

Джунушалиева Ч.У.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ СУБСТАНЦИИ
РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Ch.U. Dzhunushalieva

**RESULTS OF THE SUBSTANCE SECURITY RECOMBINANT HUMAN
ERYTHROPOIETIN FOR ORAL APPLICATIONS**

УДК 615.32:615,412.5

Исследована острая токсичность трех серий субстанции ЭПО на мышах при воздействии максимальной технически достижимой дозы при внутрижелудочном введении. Проведены гематологические и патоморфологические исследования. Результаты эксперимента не показали токсического действия субстанции на внутренние органы.

It is investigated the acute toxicity of three series of substance EPO in mice when exposed to the maximum technically achievable dose intragastric administration. The hematological and pathomorphological studies have carried out. The experimental results showed no toxic effect of substances on the internal organs.

Несмотря на прогресс в обеспечении безопасности и эффективности гемотрансфузионной терапии, актуальной задачей для клинической медицины остается поиск и внедрение лечебных средств, альтернативных донорской крови, ее компонентам и препаратам. Одним из таких средств является рекомбинантный человеческий эритропоэтин (рчЭПО), внедренный в клиническую практику в 1987 г. [1].

В 1906 году французские ученые Camot и De Flandre первыми высказали предположение о возможном существовании в организме гормонального фактора, контролирующего эритропоэз, и назвали его гемопозтином, позднее эритропоэтином (ЭПО). В чистом виде гормон был выделен лишь в 1977 году, а в 1985 году Lin F.K. с соавт. и Jacobs K. с соавт. клонировали ген эритропоэтина и экспрессировали его на клетках яичника китайского хомячка [2, 3]. В связи с синтезом эритропоэтического фактора роста - рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭПО) *in vitro* появилась новая возможность эффективно и безопасно регулировать эритропоэз. Исследования последних лет значительно расширили область применения рчЭПО [4,5].

В клинической практике ЭПО нашел широкое применение при заболеваниях или лечебных мероприятиях, сопровождающихся анемией: хроническая почечная недостаточность (диализные и преддиализные пациенты), онкологические заболевания (цитостатическая терапия), трансплантация органов и тканей, СПИД (терапия ВИЧ-инфекции зидовудином), аутодонорство, пред- и послеоперационный период без аутодонорства, анемия при хронических воспалительных заболеваниях, анемия у ослабленных пациентов (пожилые люди, недоношенные дети, обожженные и т.д.), отказ от трансфузий аллогенных гемокомпонентов [6].

ЭПО может быть главным фактором при коррекции анемии не только из-за редкости возникновения побочных реакций на него, но также из-за того, что он вызывает образование и высвобождение молодых клеток из костного мозга в кровь. Кривая диссоциации кислорода у этих клеток сдвинута вправо относительно нормальных клеток, вызывая высвобождение повышенного количества кислорода в ткани, чем это происходит в норме [7].

Наличие только инъекционной формы эритропоэтина на фармацевтическом рынке, изготовление которой предполагает тщательное очищение от пептидных загрязняющих субстратов и доминирование брендовых лекарственных препаратов, предопределяет очень высокую стоимость препаратов эритропоэтина и, соответственно, низкую доступность их для общественного здравоохранения. Альтернатива - разработка биосимиляров эритропоэтина для перорального применения с меньшей стоимостью процедуры хроматографической очистки.

В ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора на основе культуры клеток яичников китайского хомячка (СНО) был сконструирован штамм-производитель рекомбинантного человеческого эритропоэтина (СНОрЕ). Штамм клеток СНОрЕ аттестован в соответствии с национальными требованиями и требованиями ВОЗ, получено разрешение ФГУН им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора на использование его в качестве производителя рчЭПО. На основе клеток-производителей СНОрЕ разработана технология получения таблетированной формы рекомбинантного человеческого эритропоэтина

Цель настоящей работы оценка безопасности субстанции рекомбинантного человеческого эритропоэтина, разработанного на базе НПО "Вектор".

Материал и методы. Для исследования токсичности были наработаны 3 серии субстанций рекомбинантного эритропоэтина человека:

- 1 серия - серия 1-06-06 /1700 ЕД/100 мг;
- 2 серия - серия 2-06-06 /1640 ЕД/100 мг;
- 3 серия - серия 3-06-06 / 1780 ЕД/100 мг.

