

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ (ФБУН ГНЦ ПМБ)

УТВЕРЖДАЮ



2019 г.

ОТЧЕТ
ОБ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАНИЯХ
«Исследования острого токсического действия нового лекарственного
вещества ОСТЕОМЕД Форте *in vivo*»
(по договору № 708-н/2018 от 12.11.2018 г.)

Оболенск 2019

Манужанов

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Зам. директора
доктор биол. наук

И.Г. Шемякин

Старший научный
сотрудник
канд. биол. наук

Т.И. Комбарова

Науч. сотрудник

Т.И. Рудницкая

Старший научный
сотрудник,
канд. мед. наук

О.Ю. Манзенюк

Младший научный
сотрудник

Я.О. Мунтян

Реферат

Отчет: 27 с., 4 табл., 2 рис.

Мыши беспородные, крысы линейные Вистар (Wistar), острое токсическое действие, активные компоненты препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», ЛД50 - средняя летальная доза.

В отчете представлены результаты исследований, проведенных по договору № 708-н/2018 от 12 ноября 2018 г. между ООО «ПАРАФАРМ» и ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ).

Объектом исследования являются: комплексный препарат «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» для профилактики и комплексной терапии остеопороза, остеопении и сопутствующих им заболеваний (артрита, артроза, остеохондроза и других патологий опорно-двигательной системы, а также пародонтита); в реабилитационный период при переломах для профилактики остеопороза и других травм костей и суставов.

Цель исследования: экспериментальное изучение острого токсического действия и определение класса опасности нового препарата ОСТЕОМЕД ФОРТЕ при однократном пероральном и парентеральном введении крысам Вистар и беспородным мышам и наблюдение за животными в течение 14 дней.

Область применения – медицина

Реферат	
ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ.....	5
Регулирующие стандарты.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
1. Материалы и методы.....	7
2. Программа исследований.....	11
3. Результаты исследований.....	16
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	16
Приложение 1.....	17
Приложение 2. Ветеринарный протокол.....	19

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

per os	perorальное (внутрижелудочное) введение
в/бр.....	внутрибрюшинное введение
ЛД50	средняя летальная доза
МЕ.....	международная единица

Регулирующие стандарты

Все работы проводились в соответствии со следующей нормативно- технической документацией:

1. СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29.08.2014г;
2. Правила лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации №267 от 19.06.2003);
3. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями №1,2);
4. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва, 2005 с.40-46;
5. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Гриф и К, 2012;
6. «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств». Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М. Гриф и К, 2012, с. 13-24.
7. Директива Совета Европы - 2010/63 EU

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Материалы и методы

Реактивы и приборы

Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру 4 °C («Stinol», Россия);

Шкаф вытяжной Ш2НЖ (Россия);

Ламинарный шкаф «Лабораторные системы» для работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности (Россия);

Пробирки лабораторные полипропиленовые с закручивающимися пробками вместимостью 15 мл и 50 мл, стерильные («Corning Costar», США);

Пробирки микроцентрифужные вместимостью 0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл («Eppendorf», Германия);

Наконечники для регулируемых автоматических пипеток («Eppendorf» Германия);

Пипетки регулируемые автоматические вместимостью 0,5-10, 10-100, 100-1000 мкл («Eppendorf», Германия);

Пипетки стерильные пластиковые градуированные вместимостью 0,1-1,0; 2,0 мл («Corning Costar», США);

Пробирки микробиологические стеклянные по ГОСТ 1770-74;

Спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ Р 51652-2000;

Перекись водорода 30 % по ГОСТ 177-88;

Животные

Вид: крысы линейные Вистар, мыши беспородные

Пол: самцы и самки

Возраст: 8-10 недель

Количество животных: крысы линейные Вистар (Wistar) – 30 голов (15 самцов и 15 самок); мыши беспородные 40 голов (20 самцов и 20 самок).

Масса тела: 175-190г, 20-23г соответственно.

Поставщик: Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ МБА России.

Условия содержания и кормление

Размещение животных и условия содержания будут соответствовать виду(мыши, крысы) в поликарбонатных микроизоляторах «LabProducts Inc.» (США) и обеспечивать стандартность проведения исследований, согласно СП2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29.08.2014г.

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (при температуре от 18 до 26 °С и относительной влажности воздуха от 30 до 70 %). Освещение с чередованием 12 часов света и 12 часов темноты. Воздухообмен в помещениях для содержания животных должен составлять 12-15 об/ч.

В исследовании в качестве стандартного рациона используют гранулированные полнорационные корма ПК-120 для содержания мышей и крыс, изготовленный по ТУ 9296-002-70941247-2005 (ООО «Лабораторкорм»). Корм и воду давали *ad libitum*.

Обеспечение соблюдения принципов гуманного обращения с подопытными животными
Все предполагаемые в данном исследовании манипуляции с животными, а также условия их кормления и содержания одобрены биоэтической комиссией.

Схема эксперимента при определении острой токсичности, обоснование выбора тест-системы, условий применения и введения тестируемого вещества.

