижение (Reduction), уменьшение дистресса (Refinement), замена (Replacement)) [1], Комиссия по биоэтике одобрила использование данного количества животных и отсутствие возможности его сокращения.

Комиссия по биоэтике гарантирует использование животных в научных целях в соответствии с общепризнанными научными, этическими и юридическими нормами и

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 12 из 26

подтверждает ответственность исследователей, деятельность которых подлежит контролю со стороны комиссии по биоэтике.

6. ДАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

24.08.2022 - дата инициации исследования

11.10.2022 - дата начала эксперимента

25.10.2022 - дата окончания эксперимента

08.11.2022 - дата окончания исследования

7. АРХИВИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перечень документов и материалов, которые были переданы в архив по окончании исследования:

- Расчеты и записи приготовления доз для введения;
- Данные клинического наблюдения за животными во время исследования;
- Данные массы тела;
- Данные некропсии;
- Копия протокола заседания по биоэтической экспертизе;
- Заметки и другая письменная информация, касающаяся исследования;
- Протокол и поправки, отклонения от Протокола исследования.
- Характеризация тестируемых образцов;
- Отчет о проведенном исследовании.

Продолжительность хранения материалов **5 лет**, по истечении которых Исполнитель обязуется проинформировать Заказчика о завершении периода хранения документов в архиве и передать по запросу Заказчику.

Адрес архива: Москва, Нахимовский проспект, д. 45, Архив ДКИ

8. ДАННЫЕ ОБ ИССЛЕДУЕМОМ ВЕЩЕСТВЕ

8.1. Исследуемый препарат

Таблица 1. Описание исследуемого препарата PRC-118/1.

Наименование препарата:	Nadsoniella nigra
Международное непатентованное название:	-
Производитель:	
Лекарственная форма:	порошок
Состав:	

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 13 из 26

Описание:	сухой черный порошок
Серия:	5
Условия хранения:	Комнатная температура
Дата изготовления:	август 2022
Срок годности:	12 мес

8.2. Плацебо

В качестве плацебо для пероральном введении был использован физиологический раствор.

Таблица 2. Описание плацебо.

Название препарата:	Натрия хлорид 0,9%, 200 мл фл.
Производитель:	ООО «МОСФАРМ», Россия
Лекарственная форма:	Раствор для инфузий
Состав:	Натрия хлорид 9 г, вода для инъекций до 1 л, 0,1М раствор хлористоводородной кислоты до pH 5,0 – 7,5, 0,1М раствор натрия гидроксида до pH 5,0 – 7,5.
Описание:	Прозрачная бесцветная жидкость
Серия:	0970520
Условия хранения:	Не более +25 °С в сухом месте.
Срок годности:	до 05.2023

9. ТЕСТ-СИСТЕМА

9.1. Вид, количество, пол, возраст животных

В исследовании было использовано 80 аутбредных мышей (40 самок и 40 самцов), массой 18-20 грамм, возрастом 3-4 недели.

9.2. Обоснование выбора вида животных

Аутбредные (беспородные) мыши являются релевантным видом для исследования токсичности, рекомендованы Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. Миронова А.Н., М., ФГБУ «НЦЭМСП»- 2012 г., в 2-х томах), Москва 2012. Использование данного вида животных необходимо для получения объективных данных по безопасности ЛС для получения разрешения на клинические исследования.

9.3. Источник получения животных

Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

9.4. Карантин/Акклиматизация

После поступления животных содержали в карантине 5 суток, в соответствии с СОП Ц ДКИ-045-3.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 14 из 26

9.5. Условия содержания животных

Во время эксперимента животных содержали в контролируемых условиях:

- температура окружающего воздуха 20-24 °С;
- относительная влажность 45-65 %;
- смена светового периода (08:00-20:00 – день, 20:00-08:00 – ночь).

Санитарные мероприятия будут проведены в соответствии с СОП Ц-ДКИ-056-3, СОП Ц-ДКИ-031-3.

9.6. Подстил

В качестве подстилки были использованы опилки мягких хвойных пород древесины (ООО «Лабораторкорм», Россия).

9.7. Корм и вода

Пищевой рацион состоял из полнорационного гранулированного комбикорма для лабораторных животных (производства ООО «Провими») (произведенный по ГОСТ 34566-2019 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия - ГОСТ от 23 августа 2019 г.). Место хранения открытых упаковок корма в специальных пластиковых баках: помещение 320. Относительная влажность воздуха не более 80%, температура 20-24°С. Животные получали воду из центрального водопровода (соответствующую СанПиН 2.1.3684-21) и имели свободный доступ к корму и воде.