Проведена аттестация 3-х серий субстанции ЭПО,

переданных для доклинических исследований, по физико-химическим свойствам, специфической активности в ИФА, содержанию белка, остаточной влажности, токсичности для лабораторных животных, содержанию остаточной ДНК (методом спектрофотометрии).

Исследование острой токсичности трех серий субстанции ЭПО проведено на мышах при воздействии максимальной технически достижимой дозы для внут- рижелудочного введения. Вводился 40% раствор субстанции ЭПО (в объеме из расчета 3% от массы тела) т.е. 12 г/кг, что составило 204 000, 197 000 и 214 000 ЕД/кг. В экспериментах использованы беспородные белые мыши обоего пола. Животные находились на обычном рационе вивария. Каждая группа состояла из пяти самцов и пяти самок. Ежедневно в течение двух недель осуществлялось наблюдение за состоянием и поведением мышей, животные трижды взвешивались.

Проводились гематологические и патоморфологические исследования. Показатели крови (содержание тромбоцитов, гемоглобина, лейкоцитов, лейкоцитарная формула, показатели свертывающей и противосвертывающей систем) определялись унифицированными клиническими методами.

Органы, взятые для гистологического исследования, фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили в спиртах возрастающей крепости и заливали в воск-парафин. Срезы толщиной 4-5 микрон окрашивали гематоксилином и эозином. Все гистопрепараты просматривались на компьютерном комплексе фирмы "Leica Microsystems" (Швеция) с микроскопом "Leica DM1000" на режимах увеличения от 100 до 400.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами параметрической статистики с оценкой значимости различий по Стьюденту.

Результаты и обсуждение. В ходе эксперимента у животных, после введения испытуемых субстанций, не наблюдалось диспепсических явлений. Не отмечено выраженных изменений в поведении. В течение всего периода наблюдения имел место нормальный темп прироста массы тела (ТПМТ) (таблица 1). Величины индексов массы внутренних органов не выходят за рамки видовой нормы.

Таблица 1.

ТПМТ после однократного внутри щочного введения эритропэтина

Серия субстанции ЭПО	I	II	III
ТПМТ мг/г/сутки	3,4 ± 2,0	3,9 ± 2,3	6,5 ± 2,4

Принципиальных различий в гематологических показателях и характеристиках гемостаза у животных получивших препарат субстрата эритропэтина разных серий не обнаружено (таблица 2). Статистическая значимость различий между контрольными и объединенными экспериментальными оценками отсутствует.

Таблица 2.

Серия	I			II			III			контроль		
	n	X ± с.о.	P1/к	n	X ± с.о.	Pn/к	n	X ± с.о.	Pш/к	n	X ± с.о.	Pэпо/к
Нь, г/л	10	134 ± 6,3	0,864	9	128 ± 10,0	0,595	9	142 ± 6,6	0,528	5	136 ± 2,5	0,921
Эритроциты, 10 ¹² /л	10	6,0 ± 0,5	0,857	9	4,4 ± 0,3	0,059	9	4,6 ± 0,5	0,132	5	6,2 ± 1,0	0,159
R, %о	10	3,9 ± 1,0	0,482	9	2,0 ± 0,6	0,173	9	5,6 ± 3,2	0,933	5	6,0 ± 3,7	0,477
L, 10 ⁹ /л	10	5,0 ± 0,6	0,019	9	4,4 ± 0,4	0,015	9	3,5 ± 0,4	0,258	5	2,8 ± 0,1	0,037
Палочкоядерные, %	9	2,2 ± 0,9	0,623	9	2,3 ± 1,1	0,642	9	2,9 ± 0,7	0,251	5	1,6 ± 0,5	0,473
Сегментоядерные,%	9	29,3 ± 6,9	0,892	9	20,2 ± 4,2	0,227	9	27,2 ± 5,5	0,922	5	28,0 ± 2,8	0,756
Моноциты, %	9	0,7 ± 0,3	0,348	9	0,8 ± 0,3	0,180	9	0,4 ± 0,2	0,511	5	0,2 ± 0,2	0,277
Эозинофилы, %	9	1,4 ± 0,4	0,351	9	0,1 ± 0,1	0,046	9	0,2 ± 0,2	0,180	5	0,8 ± 0,4	0,680
Лимфоциты, %	9	66,1 ± 7,9	0,770	9	76,6 ± 5,0	0,335	9	69,2 ± 6,1	0,984	5	69,4 ± 2,8	0,889
РФМК, мг/100мл	5	13 ± 1,7	0,314	5	12 ± 1,1	0,212	6	17 ± 1,9	0,038	3	10 ± 1,2	0,110
Протромб. время, с	7	16 ± 2,8	0,436	6	13 ± 1,9	0,630	5	11 ± 2,4	0,982	2	12 ± 1,5	0,599
Фибриноген, г/л	9	4,4 ± 0,7	0,372	9	3,1 ± 0,6	0,040	6	2,8 ± 0,3	0,007	4	5,5 ± 0,8	0,049
Тромбоциты, 10 ⁷ л	9	244 ± 25,9	0,533	9	260 ± 40,5	0,811	9	256 ± 24,8	0,694	5	276 ± 48,1	0,623