В качестве лабораторных моделей использовали опытные и контрольные группы животных (крысы линейные Вистар и беспородные мыши), широко используемые в исследованиях безопасности новых лекарственных средств.

Лекарственное средство «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» оказывает многоуровневое действие: способствует регуляции фосфорно-кальциевого обмена, эффективному и безопасному восстановлению и формированию структуры костной ткани; подавляет костную резорбцию и стимулирует остеогенез; увеличивает минеральную плотность костной ткани. Являясь источником природных прогормонов, препарат способствует безопасной нормализации гормонального фона и формированию коллагена.

Исследуемый препарат предназначен для перорального применения взрослым по 2 таблетки массой 500мг 2 раза в день во время еды. Продолжительность приема – 1 месяц. У мелких лабораторных животных токсичность фармакологического вещества исследуют при нескольких путях введения, перорально – путь, при котором была показана специфическая активность средства «ОСТЕОМЕД Форте». Парентеральный путь введения может дать ориентировочные данные о скорости и степени всасывания средства. Общие условия распределения животных по группам и дозирования препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» приведены в таблице 1.

Табл. 1. Расчет доз для перорального и парентерального (внутрибрюшинного) введения препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ».

	Доза (мг/кг)	Путь введения	Количество животных (5-самок и 5-самцов)	Кол-во введений	Масса тела 1животного	Кол-во вещества (мг)	Объем дозы (мл/сут)
Мыши	5000	per os	10	1	0.022	1320	0.5

	2000	per os	10	1	0.022	528	0.5
	2000	в/бр*	10	1	0.022	528	0.5
Крысы	5000	per os	10	1	0.2	12000	3.0
	2000	per os	10	1	0.2	4800	3.0
per os – перорально; *внутрибрюшенно - парентерально							

Полученные результаты должны обеспечить возможность вычисления ЛД₅₀ – средней летальной дозы, которая вызывает гибель 50% подопытных животных при однократном введении в желудок, с последующим 14- дневным сроком наблюдения. Если препарат обладает низкой токсичностью, тогда следует указать максимальную дозу, которая вводилась животным, но не менее 2 г/кг.

Распределение по группам и идентификация животных

Животные были распределены по группам рандомизированно, с использованием в качестве основного критерия величину массы тела таким образом чтобы различия в массе тела между особями одного пола не превышали 20%.

Идентификация животных была произведена методом этикирования клеток.

Методы исследования

Прижизненные манипуляции с животными.

В первый день после введения препарата животные находились под непрерывным наблюдением, а далее осуществляли ежедневный осмотр животных в первой половине дня в течение 14 суток. Массу тела животных определяли ежедневно в течение 7 суток и по окончанию срока наблюдения на 14 сутки. Определяли поедаемость корма и воды в течение 3-х первых суток с начала исследования.

Эвтаназия

Эвтаназия животных была проведена согласно международным нормам гуманного обращения с животными (Директива Совета Европы - 2010/63 EU) посредством СО₂ ингаляции.

Патоморфологическая картина

Массу тела, определенную после ночи голодания перед некропсией, использовали для определения массовых коэффициентов органов (масса органа в граммах в расчете на 1кг массы тела).

Предмет исследований

Предметом исследований является:

«ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» - комплексный препарат для профилактики и комплексной терапии остеопороза, остеопении и сопутствующих им заболеваний (артрита, артроза, остеохондроза и других патологий опорно-двигательной системы, а также пародонтита); в

реабилитационный период при переломах, для профилактики остеопороза и других травм костей и суставов.

Исследуемые препараты

В ходе исследования использовали двукратные серийные разведения исследуемого препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» (таблетка и отдельные активные компоненты без наполнителя - премикс).

Табл. 2. Рецептура препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» по ТУ 9197-060-41395157-12 с изм.

№ 1

Наименование ингредиентов	Количество ингредиентов, мг/табл	Количество ингредиентов, %
Цитрат кальция (активный компонент)	250,0	50,0
Лактоза (вспомогательный компонент, наполнитель)	188,0	37,6
Гомогенат трутневый адсорбированный (активный компонент)	50,0	10,0
Кальций стеариновокислый (вспомогательный компонент, скользящее вещество)	10,0	2,0
Витамин D ₃ (субстанция с активностью 100000 МЕ/г) (активный компонент)	1,5 (150 МЕ)	0,3
Пиридоксина гидрохлорид (активный компонент)	0,5	0,1
Итого:	500,0	100,0

Описание и характеристики исследуемого препарата.

«ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» - таблетка круглой формы, с гладкой поверхностью, белого с желтоватыми вкраплениями цвета.

Состав: каждая таблетка содержит:

Витамин В₆ (пиридоксина гидрохлорид)(0,5мг)

Витамин D₃ (холекальциферол)(3,75мкг)

Цитрат кальция(250мг)

Органический анаболический компонент природного происхождения (гомогенат трутневый адсорбированный с витамином В₆).