9.8. Клетки для содержания животных

Животных содержали в поликарбонатных клетках, размером 325x210x180 мм, площадью 682,5 см² системы ИВК-Вент-Био-1М с индивидуальной вентиляцией, на подстилке, оборудованных стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток. Количество животных в одной клетке – 5 особей.

9.9. Материалы и оборудование, необходимые для проведения исследования

Таблица 3. Материалы и оборудование, использованные для проведения исследования

№	Процедура	Перечень оборудования и материалов	Спецификация	Кол-во
1	Уход за животными	1. Клетки с аксессуарами	Размер 325x210x180 мм, из поликарбоната	16
		2. Решетки	Из нержавеющей стали, для клетки, размером 325x210 мм	16
		3. Разделители	Из нержавеющей стали, размер 6x9 см	16
		4. Карточкодержатели	Вент-БИО-1М	1
		5. Стеллажи	ООО «Провими» ГОСТ Р 34566-2019	10 кг
		6. Корм	ООО «Лабораторкорм»	40 кг
		7. Опилки		

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 15 из 26

№	Процедура	Перечень оборудования и материалов	Спецификация	Кол-во
		8. Дезинфектанты	Биадез, Бианол	4 л
		9. Рабочая одежда:	-	30 компл.
2	Введение препарата	1. Шприцы одноразовые	1 мл. Игла №29G	80 шт.
3	Реактивы	2. Фукорцин	Фукорцин, флакон с раствором для наружного применения, 10 мл, Самарамедпром, Россия	1 шт
4	Контроль прироста массы тела	1. Весы	Ohaus Scout Spx	1 шт.

10. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1. Идентификация животных и распределение по группам

В эксперименте по определению токсичности препарата при однократном введении на мышах, включая анализ местно-раздражающего действия, были использованы аутбредные мыши обоего пола. После прохождения 5 суток карантина, каждому животному был присвоен индивидуальный номер в соответствующей клетке (от 1 до 5), и нанесена красящая метка фукорцином в соответствии с СОП «Порядок формирования групп животных». На этикетке клетки указывали следующую информацию: код эксперимента, вид, линию, пол животных, даты начала и окончания эксперимента, ФИО руководителя исследования. Мышей распределяли по группам случайным образом, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 10 % от средней массы тела животных в одной группе.

Животные были распределены по группам, в соответствии с дозами вводимого вещества.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 16 из 26

Таблица 4. Распределение животных по группам, описание манипуляций.

Животные	Препарат	Доза	Количество животных	Код группы	Манипуляции
Мыши аутбредные	Nadsoniella nigra	500 мг/кг	10♂+10♀	118-104	Однократное введение, взвешивание животных до введения и на 7 и 14 сутки эксперимента, регистрация клинической картины ежедневно, эвтаназия на 14 сутки исследования
		1000 мг/кг	10♂+10♀	118-205	
		2000 мг/кг	10♂+10♀	118-306	
	Плацебо	-	10♂+10♀	118-001	

10.2. Процедура введения вещества

Исследуемые препараты вводили однократно перорально мышам.

Препараты вводили перорально мышам в трех дозах: 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2000 мг/кг, в объеме 1,0 мл на 20 г животного (растворитель – физиологический раствор). Группе контроля вводили физиологический раствор в объеме 1,0 мл на 20 г животного.

10.3. Период наблюдения

После введения препарата за животными наблюдали в течение 14 суток.

11. НАБЛЮДЕНИЯ И ИЗМЕРЕНИЯ В ХОДЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1. Клинический осмотр

Клинический осмотр животных проводили ежедневно в течение 14 дней, регистрируя признаки интоксикации и число павших животных. Фиксировали следующие параметры функционального состояния лабораторных животных:

- Активность – вялость, нормальная активность, повышенная активность;
- Передвижение – нарушения координации, мышечный тонус, тремор.
- Внешний вид:
 - состояние – ожирение, норма, истощение, кахексия;

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 17 из 26

- шерсть – блестящая, тусклая, гладкая, торчащая, выпадение шерсти;
- глаза – слезотечение, воспаление помутнение роговицы, адгезия;
- уши – цвет: норма, бледность, покраснение; воспаление, выделение секрета, образование струпа, подергивание;
- зубы – цвет, поломка, потеря;
- конечности – цвет, отек.
- Физиологические функции:
 - дыхание – учащенное, нормальное замедленное, свистящее, хрипящее, затрудненное;
 - слюноотделение – недостаточное или избыточное;
 - слюна – водянистая или липкая;
 - моча – цвет;
 - экскрет – цвет, качество.