Примечания: X ± с.о. – среднее арифметическое ± стандартная ошибка; рэпо/к – вероятность соответствующая t-критерию Стьюдента различий между величинами контрольных и объединенных экспериментальных оценок исследованных показателей.

Тенденция различия в количестве лейкоцитов есть вследствие лейкопении у мышей контрольной группы. Различие в концентрации фибриногена плазмы крови определяется ее сниженным уровнем у самцов, в связи с потерей крови в боях за лучшее место в групповой иерархии. Вероятно, длительное напряжение работы системы гемостаза явилось причиной снижения концентрации фибриногена в плазме крови.

При патоморфологическом исследовании при острой токсичности визуально все исследованные органы экспериментальных животных (головной мозг, сердце, печень, почки, селезенка, тонкий и толстый кишечник, гонады) имели обычный цвет, размеры и форму, характерные для данного вида животных.

Гематологические показатели и характеристики гемостаза после однократного внутривенного введения эритропоэтина

По результатам патоморфологического анализа экспериментальных животных, подвергавшихся воздействию субстанций (I, II и III) можно выделить следующие общие закономерности: выраженная лимфоидная инфильтрация слизистой оболочки стенки кишечника с формированием лимфоидных фолликулов, аналогичная картина и в брыжеечных лимфатических узлах. Лимфоидная инфильтрация также наблюдается в интерстициальной ткани стромы почек и менее выражена в печени, преимущественно в перипортальных зонах (рисунок 2, 3). Данные изменения свидетельствуют об активном выселении лимфоидных элементов за пределы кровеносного русла и их инфильтрацией внутренних органов.

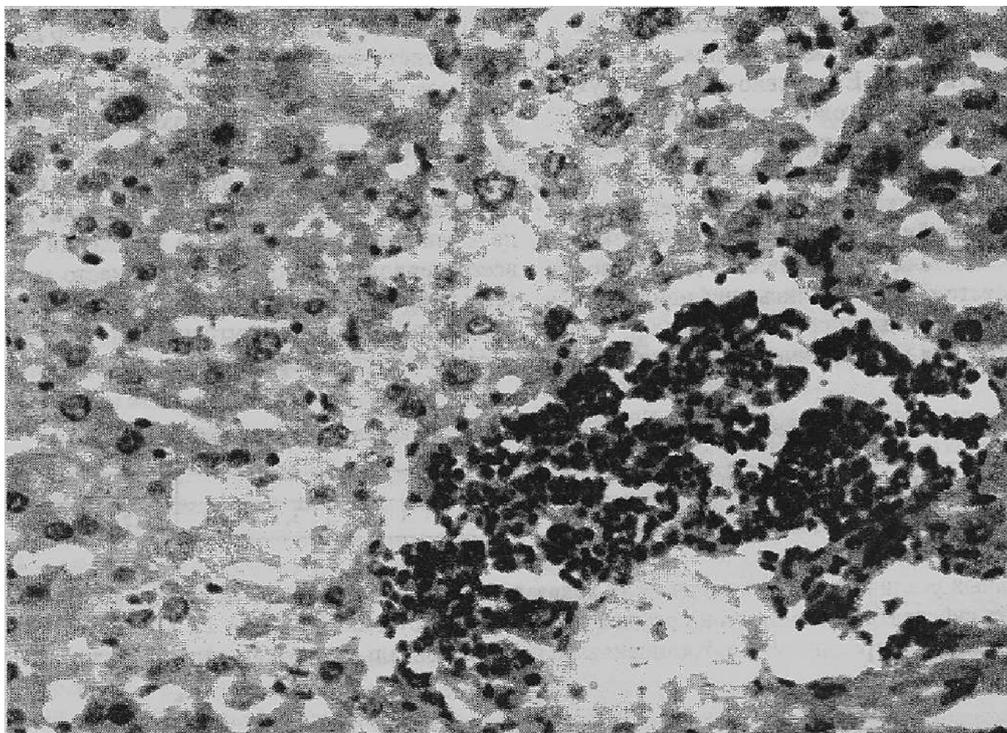


Рис. 1. Печень. Самка. Паренхиматозная дистрофия, инфильтрация лимфоцитами перипортальных зон с примесью единичных эозинофилов. Окр.: гематоксилин с эозином. x200. 1-я серия субстанции ЭПО