Вспомогательные вещества: лактоза(188,0), кальций стеариновокислый(10,0мг)(добавка, препятствующая слеживанию и комкованию).

2. Программа исследований

План исследования и его дизайн разработаны в соответствии с «Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия лекарственных средств».

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.- М. Гриф и К, 2012.-с. 13-24.

В доклиническом исследовании по изучению острой токсичности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» целью является определение переносимых и летальных доз вещества и причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации при однократном введении исследуемого вещества.

В экспериментальном исследовании в качестве тест-систем взяты крысы Вистар и беспородные мыши, широко используемые при испытаниях безопасности новых лекарственных средств.

С учетом назначения, условий применения в программу исследований препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», производитель ООО «ПАРАФАРМ» входило: оценка острой токсичности при разных путях поступления в организм (перорально и парентерально).

2.1. Ключевые даты исследования

Дата начала исследования: 17.05.2019 г.

Дата окончания исследования: 30.05.2019 г.

2.2 Ответственные за выполнение этапов исследования:

Формирование групп животных, введение препарата, клинические наблюдения:

Комбарова Т.И., Рудницкая Т.И.

2.2 Обеспечение условий содержания и кормления животных, ветеринарный контроль:

Комбарова Т.И., Рудницкая Т.И., Мунтян Я.О.

План исследования и его дизайн разработаны в соответствии с «Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия лекарственных средств».

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.- М. Гриф и К, 2012.-с. 13-24.

2.3. Схема эксперимента по определению острой токсичности, обоснование выбора тест-системы, условий применения и введения тестируемого вещества.

В качестве лабораторных моделей использовали опытные и контрольные группы животных (крысы Вистар и беспородные мыши), широко используемые в исследованиях безопасности новых лекарственных средств.

Лекарственное средство «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» оказывает многоуровневое действие: способствует регуляции фосфорно-кальциевого обмена, эффективному и безопасному восстановлению и формированию структуры костной ткани; подавляет костную резорбцию и стимулирует остеогенез; увеличивает минеральную плотность костной

ткани. Являясь источником природных прогормонов, препарат способствует безопасной нормализации гормонального фона и формированию коллагена.

Исследуемый препарат предназначен для перорального применения взрослым по 2 таблетки массой 500мг 2 раза в день во время еды. Продолжительность приема – 1 месяц. У мелких лабораторных животных токсичность фармакологического вещества исследуют при нескольких путях введения, перорально – путь, при котором была показана специфическая активность средства «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» и парентеральном пути введения, который может дать ориентировочные данные о скорости и степени всасывания средства.

Общие условия распределения животных по группам и дозирования препарата Остеомед форте приведены в таблице 1.

Табл. 1. Расчет доз для перорального и парентерального (внутрибрюшинного) введения препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ».

	Доза (мг/кг)	Путь введения	Количество животных (5-самок и 5- самцов)	Кол-во введений	Масса тела 1животного	Кол- во веще- ства (мг)	Объем дозы (мл/сут)
Мышь	5000	per os	10	1	0.022	1320	0.5
	2000	per os	10	1	0.022	528	0.5
	2000	в/бр*	10	1	0.022	528	0.5
Крысы	5000	per os	10	1	0.2	12000	3.0
	2000	per os	10	1	0.2	4800	3.0
per os – перорально; *внутрибрюшно - парентерально							

Полученные результаты должны обеспечить возможность вычисления ЛД₅₀ – средней летальной дозы, которая вызывает гибель 50% подопытных животных при однократном введении в желудок, с последующим 14- дневном сроком наблюдения. Если препарат обладает низкой токсичностью, тогда следует указать максимальную дозу, которая вводилась животным, но не менее 2 г/кг.

3. Результаты

Оценка острой токсичности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ».

Изучение острой токсичности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» проводили на крысах линии Вистар и на белых беспородных мышах (самках и самцах, массой тела 180 – 195 и 20 – 22 грамма соответственно). Исследуемый препарат вводили внутрижелудочно крысам в объеме 3 мл и мышам в объеме 0.5 мл, контрольным животным вводили дистиллированную воду в том же объеме. Мышам дополнительной группы вводили

исследуемый препарат внутрибрюшинно в объеме 0.5 мл (оценивали степень проникновения в паренхиматозные органы).

На протяжении всего периода (24 часа) наблюдения гибели животных не было зарегистрировано, не отмечалось изменений внешнего вида, поведения, двигательной активности по сравнению с контрольной группой животных.

Изучение острой токсичности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» проводили на крысах Вистар и на белых беспородных мышах (самках и самцах, массой тела 180 – 195 и 20 – 22 грамма соответственно). Исследуемый препарат вводили внутрижелудочно крысам в объеме 3 мл и мышам в объеме 0.5 мл, контрольным животным вводили дистиллированную воду в том же объеме. Мышам дополнительной группы вводили исследуемый препарат внутрибрюшинно в объеме 0.5 мл (оценивали степень проникновения в паренхиматозные органы).