11.2. Масса тела

Животных взвешивали до начала исследования, на 7-е и 14-е сутки от начала эксперимента. Первичные данные фиксировали согласно СОП Ц-ДКИ-018-3.

11.3. Патоморфология

11.3.1. Эвтаназия

На 14-е сутки от начала эксперимента, была осуществлена запланированная эвтаназия животных методом дислокации шейных позвонков, в соответствии с СОП Ц-ДКИ-049-3.

11.3.2. Некропсия

Проводили полную некропсию тел всех животных, в соответствии с СОП Ц-ДКИ-026-3. При некропсии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями и скелетно-мышечную систему.

При некропсии уделяли особое внимание осмотру следующих органов и тканей: головной мозг, сердце, легкие, тимус, щитовидная железа, селезенка, печень, почки, желудок, поджелудочная железа, кишечник, семенники, яичники, влагалище, тело матки и ткани, окружающие места введения препарата, лимфатические узлы (как местные, так и удаленные от места введения).

11.4. Анализ данных

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 18 из 26

Расчет летальных доз (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄, ЛД₉₉) проводился ретроспективно с применением программы Probit Analysis 4.0 (OriginLab, Free License). Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM) или стандартное отклонение (SD) с использованием программы Microsoft Excel (версия 14.0, 32-разрядная). Статистический анализ количественных данных проводили в SPSS Statistics 17.0 (версия 23.08.2008).

12. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ НА МЫШАХ

12.1. Внешний вид и клиническое состояние мышей

Результаты гибели мышей при пероральном введении исследуемых препаратов представлены в таблице 8.

Таблица 5. Гибель мышей при п/о введении

Кол-во животных	Группы	Препарат	Доза, мг/жив	Гибель/Общее	Комментарии
10♂+10♀	118-104	Nadsoniella nigra	500 мг/кг	0/10 ♂ 0/10 ♀	Гибель отсутствует
10♂+10♀	118-205		1000 мг/кг	0/10 ♂ 0/10 ♀	Гибель отсутствует
10♂+10♀	118-306		2000 мг/кг	0/10 ♂ 0/10 ♀	Гибель отсутствует
10♂+10♀	118-001	Плацебо	-	0/10 ♂ 0/10 ♀	Гибель отсутствует

Во всех дозовых группах, получавших препарат Ру 0023, на протяжении эксперимента все животные оставались живы. Во всех дозовых группах, получавших препарат ОХ 0071, на протяжении эксперимента все животные оставались живы. Во всех дозовых группах, получавших препарат ОХ 0072, на протяжении эксперимента все животные оставались живы. Во всех дозовых группах, получавших препарат ОХ 0073, на протяжении эксперимента все животные оставались живы.

Во всех группах все животные выглядели здоровыми, активно поедали корм, адекватно реагировали на раздражители, проявляли исследовательский интерес. Шерстный покров густой, ровный и блестящий, плотно прилегал к поверхности тела, выпадения или ломкости шерсти не выявлено. Мышечный тонус в норме. Ушные раковины без корок, не воспалены, подергиваний не замечено. Зубы нормального цвета, без поломок. Мыши были средней упитанности, не истощены. Вздутия не отмечали. Дыхание ровное, незатрудненное. Саливация не увеличена. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, мышечный тонус, рефлексы соответствовали физиологической

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 19 из 26

норме.

Из-за отсутствия гибели животных расчёт летальных доз (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄) невозможен. На основании гибели животных, исследуемые препараты Ру 0023, ОХ 0072, ОХ 0071 и ОХ 0073 можно отнести к 4 классу токсичности (малотоксичный) по «Классификации токсичности по Hodge и Sterner (1943)» при пероральном введении.

12.2. Прирост массы тела

Вычисляли прирост массы тела в процентах. Средние значения по группам начальной массы тела, массы тела на 7 и 14 сутки и общий прирост указаны в Таблице 9. Индивидуальные значения массы тела животных указаны в Приложении 1.