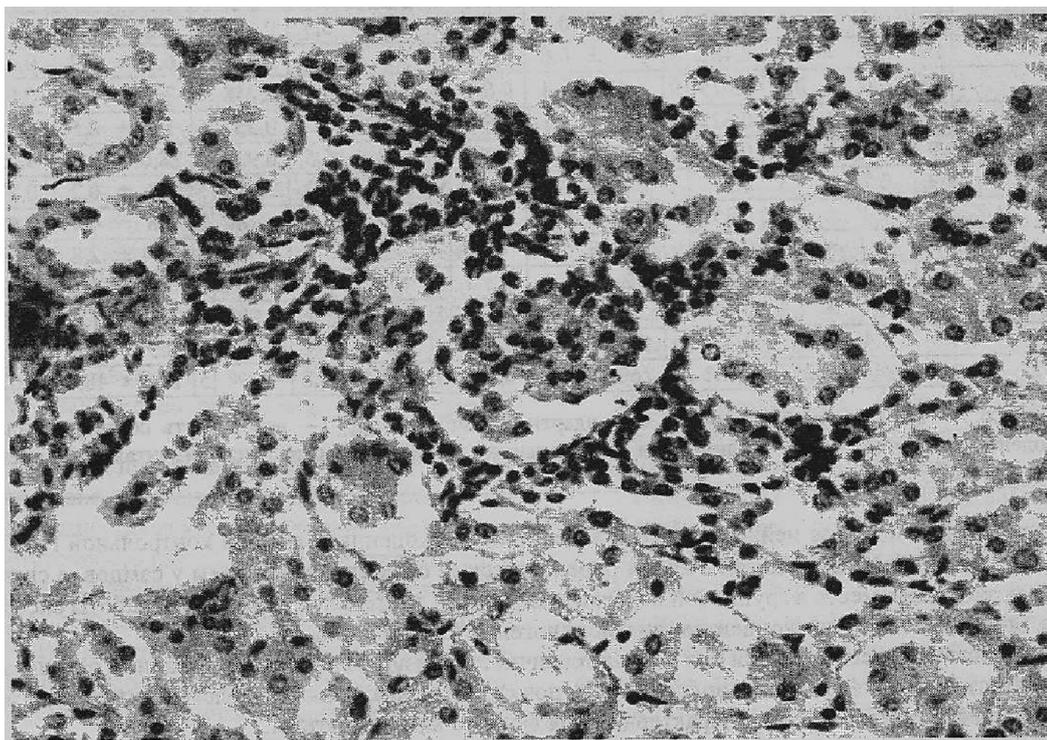


Рис. 2. Почки. Самка. Очаговая лимфоидная инфильтрация. Окр.: гематоксилин с эозином. x400. 2-я серия субстанции ЭПО

В селезенке выраженная гиперплазия лимфоидных элементов, рисунок фолликулов стерт. Наблюдаются очаги скопления гигантских клеток, которые имеют крупные гиперхромно окрашенные причудливые ядра с цитоплазмой розового цвета в виде тонкого ободка. Среди них также выявляются клетки-тени, характерные для процесса апоптоза. Гиперплазия касается лимфоидных элементов бластного ряда, малых и больших лимфоцитов, среди которых располагаются единичные одноядерные макрофаги (рисунок 3). Данные клетки могут появляться в селезенке при антигенной стимуляции.