На протяжении всего периода (24 часа) наблюдения гибели животных не было зарегистрировано, не отмечалось изменений внешнего вида, поведения, двигательной активности по сравнению с контрольной группой животных.

В период наблюдения проводили учет веса тела животных. Данные учета веса тела животных представлены в таблице 2.

Табл. 2 . Динамика изменения веса тела крыс и мышей при оценке острой токсичности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ».

	Вес самок крыс Вистар							
	1	2	3	4	5	6	7	14
5000мг/кг в/ж	188.3	188.5	188.6	190	190	190.3	190.7	192.5
2000мг/кг в/ж	182.8	183,3	189,2	192,7	198,8	200,7	201,1	203,8
контроль	178.9	180.1	180.3	181	181.2	181.5	182.1	184.2

Вес самцов крыс Вистар

	Все самцов крыс Вистар							
	1	2	3	4	5	6	7	14
5000мг/кг в/ж	193.6	193.9	194	195.3	196.8	198.1	198.8	204.3
2000мг/кг в/ж	186,9	188,8	193,5	201,7	206.1	210,9	215,9	219,9
контроль	189.5	190.1	192.7	193.1	193.7	194.5	196.7	200.7

Вес самок мышей

	1	2	3	4	5	6	7	14
5000мг/кг в/ж	22,2	23,9	25,8	27,5	28,0	29,4	29,7	30,6
2000мг/кг в/ж	22,3	23,9	25,5	26,4	27,1	28,1	29,0	29,8
5000 мг/кг в/бр	22,2	22,2	23,9	25,7	27,2	29,2	30,7	31,3
контроль	21,7	22,1	22,6	24,1	24,8	26,7	28,5	29,7

Вес экспериментальных животных независимо от дозы препарата и пути введения был сопоставим с группой контроля, что указывает на безвредность испытуемого препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ».

Для характеристики токсического действия препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» учитывали потребление корма и воды. Данные учета потребления корма представлены в таблице 3.

Табл. 3. Потребление корма и воды животными после однократного внутрижелудочного введения биологически активной добавки «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в первых 3-х суток наблюдения.

Вид животных	Пол	Доза мг/кг	Количество корма съеденного за сутки, г/животное			Количество выпитой воды за сутки, мл/животное		
			1 сутки	2 сутки	3 сутки	1 сутки	2 сутки	3 сутки
крысы	самки	5000	16,7	16,0	16,4	20,5	22,2	23,2
	самцы	5000	18,1	19,1	18,7	24,5	23,1	24,1
	самки	2000	16,6	17,4	17,9	23,6	22,8	24,8
	самцы	2000	17,2	17,6	18,5	24,7	23,9	25,9
	самки	0	16,3	16,9	16,8	22,8	23,6	24,6
	самцы	0	17,3	18,5	18,9	24,6	25,4	25,4
мыши	самки	5000	3,3	4,1	4,5	5,4	5,2	5,0
	самцы	5000	4,9	5,2	5,2	6,0	6,7	7,2
	самки	2000	4,5	4,6	4,7	5,6	5,4	6,6
	самцы	2000	5,0	5,5	5,3	6,0	6,2	7,0
	самки	0	5,2	5,3	5,0	5,4	5,6	5,5
	самцы	0	5,6	5,4	5,3	6,3	6,1	6,2

Полученные данные свидетельствуют о том, что количество съеденного корма и употребление воды соответствует нормам суточного употребления корма и воды в контрольной группе.

По окончании эксперимента провели эвтаназию животных СО₂ – ингаляцией с визуальным макроскопическим исследованием внутренних органов животных и определением относительной массы органов.

На вскрытии животных макроскопических патологических изменений внутренних органов и тканей подопытных животных не выявлено. Органы расположены в брюшной и грудной полости свободно, признаков воспаления брюшины и кишечника не отмечено.

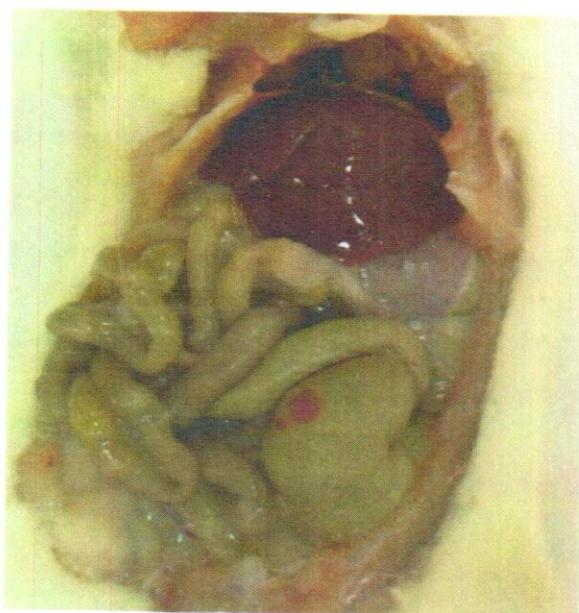


Рис. 1. Брюшная и грудная полость крысы Вистар при дозе введения 5000мг/кг препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ».