Сравнение групп с помощью критерия Краскела-Уоллиса не выявило различия между весами мышей экспериментальных и контрольной групп ($p > 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса).

Таблица 6. Масса (г) мышей самцов и самок при однократном пероральном введении препарата.

Ру 0023												
Сутки	Самцы						Самки					
	118-104		118-205		118-306		118-104		118-205		118-306	
	М	SD										
0 сутки	20,45	0,96	20,63	0,77	20,78	0,74	18,66	0,37	19,00	0,65	18,86	0,64
7 сутки	24,39	1,41	24,84	1,25	24,99	0,62	21,80	0,69	22,09	0,57	22,07	0,92
14 сутки	28,12	1,55	29,32	1,37	28,76	0,72	24,53	0,97	24,96	0,70	24,86	0,97
% прироста массы тела												
0 сутки	0		0		0		0		0		0	
7 сутки	19,3		20,4		20,3		16,8		16,3		17,0	
14 сутки	37,5		42,2		38,4		31,5		31,4		31,8	
Плацебо												
Сутки	Самцы				Самки							
	118-001				118-001							
	М		SD		М		SD					
0 сутки	20,48		1,12		19,31		0,48					
7 сутки	24,73		1,28		22,07		0,50					
14 сутки	28,74		1,55		24,86		0,96					
% прироста массы тела												
0 сутки	0				0							
7 сутки	20,8				14,3							
14 сутки	40,3				28,7							

Таким образом, статистический анализ данных массы тела мышей показал, что исследуемые препарат статистически достоверно не влияют на динамику набора массы тела мышей при пероральном введении.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 20 из 26

12.3. Макроскопическое исследование

Животных из эксперимента выводили на 14-е сутки.

118-001 (Плацебо):

Животные средней упитанности. Шерстный покров густой, ровный, блестящий, без загрязнений, не взъерошенный, без алопеций. Кожа чистая, признаков раздражения кожи в местах введения препарата не выявлено. Состояние естественных отверстий, а также конечностей и хвоста без патологии.

Расположение внутренних органов правильное. Свободной жидкости в плевральной и брюшной полостях не обнаружено. Просвет трахеи и бронхов свободен, слизистая чистая, влажная, блестящая.

Ниже представлены результаты макроскопического исследования.

Головной мозг физиологической формы, розового цвета, без кровоизлияний, оболочка тонкая, прозрачная, покровы мозга влажные, блестящие, умеренного кровенаполнения. Полушария имеют симметричный рисунок, мозговое вещество умеренной плотности.

Тимус физиологической формы, сероватый, эластичный, без кровоизлияний.

Щитовидная железа плотная, красноватого цвета, прочно прилегает к гортани.

Сердце правильной формы, размер не увеличен, красно-коричневого цвета, миокард упругий, блестящий, волокна выражены хорошо. Сосуды и клапаны хорошо выражены.

Легкие наполнены, светло-розовые, эластичные, имеют гладкую мягкую поверхность.

Селезенка не увеличена, вытянутой продолговатой формы, темно-красного цвета, поверхность гладкая, консистенция плотная.

Печень правильной формы, все листы хорошо различимы, бардового цвета, не увеличена, плотно-эластичной консистенции, гладкая и блестящая. Капсула тонкая, прозрачная. Желчный пузырь отчётливо виден, не увеличен, цвет желчи темно желтый.

Почки правильной бобовидной формы, темного красно-коричневого цвета, плотно-эластичной консистенции, фиброзная капсула легко отделяется. На разрезе хорошо видна граница коркового и мозгового слоев.

Желудок без вздутия, обычной формы и размеров. Слизистая оболочка складчатая, розового цвета, блестящая, без кровоизлияний и эрозии.

Поджелудочная железа белого цвета, дольчатая, без изменения.

Кишечник без вздутия и спаек. Слизистая блестящая, гладкая.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 21 из 26

Семенники желтовато-белого цвета, мягко-эластичной консистенции, капсула гладкая.

Слизистая **влагалища** гладкая, блестящая, собрана в отчетливые продольные влагалищные складки.

Яичники имели неровную зернистую поверхность, округлую форму.

Тело матки умеренно плотное, поверхность гладкая, желтовато-розового, иногда красного цвета, полость без содержимого. Рога тонкие, длинные.