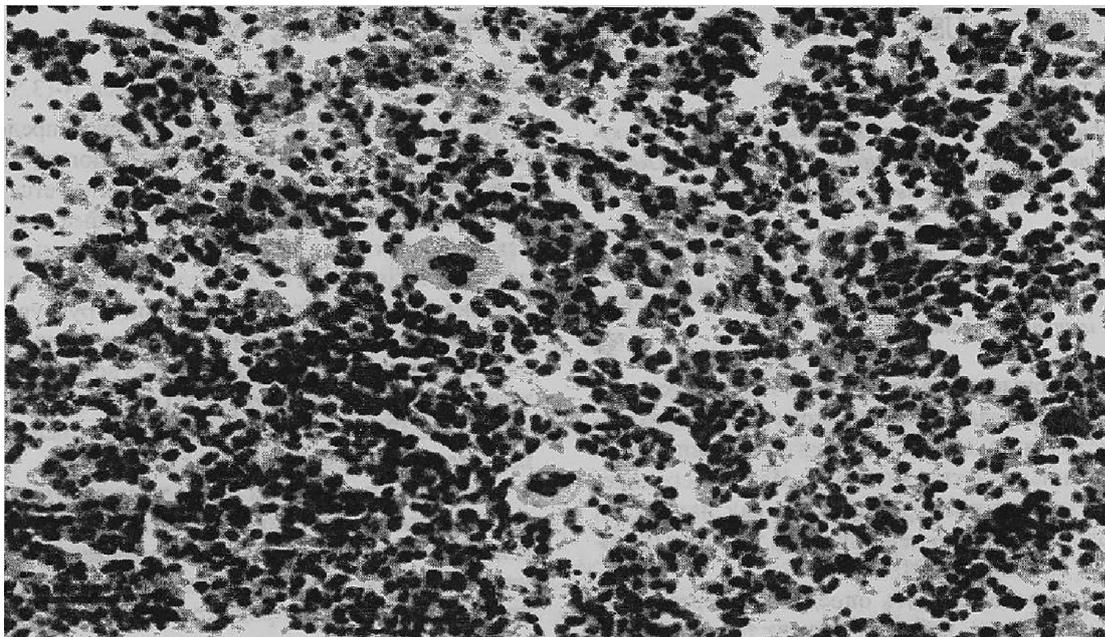


Рис. 3. Селезенка. Самка. Гиперплазия лимфоидных элементов, среди них гигантские клетки с гиперхромными ядрами. Окр.: гематоксилин с эозином, х 400.3-я серия субстанции ЭПО

В миокарде наблюдается умеренные отек стромы и рассеянная круглоклеточная инфильтрация.

Выявленные патоморфологические изменения можно оценить как компенсаторно-приспособительную реакцию в ответ на антигенное воздействие субстанций ЭПО в максимальной технически достижимой дозе. Для данной экспериментальной группы наиболее характерно развитие выраженной реакции лимфоидной ткани, в частности селезенки, которая подчеркивает пик ответа в виде гиперплазии молодых форм лимфоидных элементов и появления активной макрофагальной реакции.

Таким образом, проведены исследования по острой токсичности трех серий субстанции рчЭПО. Были испытаны технически достижимые дозы субстанций для внутрижелудочного введения. Однократное энтеральное введение субстанции эритропоэтина в максимальной технически достижимой дозе не приводит к развитию специфических симптомов и изменений во внутренних органах, которые можно было бы расценить как проявление токсического действия.

Литература:

1. Жибурт Е.Б., Серебряная Н.Б. Эритропоэтин в клинической медицине// Terra medica.-1991.-№3,- С 9-10
2. Lin F.K., Suggs S., Lin C.H. Cloning and expression of the human erythropoietin gene//Proc Natl Acad Sci, USA.-1985;92:7850-7884.
3. Jacobs K., Shoemaker C., Rudersdorf R. Isolation and characterization of genomic c DNA clones of human erythropoietin// Nature.-1985;313:806-810.
4. Mennini T., De Paola M., Bigini P. et al. Nonhematopoietic Erythropoietin Derivatives Prevent Motoneuron Degeneration In Vitro and In Vivo//Mol Med.-2006; 12(7-8): 153-160.
5. Bogoyevitch M.A. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection//Cardiovasc Res. - 2004; 63:208-216.
6. Шевченко Ю.Л., Данильченко В.В., Жибурт Е.Б., Серебряная Н.Б., Хубулава Г.Г., Белевитин А.Б. Эритропоэтин в профилактике и лечении анемий// Воен-мед журн.-1996; 317 (П): 45-8.
7. Sowade O., Gross J., Sowade B. et al. Evaluation of oxygen availability with oxygen status algorithm in patients undergoing open heart surgery treated with erythropoietin beta//J Lab Clin Med.-1997; 129:97-105.

Рецензент: д.м.н., профессор Давлетов Р.К.