Рис. 2. Брюшная и грудная полость мыши при дозе введения 5000мг/кг препарата добавки «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ».

При патологоанатомическом осмотре состояние органов брюшной и грудной полости было без отклонений от нормы (селезенка темно-красного цвета, эластичная, с блестящей прозрачной капсулой; печень красно-коричневого цвета, поверхность блестящая, консистенция плотная; почки темные, красно-коричневого цвета, консистенция плотно-эластичная; легкие светло-розовые, воздушные, эластичные, висцеральная плевра - гладкая и блестящая).

Для оценки состояния внутренних органов использовали массовый коэффициент (МК) – процентное отношение массы органа к массе тела.

Расчет массовых коэффициентов производили по формуле:

$MK = \frac{\text{Масса органа (г)}}{\text{масса тела}} \times 100\%$, этот показатель при токсикологических исследованиях дает возможность обнаружения органа - мишени.

Таблица 4. Относительная масса органов крыс и мышей опытных и контрольных групп, в % ($M \pm m$), n=5.

Вид, пол	показатели	Контроль		Опыт, 5000мг/кг	
		Масса органов, г	Массовый коэффициент %	Масса органов, г	Массовый коэффициент %
Крысы самки	Масса тела, г	183,3	-	190,7	-
	Печень, мг	9,8±0,3	5,3±0,2	10,6±0,4	5,5±0,3
	Селезенка, мг	1,18±0,1	0,64±0,04	1,2±0,08	0,63±0,06
	Почки, мг	1,43±0,1	0,78±0,05	1,48±0,18	0,78±0,03
Крысы самцы	Масса тела, г	201,8		198,7	
	Печень, мг	11,2±0,2	5,5±0,3	11,1±0,35	5,6±0,3
	Селезенка, мг	1,32±0,08	0,65±0,06	1,29±0,03	0,65±0,03
	Почки, мг	1,79±0,09	0,89±0,02	1,68±0,09	0,84±0,05
Мыши самки	Масса тела, г	24,2		27,0	
	Печень, мг	1,62±0,08	6,7±0,14	1,63±0,055	6,0±0,08
	Селезенка, мг	0,16±0,02	0,67±0,04	0,18±0,01	0,70±0,03
	Почки, мг	0,34±0,02	1,4±0,06	0,39±0,04	1,4±0,02
Мыши самцы	Масса тела, г	28,3		27,7	
	Печень, мг	1,63±0,11	5,8±0,09	1,79±0,07	6,5±0,06
	Селезенка, мг	0,20±0,06	0,70±0,02	0,19±0,03	0,70±0,03
	Почки, мг	0,44±0,04	1,6±0,06	0,39±0,05	1,4±0,01

Таким образом, из приведенных в таблице 4 данных следует, что относительная масса органов крыс и мышей не имеют достоверных отличий от аналогичных показателей контрольных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» изготовителя ООО «Парафарм» по показателю «среднелетальная доза, ЛД 50» относится к IV классу опасности (малоопасные, более 5000 мг/кг).

Литература.

- СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29.08.2014г.

2. Правила лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации №267 от 19.06.2003);
3. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями №1,2).
4. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва, 2005 с.40-46
5. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств . Гриф и К, 2012.
6. ГОСТ ISO 10993-11-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия.
7. МУ 2163 – 80 Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов.
8. Лист данных по безопасности. Цинкосодержащая антибактериальная композиция. Раздел 11: Токсикологическая информация. 18.09.18г.

Приложение1

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Московская область, Серпуховский округ, Оболенск,

Результаты токсикологических исследований *in vivo*

1. Наименование предприятия, организации: ООО «ПАРАФАРМ»
2. Юридический адрес: 440026, г. Пенза, ул. Свердлова, д. 4
3. Изготовитель (фирма, предприятие, организация): ООО «ПАРАФАРМ», 440026, г. Пенза, ул. Калинина 116 А
- Страна: Россия.
6. Место отбора: ООО «ПАРАФАРМ», 440026, г. Пенза, ул. Калинина 116А
7. Время и даты отбора: 13.05. 2019

№ п/п	Наименование продукции, № партии/серии	Дата изготовлен ия/срок годности	Результат наружного осмотра партии (состояние упаковки, маркировки)	Количество отобранных образцов		
				для испытаний и иденти- фикации, г	для контро льного хранен ия, г	Итог о, г
1	2	3	4	5	6	7
1	ОСТЕОМЕД ФОРТЕ, таблетки 500 мг, Арт. ОФ_1623	10.04.2019	Упаковка 120 табл., 5 упаковок	120 X5 X0,5	0	300

8. Средства измерений:

№ п/п	Тип прибора	Заводской номер	№ свидетельства о проверке	Срок действия
1.	Весы электронные Scout PRO SPU2001	7125081051	Сп №AA7104457 от 18.09. 2018	17.09.2019
2	Весы электронные Explorer(E) E10640	1122241676	Сп №AA7104452 от 18.09. 2018	17.09.2019

9. Дополнительные сведения:

Образец представлен в приспособленной маркировке из полимерного материала с маркировкой на поверхности тары. Внешний вид: таблетки

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ (ИССЛЕДОВАНИЙ)

№ № п/п	Определяемые показатели	Единицы измерения	Результаты испытаний	Величина допустимого уровня	НД на методы исследований
1	2	3	4	5	6
Образец поступил дата начала испытаний 17.05.2019 г дата окончания исследований 31.05.2019г					
1	Острая пероральная токсичность (LD 50 per os), Беспородные мыши	мг/кг веса животного	5000	не нормируется	МУ 2163-80
2	Острая пероральная токсичность (LD 50 per os), Крысы линии Вистар	мг/кг веса животного	5000	не нормируется	МУ 2163-80

ВЕТЕРИНАРНЫЙ ПРОТОКОЛ
Договор №708-н/2018 от 12.11.2018
ООО «ПАРАФАРМ»
Головная организация по проекту:
ФБУН ГНЦ ПМБ

Номер протокола: 05/27-2019
Поступил в комитет по биоэтике 29/05/2019

Утвержден (отправлен на доработку) -
Поступил (повторно) -
Дата утверждения 31/05/-2019
Предыдущий номер -
Действует/завершен/прерван -

НАЗВАНИЕ ПРОТОКОЛА: «Исследование острого токсического действия нового лекарственного препарата ОСТЕОМЕД Форте *in vivo*»

ВЕДУЩИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬ:

Зам директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ,
д.б.н., проф. Шемякин И.Г. (тел 36-00-60)

ПОМОЩНИК ВЕДУЩЕГО ИССЛЕДОВАТЕЛЯ:

с.н.с. лаборатории молекулярной биологии,
к.м.н. Манзенюк О.Ю.

УЧАСТВУЮЩИЙ/КОНСУЛЬТИРУЮЩИЙ ВЕТЕРИНАР:

с.н.с. лаборатории биологических испытаний,
к.б.н. Комбарова Т.И.

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ КОМИССИИ ПО БИОЭТИКЕ ФБУН ГНЦ ПМБ:

г.н.с. отдела молекулярной микробиологии,
д.в.н., проф. Светоч Э.А.

Название протокола: «Исследование острого токсического действия нового лекарственного препарата ОСТЕОМЕД ФОРТЕ *in vivo*»

Ведущий исследователь: заместитель директора д.б.н. Шемякин И.Г.;

Помощник ведущего исследователя: старший научный сотрудник к.м.н. лаборатории молекулярной биологии Манзенюк О.Ю.;

Ассистирующие исследователи: Комбарова Т.И., Рудницкая Т.И., Мунтян Я.О.

I. РЕЗЮМЕ:

Цель – Экспериментальное изучение острого токсического действия нового лекарственного препарата ОСТЕОМЕД ФОРТЕ при пероральном и парентеральном применении на лабораторных животных. Определение класса опасности исследуемого нового лекарственного препарата ОСТЕОМЕД ФОРТЕ.

II. ПРЕДПОСЫЛКИ К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Современные тенденции доклинических токсикологических исследований фармакологического вещества предполагают установление характера и выраженности его повреждающего действия на организм экспериментальных животных и оценку его безопасности. Первоначально проводят оценку острой токсичности фармакологического вещества, целью которой является определение переносимых, токсических и летальных доз (с использованием статистических методов) и анализ клинической картины интоксикации.

У мелких лабораторных животных токсичность фармакологического вещества исследуют при нескольких путях введения. Фармакологические вещества, предназначенные для системного введения, вводят перорально и парентерально (внутрибрюшинно, если они не растворимы в воде, внутривенно и подкожно, если они растворимы). Сравнение параметров токсичности при разных путях введения может выявить скорость и степень всасывания препарата и позволяет судить о сходстве или различии в механизмах, вызывающих летальный исход при разных путях введения. [1]

С учетом назначения и условий применения в программу исследований биологически активной добавки к пище «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», (производитель ООО «ПАРАФАРМ») планируется провести:

1. Оценку острой токсичности при разных путях поступления в организм: в желудок и парентерально в брюшную полость для сравнения токсического действия на организм животных.
2. Определение массы тела животных.
3. Определение внешних признаков интоксикации, макроскопической оценки органов.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

1. Схема проведения экспериментов и общие процедуры:

1.1 Оценка острой токсичности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» при внутрижелудочном введении.

Для оценки острой токсичности «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», (производитель ООО «ПАРАФАРМ») и для определения переносимых, токсических и летальных доз с выявлением клинической картины интоксикации будут использоваться два вида животных (беспородные мыши и крысы Вистар) [1].

Для решения поставленных задач и определения LD₅₀ при внутрижелудочном введении будут использовать 4 дозы препарата [ГОСТ12.1.007-76ССБТ] (таблица1).

Раствор препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» опытным животным будут вводить в объеме 0,5 мл мышам и 3 мл крысам с учетом веса животных (20±2 г и 180-190 г соответственно).