Место введения препарата не определяется. Негативных реакций в месте введения нет.

Макроскопическое исследование на 14 сутки не выявило у мышей экспериментальных групп различия с группой контроля. Описание макроскопического исследования внутренних органов экспериментальных групп мышей, получавших препарат *Nadsoniella nigra* в дозах 500 мг/кг, 1000 мг/кг и 2000 мг/кг, не отличается от контрольной группы.

13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем Отчете представлены результаты исследования острой токсичности при однократном пероральном введении на мышах.

Исследование проводили на половозрелых аутбредных мышах обоего пола в следующих дозах: 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2000 мг/кг, в объеме 50 мл/кг животного (растворитель – физиологический раствор). Группе контроля вводили растворитель в объеме 50 мл/кг животного (физиологический раствор).

На протяжении эксперимента гибели животных не зафиксировано. Во всех группах животные выглядели здоровыми, активно поедали корм, адекватно реагировали на раздражители, проявляли исследовательский интерес. Шерстный покров густой, ровный и блестящий, плотно прилегал к поверхности тела, выпадения или ломкости шерсти не выявлено. Мышечный тонус не отличался повышенной возбудимостью. Ушные раковины без корок, не воспалены, подергиваний не замечено. Зубы обычного цвета, без поломок. Мыши были средней упитанности, истощением не страдали. Область живота в объеме не увеличена. Дыхание ровное, незатрудненное. Слюноотделение в норме. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, мышечный тонус, рефлекс соответствовали физиологической норме. Поведение опытных животных не отличалось от контрольных.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 22 из 26

Из-за отсутствия гибели животных расчёт летальных доз (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄) невозможен. На основании гибели животных, исследуемый препарат можно отнести к 4 классу токсичности (малотоксичный) по «Классификации токсичности по Hodge и Sterner (1943)» при пероральном введении.

Статистический анализ данных массы тела мышей показал, что исследуемые препараты статистически достоверно не влияли на динамику набора массы тела мышей при пероральном введении (критерий Краскела-Уоллиса, $p > 0,05$).

Некропсия, проведенная на 14 сутки исследования, не выявила отклонений в структуре внутренних органов мышей, макроскопическое исследование животных экспериментальных групп, получавших исследуемые препараты пероральном в трех дозах, не выявило отличий от контрольной группы.

Таким образом, в настоящем исследовании показана высокая безопасность *Nadsoniella nigra* при однократном пероральном введении на аутбредных мышах обоего пола.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 23 из 26

14. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. EMA Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches [Электронный ресурс]. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-principles-regulatory-acceptance-3rs-replacement-reduction-refinement-testing-approaches_en.pdf. (дата обращения: 10.03.2022).
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, ред. А.Н. Миронов, М., «Гриф и К», 2012, 944 с.

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 24 из 26

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Индивидуальные значения массы тела мышей.

Таблица 9. Индивидуальные значения массы тела (г) самцов и самок мышей.

Группа	Самцы				Группа	Самки			
	№	0 сутки	7 сутки	14 сутки		№	0 сутки	7 сутки	14 сутки
118-104	1	20,14	24,09	27,9	118-104	1	18,42	20,88	23,06
	2	21,73	26,6	30,02		2	18,4	22,07	24,44
	3	19,27	22,39	25,43		3	18,33	20,64	23,4
	4	19,51	24,01	28,19		4	19,06	21,24	23,88
	5	20,64	24,2	27,52		5	18,27	22,18	26,13
	6	19,89	24,41	28,01		6	18,98	21,81	24,3
	7	21,38	25,25	30,15		7	18,92	22,91	25,88
	8	19,53	22,83	26,35		8	18,23	22,21	25,02
	9	21,92	26,59	29,87		9	18,72	21,94	24,59
	10	20,47	23,53	27,74		10	19,24	22,12	24,55
M		20,4	24,4	28,1	M		18,7	21,8	24,5
SD		0,96	1,41	1,55	SD		0,37	0,69	0,97
118-205	1	20,03	23,32	28,31	118-205	1	18,61	21,51	24,21
	2	19,64	23,55	28,25		2	18,5	21,57	24,7
	3	20,91	24,44	28,88		3	18,3	22,16	24,17
	4	20,17	24,75	29,09		4	19,67	22,98	25,4
	5	21,58	26,34	30,91		5	19,82	22,9	26,19
	6	21,38	26,15	30,96		6	19,4	21,87	25,5
	7	21,74	26,32	30,19		7	18,05	21,41	24,41
	8	20,04	24,52	29,38		8	19,79	22,56	25,61
	9	20,88	25,84	30,57		9	19,22	21,7	25,15
	10	19,9	23,21	26,7		10	18,67	22,25	24,3
M		20,6	24,8	29,3	M		19,0	22,1	25,0
SD		0,77	1,25	1,37	SD		0,65	0,57	0,70
118-306	1	21,11	25,81	28,83	118-306	1	18,21	21,48	23,81
	2	20,77	24,94	28,54		2	18,97	22,93	25,71
	3	21,58	25,17	29,8		3	19,98	23,84	27,02
	4	21,47	25,06	29,28		4	18,4	22,09	25,09
	5	20,57	25,36	28,7		5	18	21,04	23,98
	6	20,3	25,13	29,38		6	18,95	22,35	25,03
	7	20,26	23,85	27,27		7	19,55	22,88	25,01
	8	19,43	23,96	28		8	19,25	21,36	24,04
	9	20,44	25,3	29,01		9	18,28	21,56	24,39
	10	21,87	25,32	28,78		10	19	21,13	24,51
M		20,8	25,0	28,8	M		18,9	22,1	24,9
SD		0,74	0,62	0,72	SD		0,64	0,92	0,97
118-001	1	21,67	26,31	31,03	118-001	1	19,98	22,09	24,87
	2	21,39	25,39	28,48		2	19,42	21,9	24,99

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 25 из 26

	3	19,08	23,32	28,29		3	19,78	22,26	24,6
	4	21,08	24,36	28,47		4	18,98	22,26	24,26
	5	19,35	23,16	26,29		5	18,84	20,87	22,9
	6	21,75	26,41	30,48		6	19,61	22,66	26,55
	7	21,86	25,96	30,02		7	18,43	21,77	24,38
	8	19,36	24,15	28,23		8	19,05	22,04	25,47
	9	19,66	23,2	26,63		9	19,44	22,33	24,94
	10	20,76	25,07	29,47		10	19,6	22,56	25,6
M		20,5	24,7	28,7	M		19,3	22,1	24,9
SD		1,12	1,28	1,55	SD		0,48	0,50	0,96

Итоговый отчёт	Исследование острой токсичности на мышах	 СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Код исследования	PRC-118-atm	Стр. 26 из 26

Приложение 2. Заключение Комиссии по биоэтике.

117-е заседание Комиссии по биоэтике

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова
Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

27.09.2022 г., кафедры фармакологии Института фармации и биотехнологии, проспект Вернадского 96, корпус 1, (117-е заседание).

Время заседания: 15.00 – 16.00

Присутствовали:

Председатель Комиссии – Чубарев Владимир Николаевич;
Заместитель председателя Комиссии – Шахмарданова Светлана Анатольевна;
Члены комиссии – Лузин Александр Владимирович

Повестка дня:

Использование лабораторных животных в доклинических исследованиях:

«Исследование острой токсичности на мышах»

Лабораторные животные:

Мыши аутбредные – 130 самцов и 130 самок, 18-20 г.

Обсуждения:

- Условия, необходимые для содержания животных
- Опыт и квалификация сотрудников, принимающих участие в исследовании
- Регулирующие стандарты

Принятые решения:

В Центре доклинических исследований есть все необходимые условия для проведения исследований на лабораторных животных в соответствии со стандартом GLP. Все сотрудники, принимающие участие в исследовании имеют большой опыт работы в доклинических исследованиях. Объем исследований регламентируются Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Миронов 2012 г. А так же Федеральным законом "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ.

Все работы выполняются в соответствии с принципом GLP по ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Комиссия по биоэтике подтвердила необходимость проведения доклинического исследования острой токсичности препаратов на животных. Комиссия по биоэтике гарантирует использование животных в научных целях в соответствии с общепризнанными научными, этическими и юридическими нормами и подтверждает ответственность исследователей, деятельность которых подлежит контролю со стороны комиссии по биоэтике.

Председатель Комиссии по биоэтике

Заместитель председателя Комиссии

Члены комиссии

 проф., к.б.н.; Чубарев В. Н.
 Шахмарданова С.А.
 Лузин А.В.