На дозу препарата будут использовать по 10 экспериментальных животных (5 самцов и 5 самок в группе).

Таблица 1. Учет гибели животных

Дозы, мг/кг	Кол-во мышей/ крыс	Сутки наблюдения			Пало/ всего	С.с.г., сутки	Ld50
		0	1-14				
5000	10/10						
2000	10/10						
1000	10/10						
500	10/10						
контроль	10/10						

В первый день после введения препарата животные будут находиться под непрерывным наблюдением.

Регулярно в течение 14 суток будет проводиться наблюдение и будут фиксировать общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус

скелетных мышц, состояние шерстного и кожного покрова, консистенцию фекальных масс, окраску мочи, потребление воды и корма.

Будет учитываться гибель животных.

Все павшие животные будут подвергаться некропсии с оценкой макроморфологических изменений в органах.

С целью учета реакции организма на токсическое действие препарата будут проводить оценку массы тела животных: ежедневно в течение 7 суток и на 14 сутки.

Выживших животных будут эвтаназировать и проводить некропсию с макроскопическим описанием органов и тканей места введения (степень кровенаполнения органов и наличия кровоизлияний, изъязвлений слизистых оболочек) и будут определять относительную массу органов.

Всего при оценке острой пероральной токсичности будет использовано 50 мышей и 50 крыс.

1.2 Оценка токсичности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» при парентеральном (внутрибрюшинном) введении.

Для данной процедуры будут использовать «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в максимальной концентрации 5000мг/кг при внутрибрюшинном введении.

В эксперименте будут использованы беспородные мыши, весом 22-24г, самцы и самки по 5 штук.

Будет проводиться наблюдение и оценка физических показателей.

Всего используется: 10 беспородных мышей.

2. Экспериментальные животные и обоснование заказа.

Не применимо

2.1. Анализ альтернативных вариантов без использования животных:

Исследование острого токсического действия новых препаратов проводится с использованием лабораторных животных согласно ГОСТ12.1.007-76ССБТ и др. [2-6].

2.2. Лабораторные животные.

- а) Род и вид: Мышь (*Mus musculus*), крыса(*Rattus*)
- б) Линия (порода): мыши, крысы, - беспородные
(поставщик): Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ МБА России
- г) Возраст 8-10 недель мыши, крысы.
- в) Вес: 20 - 24 г мышь; 180-190г крыса.
- е) Пол: самки, самцы.
- ж) Особые требования:НЕТ

3) Прочее: НЕТ

2.3. Общее необходимое число животных: мыши –60шт; крысы -50шт.

Замена: НЕТ

3. Технические методы.

3.1. Длительная фиксация: НЕТ

3.2. Хирургические вмешательства: НЕТ

3.3. Наркоз: НЕТ

3.4. Манипуляции с животными.

3.4.1 Эксперименты с животными проводят в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» Правила надлежащей лабораторной практики (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н. Манипуляции с животными будут проводить в специально изолированной комнате для заражений.

3.4.2 Идентификация животных: мыши, крысы будут содержаться группами в клетках соответствующей площади. На клетки вывешиваются этикетки с указанием ответственного исполнителя, номера проекта, номера группы, вида, линии и количества животных, наименования и даты проведения процедуры.

3.4.3 Инъекции:

а) Внутрижелудочное введение. Процедура для оценки острой токсичности будут проводить при помощи тонкого металлического зонда с напаянной на конце оливой. Мыши фиксируются левой рукой за кожную складку шеи и корень хвоста. Для фиксации крысы используются перчатки – краги. Правой рукой зонд вводится в ротовую полость и медленно из шприца выдавливается 0.5 мл опытного препарата.

б) Внутрибрюшинное введение. Животное фиксируют вниз головой, дезинфицируют место инъекции 70% спиртом и под углом 45° быстрым движением прокалывает брюшину, медленно вводят раствор препарата в брюшную полость, в объеме 0,5 мл. Для этой манипуляции используются иглы 25 - 27G.

в) Наблюдение за животными. Визуальная оценка поведения опытных животных. Павших животных будут вскрывать, оценивать патологоанатомические изменения органов.

г) Взвешивание мышей. Мышей берут с помощью пинцета с силиконовыми трубками на браншах, затем плавно перемещают в ёмкость на весах. Регистрируется то показание массы тела животного, которое сохраняется без изменений на дисплее весов не менее 3 секунд, заполняется протокол взвешивания.

д) Взвешивание органов.

4. Адьюванты: НЕТ

5."Конечный результат" исследования: в ходе опыта будут регистрироваться признаки интоксикации опытных животных (общего состояния , потребление корма и воды), сроки гибели и макроморфологические изменения в органах при вскрытии погибших и выживших животных.

6. Эвтаназия: Через 14 суток после введения препарата животные будут умерщвлены – СО₂ - ингаляцией.

7. Ветеринарное наблюдение.

7.1. Содержание животных: размещение животных и условия содержания будут соответствовать виду(мыши, крысы) в поликарбонатных микроизоляторах «LabProducts Inc.» (США) и обеспечивать стандартность проведения исследований, согласно СП2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29.08.2014г и Правил надлежащей лабораторной практики (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н). Животных будут содержать в контролируемых условиях окружающей среды (при температуре от 18 до 26 °C и относительной влажности воздуха от 30 до 70 %). Освещение с чередованием 12 часов света и 12 часов темноты. Воздухообмен в помещениях для содержания животных должен составлять 12-15 об/ч.

В исследовании в качестве стандартного рациона используют гранулированный полнорационные корма ПК-120 для содержания мышей и крыс по ТУ 9296-002-70941247-2005 (ООО «Лабораторкорм»). Корм и воду будут давать *ad libitum*.

Ежедневно будут проводить клиническое наблюдение за животными, оценивать поведенческие реакции и потребление корма и воды.

7.2. Помещение для исследований: КОРПУС № 1 ГНЦ ПМБ, четвертый этаж, виварий – 4124.

IV. Уровень квалификации и подготовки исследователей и лаборантов.

1. Комбарова Т.И., к.б.н., имеет 28-летний опыт в проведении биомедицинских исследований в ФБУН ГНЦ ПМБ, используя мышей, крыс, морских свинок, кроликов с возбудителями 1 -4 групп патогенности. Прошла ветеринарный тренинг по работе с лаб. животными, включая СПФ: USAAMRID, WRIAR, UHSUS. США. В 2005 г курсы повышение квалификации «Доклинические токсикологические исследования лекарственных средств (GLP)». В 2007г, окончила курсы при Саратовском противочумном институте «МИКРОБ» по работе с возбудителями особо опасных инфекций. В 2017г, повышение квалификации «Современные методы использования лабораторных грызунов в трансляционных биомедицинских исследованиях» МГУ, Москва.
2. Рудницкая Татьяна Ивановна, н.с., имеет 35-летний опыт работы с возбудителями I - IV -й групп патогенности. В 1978 году окончила курсы специализации по особо опасным инфекциям при Ростов-на-Дону государственном научно-исследовательском противочумном институте. В 2014году окончила курсы повышения квалификации в ФБУН ГНЦ ПМБ по программе: «Лаб. диагностика острых кишечных инфекций» и курсы повышения квалификации по программе: «Биологическая безопасность и биозащита». Имеет практический опыт во всех проводимых процедурах с лабораторными животными.

3. Мунтян Яна Олеговна, в 2017 г. окончила Ивановский государственный университет, факультет биохимии, специализировалась на кафедре физиологии человека и животных. В настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии. В 2018 г. получила профессиональную переподготовку в ФБУН ГНЦ ПМБ по программе «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности. Имеет право на ведение профессиональной деятельности с использованием лабораторных животных в экспериментах (Диплом о профессиональной подготовке 502401838700, регистрационный номер 59 от 29.03.2018 г.

V. Требования биобезопасности: В подготовке данного протокола были учтены все требования по работе с животными.

VI ГАРАНТИИ. Будучи ведущим исследователем по данному протоколу, я даю следующие гарантии:

А. Использование животных. В отсутствие специальной санкции комитета, разрешающей отклонение от утвержденного протокола исследования, включенные в него животные будут использоваться в строгом соответствии с указанным протоколом.

Б. Дублирование. Мною предприняты добросовестные усилия к тому, чтобы исключить из данного протокола ненужное дублирование предшествующих экспериментов.

В. Гарантия достоверности статистического анализа. Заявляю, что я проконсультировался с компетентным специалистом, проанализировавшим статистические аспекты данного протокола, и что в исследовании будет задействовано минимальное число животных, необходимое для получения статистически достоверных научных результатов.

Г. Требования биобезопасности. При подготовке данного протокола мною были учтены и проведены необходимые мероприятия по соблюдению всех применимых к нашему учреждению правил и инструкций, касающихся радиационной защиты, биобезопасности, экспериментов с генетической рекомбинацией и т. д.

Д. Квалификация и подготовка сотрудников. Подтверждаю, что персонал, которому предстоит работать с животными согласно данному протоколу, имеет надлежащую квалификацию и подготовку, исключающие возможность причинения животным чрезмерной боли и страданий в результате проводимых процедур и манипуляций.

Е. Ответственность. Принимаю на себя моральную и административную ответственность, связанную с использованием животных в соответствии с представленным протоколом, и подтверждаю, что все участвующие в проекте сотрудники намерены проявлять заботу о здоровье, комфорте и благополучии подопытных животных. Кроме того, я обязуюсь по возможности использовать альтернативные методы исследования, не требующие привлечения животных, и следовать принципам гуманности и соблюдения закона во время проведения научных экспериментов.

Дата (подпись ведущего исследователя)

Литература:

1. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств . Гриф и К, 2012.
2. Правила надлежащей лабораторной практики (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н).
3. ГОСТ12.1.007-76ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями№1,2).
4. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва, 2005 с.40-46
5. СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29.08.2014г.
6. МУ 2163 – 80 Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов.