

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ТОКСИКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТА
ФЕНОЗАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

© Косман В.М.¹, Карлина М.В.¹, Мазукина Е.В.¹, Морозов С.В.², Гущина Е.Е.², Журавская Н.В.²,
Макарова М.Н.¹, Макаров В.Г.¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»»

Россия, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

² ООО «ПИК-ФАРМА»

Россия, 125047, г. Москва, пер. Оружейный, д. 25, стр. 1, пом. 1, эт. 1

Углубленные пострегистрационные исследования фенозановой кислоты, действующего вещества оригинального отечественного лекарственного препарата «Дибуфелон®», разрешенного для медицинского применения у человека, как противоэпилептическое средство, направлены на совершенствование его клинического применения.

Цель – анализ токсических свойств, иммуотоксичности, токсикокинетики и элементов развития лекарственной зависимости, оценка возможных канцерогенных свойств препарата фенозановой кислоты на половозрелых собаках породы бигль при многократном пероральном введении с периодом отсроченного наблюдения.

Материалы и методы. Препарат фенозановой кислоты вводили собакам перорально (контрольная группа животных, 2 самца и 2 самки и 3 экспериментальные группы животных по 5 самцов и 5 самок) в течение 270 сут. в дозах 24, 60 и 120 мг/кг (1; 2,5 и 5 высших терапевтических доз (ВТД) соответственно). Проводили оценку общетоксических свойств, местнораздражающего действия, влияния на иммунокомпетентные органы, элементов развития лекарственной зависимости, возможных канцерогенных свойств, а также основных фармакокинетических параметров (C_{max}, T_{max}, AUC₀₋₂₄, MRT, T_{1/2}).

Результаты. Препарат фенозановой кислоты не оказывал местнораздражающего, иммуотоксического и канцерогенного действия, не вызывал синдром отмены. При введении препарата преимущественно в средней и максимальной дозах выявлены неврологические и поведенческие отклонения (тремор, единичные случаи незначительного угнетения поведения и отказ от корма). Доза, не оказывающая видимого нежелательного эффекта (NOAEL), не установлена (менее 24 мг/кг). Анализ токсикокинетических данных показал отсутствие кумуляции действующего вещества после многократного перорального введения препарата.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что при применении препарата фенозановой кислоты стоит учитывать возможные побочные эффекты (неврологического и поведенческого характера), которые связаны с непосредственным фармакологическим профилем препарата.

Ключевые слова: фенозановая кислота; безопасность; токсикокинетика; доклинические исследования.

Косман Вера Михайловна – канд. фарм. наук, рук-ль химико-аналитической лаборатории, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»», г.п. Кузьмолловский, Ленинградская обл. ORCID iD: 0000-0001-9690-1935. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru (автор, ответственный за переписку).

Карлина Марина Валерьевна – канд. биол. наук, рук-ль отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»», г.п. Кузьмолловский, Ленинградская обл. ORCID iD: 0000-0002-6292-8934. E-mail: karlina.mv@doclinika.ru

Мазукина Елизавета Владимировна – зам. рук-ля отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии, АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», г.п. Кузьмолловский, Ленинградская обл. ORCID iD: 0000-0002-1448-921X. E-mail: mazukina.ev@doclinika.ru

Морозов Сергей Викторович – канд. мед. наук, директор по развитию, ООО «ПИК-ФАРМА», г. Москва. ORCID iD: 0000-0002-8514-792X. E-mail: morozov_s@pikfarma.ru

Гущина Евгения Евгеньевна – специалист по медицинской информации, ООО «ПИК-ФАРМА», г. Москва. ORCID iD: 0000-0001-5138-5519. E-mail: guschina_e@pikfarma.ru

Журавская Наталья Викторовна – рук-ль медицинского отдела, ООО «ПИК-ФАРМА», г. Москва. ORCID iD: 0000-0001-9586-4298. E-mail: zhuravskaya@pikfarma.ru

Макарова Марина Николаевна – д-р мед. наук, директор, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»», г.п. Кузьмолловский, Ленинградская обл. ORCID iD: 0000-0003-3176-6386. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадиевич – д-р мед. наук, профессор, науч. рук-ль АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»», г.п. Кузьмолловский, Ленинградская обл. ORCID iD: 0000-0002-2447-7888. E-mail: makarov.vg@doclinika.ru

Фенозановая кислота – действующее вещество оригинального отечественного лекарственного препарата Дибуфелон®, зарегистрированного в РФ и разрешенного для медицинского применения у человека как противоэпилептическое средство¹. Соединение является синтети-

ческим антиоксидантом из класса пространственно-затрудненных фенолов, его фармакологическое действие связано с нормализацией процессов возбуждения и торможения в головном мозге¹, что определяет его клиническое

¹ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Дибуфе-

лон®. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=2827f216-7ac0-4619-88d8-307518b692f7&t= (дата обращения 12.2023).

применение, вплоть до включения препаратов фенозановой кислоты в базовую противоэпилептическую терапию [1, 2].

Поскольку сведения о доклинических и клинических исследованиях фенозановой кислоты в доступной научной литературе весьма ограничены [3-5], углубленные пострегистрационные исследования этого отечественного лекарственного препарата, позволяющие совершенствовать его клиническое применение, представляются актуальной задачей.

Цель данной работы – анализ токсических свойств, иммунотоксичности, токсикокинетики и элементов развития лекарственной зависимости, оценка возможных канцерогенных свойств препарата фенозановой кислоты на половозрелых собаках при многократном пероральном введении с периодом отсроченного наблюдения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В эксперименте были использованы собаки породы бигль обоих полов (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»), в возрасте 9-12 мес (на начало эксперимента). Исследование было одобрено для проведения биоэтической комиссией (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол БЭК от 13.08.2021 № 1.41/21), а его дизайн соответствовал регуляторным требованиям².

Животных содержали в стандартных условиях согласно регуляторным документам³, в вольерах, группами от 2 до 5 особей одного пола, в контролируемых условиях окружающей среды (при 15–21 °C и относительной влажности воздуха 30–70%, $\text{NH}_3 \leq 10 \text{ мг/м}^3$, $\text{CO}_2 \leq 0,15 \text{ об.}\%$), светового режима (12 ч света и 12 ч темноты) и воздухообмена (около 15 объемов помещения в час). Минимальная площадь пола на одно животное соответствовала нормативной документации⁴, в

качестве подстила использовали древесные пеллеты.

В эксперимент переданы клинически здоровые животные (на основании клинического осмотра, выполняемого квалифицированным ветеринарным врачом), которых после распределения по группам до начала эксперимента содержали 5 дней для адаптации к условиям эксперимента. Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Так как собаки обладают выраженной иерархией внутри стаи [6], во избежание социальных конфликтов, распределение по группам осуществляли с учетом уже сложившихся социальных групп и массы тела животных внутри этих групп.

Кормление животных сухими кормами марок «ProBalance» для взрослых собак средних пород (ООО «Aller Petfood») и «Наша Марка» (АО «Татчинский комбикормовый завод»), приготовленных по ГОСТ⁵, проводили два раза в день, в первой и во второй половине дня, в соответствии с установленными нормами кормления. В качестве докорма животные получали лакомства для собак и морковь. Животные были лишены утренней порции корма перед взятием образцов крови (в том числе перед первым и последним введением в связи с отбором проб крови для оценки фармакокинетических параметров), проведением наркотизации для ЭКГ и эвтаназией. Воду собаки получали без ограничений.

Тестируемый препарат – Дибуфелон® (МНН: фенозановая кислота), капсулы 200 мг (ООО «ПИК-ФАРМА», Россия, серия H010221D).

Способ введения и выбор доз. В проведенном исследовании за высшую терапевтическую дозу (ВТД) для собак принята доза 24 мг/кг, выбранная на основании пересчета высшей терапевтической дозы ВТД для человека (800 мг⁶) с учетом межвидовых коэффициентов⁷.

Препарат был изучен в дозах 24 мг/кг (1 ВТД), 60 мг/кг (2,5 ВТД) и 120 мг/кг (5 ВТД). Введение препарата осуществляли в виде суспензии содержимого капсул в инертном носителе (1% растворе крахмала, аналогично способу введения в работе [10], концентрация дозируемых суспензий по действующему веществу состав-

² OECD (2018), Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.

Межгосударственный стандарт ГОСТ 32519-2013 «Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при внутрижелудочном поступлении».

Рекомендация ЕАЭК № 33 от 22.12.2020 «Руководство по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов».

³ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях,

Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14

⁴ Белозерцева ИВ, Блинов ДВ, Красильщикова МС, ред. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. М.: ИРБИС; 2017.

⁵ ГОСТ Р 55453-2013 «Корма для непродуктивных животных. Общие технические условия»

⁶ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Дибуфелон®. – URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=2827f216-7ac0-4619-88d8-307518b692f7&t= (дата обращения 12.2023).

⁷ Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose for initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. US Department of health and human services. FDA. CDER. 2005. 27 p.

ляла 24 мг/мл, 60 мг/мл и 120 мг/мл, объём введения – 1 мл/кг веса животного), перорально, один раз в день, ежедневно в течение 270 дней.

Контрольные животные получали перорально носитель по аналогичной схеме и в объеме 1 мл/кг.

Дизайн исследования по оценке безопасности. При планировании комплексного исследования были приняты во внимание современные нормы биоэтики и основные принципы «3R», предполагающие использование минимального количества животных [7], по ряду элементов дизайн был близок к исследованиям со схожими целями и задачами (например, [8-10]).

Исследование включало оценку общетоксических свойств исследуемого препарата, его влияние на иммунокомпетентные органы (для выявления потенциального иммунотоксического действия⁸), канцерогенное действие, возможная способность вызывать синдром отмены, а также отбор образцов крови для изучения основных токсикокинетических параметров.

В исследовании участвовали четыре группы животных, группа 1 – 2 самца и 2 самки, животные получали носитель (1% раствор крахмала), группы 2-4 – по 5 самцов и 5 самок в каждой группе, животные получали тестируемый препарат в дозах 24, 60 и 120 мг/кг соответственно. По 2 животных каждого пола из каждой экспериментальной группы, получавших тестируемый препарат, были на отсроченном наблюдении (30 сут).

Препарат вводили перорально, 1 раз/сут в течение 270 сут ежедневно, осуществляли еженедельное взвешивание животных на протяжении всего эксперимента (весы СKE-150-4050, ООО «Скейл Энтерпрайз», Россия).

Регистрацию развития сроков интоксикации (клиническое наблюдение) за животными проводили ежедневно: в первые 3 дня эксперимента в течение 3-4 часов с момента введения исследуемых объектов (для уточнения времени, в течение которого наступает пик проявления токсических явлений); далее – с учетом ориентировочного времени проявления токсических явлений.

Клинический осмотр проводили еженедельно.

В первый месяц введения оценку потребления корма и воды проводили 1 раз в неделю. Животных во время утреннего кормле-

ния помещали в индивидуальные клетки; выдавали предварительно взвешенную порцию корма в соответствии с ежедневным рационом; фиксировали факт потребления всей порции корма в течение часа (принято за норму); если животные не доедали весь корм, остатки взвешивали на весах ВК-300 (ЗАО «Масса-К» Санкт-Петербург, Россия). Оценку потребления воды проводили на вольтер содержания за 2 часа. Поскольку в первый месяц введения отклонений по потреблению воды не было зарегистрировано, далее оценку потребления воды проводили 1 раз в месяц, регистрацию потребления корма продолжали проводить еженедельно на протяжении всего эксперимента.

Анализ крови проводили до начала введения (-2 день эксперимента), на 90, 270 и 300 сут эксперимента. В дни взятия крови животным был установлен внутривенный катетер 22G (KD Medical GmbH Hospital Products, Германия) в латеральную подкожную вену грудной конечности для отбора образцов крови в объеме 0,2 мл для клинического анализа крови, 0,7 мл для анализа параметров гемостаза и 3,5 мл для изучения биохимических показателей крови. Клинический анализ крови (гематологический анализатор Mythic 18 Vet, Orphee SA, Швейцария) включал определение количества эритроцитов, уровня гемоглобина, гематокрита, количества лейкоцитов, количества тромбоцитов, лейкоцитарной формулы. В рамках оценки иммунотоксичности были проанализированы абсолютные значения лейкоцитов: лимфоциты, моноциты, гранулоциты. Поскольку были выявлены клинически значимые изменения по «красной» крови (для образцов, полученных на 90 и 270 сут относительно исходных данных), дополнительно были проанализированы: средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, ширина распределения эритроцитов по объему.

Измерение параметров гемостаза (коагулометр АПГ4-02-П, ООО «ЭМКО», Россия), определяли протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ).

Биохимические показатели сыворотки крови (биохимический анализатор Random Access A-25, BioSystems, Испания, реагенты фирмы BioSystems, Испания) включали следующие параметры: аланинамино-трансфераза (АЛТ), аспартатамино-трансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), общий белок, альбумин (А), глобулины (G), креатинин, мочевины, общий

⁸ OECD (2008) Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents No 407.

ГОСТ Р 58173-2018 Средства лекарственные для медицинского применения. Исследования иммунотоксичности лекарственных средств, предназначенных для человека.

ICH S8 Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. CHMP/167235/2004. EMA; 2006.

билирубин, общий холестерин, триглицериды, глюкоза (аналогично исследованиям [8-10]).

На 270 и 300 сут было проведено исследование физико-химического состава мочи по показателям кровь, белок, глюкоза, билирубин (с помощью качественных реакций), относительная плотность (рефрактометр AMTAST VUR3T, «AMTAST», США) и pH (диагностические тест-полоски, DF, Китай).

Регистрацию параметров электрокардиограммы (ЭКГ), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и артериального давления (АД, прибор Zoomed BPM-2, Zoomed, Россия) проводили до введения и на 270 сут. Для регистрации ЭКГ и АД животных предварительно наркотизировали (препаратами Медитин (ООО «Апиценна», Россия) в дозе 0,004 мг/кг при внутримышечном введении и Пропофол каби (ФРЕЗЕНИУС КАБИ, Австрия) в дозе 1 мг/кг при внутривенном введении), что допустимо согласно регуляторному документу⁹.

Регистрацию ЭКГ проводили с помощью компьютерного электрокардиографа для ветеринарии «Поли-спектр-8В» (ООО «Нейрософт», Россия) и прижимных электродов. ЭКГ была записана в течение 1 минуты и проанализирована в отведении II. Оценивали следующие показатели: ЧСС, RR (мс), P (мс), PQ (мс), QRS (мс), QT (мс). Регистрацию АД проводили с помощью прибора Zoomed BPM-2 (Zoomed, Россия). Измерение АД включало в себя регистрацию систолического и диастолического артериального давления (САД и ДАД). Манжету для измерения накладывали на предплечье. У каждого животного делали три измерения (интервал между измерениями не менее 2-х минут), затем вычисляли среднее САД и ДАД.

Потенциальную способность препарата вызывать развитие лекарственной зависимости оценивали по выраженности синдрома отмены после прекращения введения. С этой целью у всех «оставленных» животных проводили:

- регистрацию поведенческих отклонений (в течение 7 дней до окончания введения тестируемого препарата и в течение 7 дней после окончания введения регистрировали любые неврологические и поведенческие отклонения, которые могли указывать на наличие синдрома отмены - например, тремор, судороги, встряхивания, вздрагивания, стук зубами, почесывания, чихания, изменения в походке, положении тела, реакции на прикосновение, вокализация);

- регистрацию температуры тела (на 269-й и на 271-й дни с помощью ректального термомет-

ра (ректального датчика) и ветеринарного монитора пациента Zoomed IM-10, ЗАО «Ист Медикал», Россия);

- регистрацию АД (на 269-й и 271-й дни).

Три животных каждого пола из каждой экспериментальной группы и все животные контрольной группы были эвтаназированы на 271 сут эксперимента, оставшиеся – на 301 сут эксперимента.

Этаназию животных проводили передозировкой анестетиком (поочередное внутривенное введение препаратов Трамадол, Пропофол и Ридилат в дозах в два-три раза превышающих терапевтические) с последующим удалением жизненно важных внутренних органов¹⁰.

Патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание внутренних органов и гистологический анализ.

Для выявления местнораздражающего действия препарата (аналогично работам [8, 9]) проводили патоморфологическое исследование органов желудочно-кишечного тракта (ротовая полость, пищевод, желудок, кишечник).

Потенциальное иммунотоксическое действие (как и в исследованиях [8, 9]) оценивали у всех животных по показателям общего количества лейкоцитов в крови, лейкоформуле, абсолютным дифференциальным показателям лейкоцитов, уровню глобулинов, по результатам патоморфологического исследования лимфоидных органов (тимус, селезенка, подчелюстные и желудочные лимфатические узлы) и анализа массовых коэффициентов органов (тимус, селезенка)¹¹.

При проведении клинических наблюдений/осмотров, а также при некропии животные были осмотрены на предмет наличия любых новообразований для оценки возможных канцерогенных свойств исследуемого препарата.

Токсикокинетическое исследование. Кровь (в объеме 2,0 мл через внутривенный катетер 22G, KD Medical GmbH Hospital Products, Германия, установленный в латеральную подкожную вену грудной конечности) забирали у всех самцов из каждой группы №№ 1–4 на 1–2 сут, и 270–271 сут эксперимента на следующих временных точках: до введения препарата, через 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 24 ч после введения препарата, с последующим получением плазмы крови (ан-

⁹ Guideline I.C.H.N.T. The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (Qt Interval Prolongation) by human pharmaceuticals S7B – 2005.

¹⁰ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях

¹¹ ICH S8. Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. CHMP/167235/2004. EMA; 2006.

ГОСТ Р 58173-2018. Средства лекарственные для медицинского применения. Исследования иммунотоксичности лекарственных средств, предназначенных для человека.

тикоагулянт – гепарин, пробирки IM-PROVACUTER, Guangzhou Improve Medical Instruments Co., LTD, Китай, центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин с использованием центрифуги LMC-3000, ООО «BioSan», Латвия).

Определение содержания фенозановой кислоты в биологических образцах (плазме крови собак) выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) с помощью предварительно разработанной и валидированной методики [11].

Анализ данных. Статистическому анализу были подвергнуты данные, полученные от животных, получавших тестируемый препарат в период введения. При наличии исходных данных (фоновые значения), показатели, полученные в ходе эксперимента, сравнивали с исходными. Для всех данных применена описательная статистика, включающая проверку на соответствие закону нормального распределения (по критерию Шапиро–Уилка), расчет среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Оценку межгрупповых различий (при уровне значимости $p=0,05$) данных с признаками нормального распределения проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением с использованием теста Тьюки (*post-hoc* Tukey's test); оценка данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, выполнена с применением критерия Краскела–Уоллиса. Статистический анализ выполнен с помощью лицензионного программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США).

Для расчета фармакокинетических параметров (максимальная концентрация C_{max} , время достижения максимальной концентрации T_{max} , площадь под кривой «концентрация–время» AUC, среднее время удерживания MRT и период полувыведения $T_{1/2}$) применен внемоделный метод статистических моментов [12] с использованием валидированного приложения PKSolver для Microsoft Office Excel; сравнение исследуемых фармакокинетических параметров проведено с помощью ANOVA с применением параметрических (двухвыборочный t-тест для средних, для параметров C_{max} , AUC, C_{max}/AUC_{0-t}) и непараметрических (тест Манна–Уитни, для параметров T_{max} , MRT, $T_{1/2}$) методов (согласно рекомендациям¹²).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Токсические свойства

Средняя масса тела собак на начало эксперимента составляла: $12,3 \pm 0,5$ кг (самцы) и $11,6 \pm 0,2$ кг (самки). В период введения и период отсроченного наблюдения динамика массы тела самцов и самок всех групп характеризовалась физиологическими сезонными колебаниями; для животных, получавших тестируемый препарат, была сопоставима с показателями группы контроля. Влияния препарата на динамику массы тела и потребление корма не выявлено. Клиническую картину интоксикации наблюдали на протяжении всего периода наблюдения: в период введения для дозы 24 мг/кг выявлены единичные случаи тремора в покое, единичные случаи отказа или уменьшения потребления корма; для дозы 60 мг/кг – тремор в покое (до 100% животных) и единичные случаи отказа от корма, для дозы 120 мг/кг – тремор в покое (до 100% животных), единичные случаи незначительного угнетения поведения и отказ от корма; в период отсроченного наблюдения для дозы 24 мг/кг – единичные случаи отказа или уменьшения потребления корма, для дозы 60 мг/кг – единичный случай тремора в покое, для дозы 120 мг/кг – 4 дня после окончания введения тремор в покое, далее норма (табл. 1. «Основные признаки интоксикации (тремор) у самцов (♂) и самок (♀), получавших тестируемый препарат, период введения и период отсроченного наблюдения»).

У одного самца из группы 2 (получавших препарат в дозе 24 мг/кг, самец 2.4) было отмечено угнетение поведения (начиная с 63-го дня эксперимента), в последующие дни отмечена дрожь в покое, а также повышение температуры тела до $39,2^\circ\text{C}$. Животное было выведено из эксперимента с 71-го по 97-й дни эксперимента для проведения терапии и дальнейшего восстановления. На 98-й день эксперимента животное было возвращено в эксперимент и продолжило получать препарат в соответствии с дизайном эксперимента. На 118-119 дни эксперимента у него вновь было отмечено угнетение поведения, признаки выраженной болезненности в области брюшной полости (вздутый живот) и повышение температуры тела до $39,9^\circ\text{C}$. Далее, начиная с 120-го дня, животное находилось на терапии в ветеринарной службе. Учитывая, что при отмене введения тестируемого препарата, состояние животного постепенно нормализовалось, было принято решение об исключении животного из эксперимента (без эвтаназии). Выявленные признаки интоксикации у данного животного оценены как индивидуальная

¹² Решение Совета ЕЭК № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского Экономического Союза» от 03.11.16.

Таблица 1

Table 1

Основные признаки интоксикации (тремор) у самцов (♂) и самок (♀), получавших тестируемый препарат, отмеченные в период введения и период отсроченного наблюдения

Main signs of intoxication (tremor) in males (♂) and females (♀) receiving the test drug, marked during administration period and delayed observation period

Дни Days	Препарат, доза, пол и количество (n) животных Medicinal product, dose, sex and number (n) of animals			
	Контроль Control	24 мг/кг 24 mg/kg	60 мг/кг 60 mg/kg	120 мг/кг 120 mg/kg
	n=4 (♂+♀)	n=10 (♂+♀)	n=10 (♂+♀)	n=10 (♂+♀)
1	–	1	10*	10*
2	–	–	10*	10*
7	–	–	–	–
35	–	–	1	3
58	–	2	4	2
69	–	1	1	4
112	–	–	5	9*
119	–	–	5	7*
156	–	3**	8*	8*
198	–	1**	9*	10*
225	–	5**	6	8*
270	–	–**	10*	10*
	n=0 (♂+♀)	n=3 (♂+♀)	n=4 (♂+♀)	n=4 (♂+♀)
273	–	–	1	2
275	–	–	–	–

Примечания: данные представлены в формате – количество животных в группе, у которых отмечен тремор. * Уровень значимости $p<0,05$, статистически значимые отличия от группы контроля, критерий Фишера. ** Для группы 2 $n=9$ поскольку животное 2.4 выведено из эксперимента в связи с индивидуальной непереносимостью препарата.

Note: data are presented in the format number of animals in the group with tremor. * Probability level $p<0.05$, statistically significant differences from control group, Fisher's test. ** For Group 2, $n = 9$ since animal 2.4 was withdrawn from the experiment due to individual intolerance to the drug.

непереносимость тестируемого препарата. Во всех остальных случаях, наблюдаемые токсические проявления не имели критичного характера для благополучия животных, продолжали введение препарата без изменения дозы и/или режима дозирования и без выведения животных из эксперимента. Не было отмечено усиления тяжести или частоты проявления наблюдаемых нежелательных явлений (тремор, отказ от корма, угнетение поведения) в ходе длительного (270-е сут) введения исследуемого препарата.

Результаты клинического анализа крови выявили влияние препарата в период введения на показатели «красной» крови (на 90-е и 270-е сут). В группах самцов и самок, получавших тестируемый препарат, выявлено статистически значимое снижение гематокрита, уровня эритроцитов и гемоглобина по сравнению с исходной точкой (критерий Тьюки, таблица 1, $p<0,05$). Снижение показателей «красной крови» было более выраженным в группе максимальной дозы. При анализе дополнительных пара-

метров «красной крови» у самцов и самок, выявлено статистически значимое снижение среднего содержания гемоглобина в эритроцитах, снижение ширины распределения эритроцитов по объему (критерий Тьюки, $p<0,05$). В период отсроченного наблюдения влияния тестируемого препарата на показатели клинического анализа крови не выявлено.

Показатели гемостаза находились в границах физиологических норм для всех групп экспериментальных животных в период введения и период отсроченного наблюдения.

По результатам биохимического анализа крови в период введения в группах самцов (на всех дозах) и самок в максимальной дозе выявлено снижение содержания альбуминов, в группах самцов максимальной дозы выявлено снижение общего белка. В группах самцов и самок средней и максимальной доз выявлено снижение холестерина. Отношение А/Г в группах самцов средней и максимальной доз было снижено (на 23-27%) относительно исходных

Таблица 2

Table 2

Основные показатели клинического и биохимического анализов крови собак, получавших препарат
фенозановой кислоты

Main clinical and biochemical parameters of blood of dogs treated with phenosan acid product

Показатель Parameter	Препарат, доза, пол и количество (n) животных Medicinal product, dose, sex and number (n) of animals							
	Контроль, n=2 Control		24 мг/кг, n=4 24 mg/kg		60 мг/кг, n=5 60 mg/kg		120 мг/кг, n=5 120 mg/kg	
	Самцы Male	Самки Female	Самцы Male	Самки Female	Самцы Male	Самки Female	Самцы Male	Самки Female
	Результаты биохимического анализа крови (-2 сут эксперимента) Blood biochemistry results (Day -2)							
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, $\mu\text{mol/L}$	81.8; 76.2	80.6; 80.5	89.2 $\pm$ 6.4	85.1 $\pm$ 1.6	76.1 $\pm$ 2.8	74.6 $\pm$ 2.0	85.7 $\pm$ 2.6	87.7 $\pm$ 4.8
Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/L	4.72; 4.74	4.59; 4.02	6.68 $\pm$ 0.65	4.46 $\pm$ 0.34	4.70 $\pm$ 0.35	3.87 $\pm$ 0.34	5.31 $\pm$ 0.4 6	5.25 $\pm$ 0.06
Аспарагиновая трансаминаза, Ед/л Aspartate aminotransfer- ase, U/L	28.9; 36.3	37.2; 38.2	44.4 $\pm$ 1.7	38.1 $\pm$ 1.4	47.3 $\pm$ 2.4	39.5 $\pm$ 1.7	47.0 $\pm$ 2. 9	45.0 $\pm$ 2. 6
Аланиновая трансаминаза, Ед/л Alanine aminotransfer- ase, U/L	57.0; 53.5	39.8; 44.6	55.1 $\pm$ 6.5	48.5 $\pm$ 2.6	53.9 $\pm$ 3.0	48.9 $\pm$ 3.3	56.2 $\pm$ 2. 7	45.8 $\pm$ 1.8
Щелочная фосфатаза, Ед/л Alkaline phosphatase, U/L	132; 185	77; 108	136 $\pm$ 24	213 $\pm$ 17	162 $\pm$ 11	125 $\pm$ 21	143 $\pm$ 12	151 $\pm$ 12
Билирубин общий, мкмоль/л Total bilirubin, $\mu\text{mol/L}$	1.74; 1.55	2.67; 2.58	1.52 $\pm$ 0.17	0.74 $\pm$ 0.22	1.25 $\pm$ 0.10	2.61 $\pm$ 0.08	1.40 $\pm$ 0.25	2.99 $\pm$ 1.10
Холестерин, ммоль/л Cholesterol, mmol/L	5.72; 5.36	4.95; 4.37	6.65 $\pm$ 0.23	6.17 $\pm$ 0.20	4.93 $\pm$ 0.2 8	6.54 $\pm$ 0.22	6.09 $\pm$ 0.3 4	6.61 $\pm$ 0.39
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	0.45; 0.46	0.42; 0.31	0.58 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.0 3	0.55 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.0 2	0.55 $\pm$ 0.03
Общий белок, г/л Total protein, g/L	60.7; 55.4	56.4; 58.3	60.9 $\pm$ 1.2	60.1 $\pm$ 0.5	56.7 $\pm$ 1.1	61.1 $\pm$ 2.0	57.3 $\pm$ 1.0	59.7 $\pm$ 1.3
Альбумин (А), г/л Albumin (A), g/L	34.2; 34.8	35.4; 35.7	36.0 $\pm$ 1.1	36.0 $\pm$ 0.31	33.3 $\pm$ 0.9 1	35.6 $\pm$ 0.9	34 $\pm$ 0.4	35.2 $\pm$ 0.74
Глобулины (G), г/л Globulins (G), g/L	26.5; 20.6	21.0; 22.6	24.9 $\pm$ 0.47	24.1 $\pm$ 0.34	23.4 $\pm$ 0.3	25.5 $\pm$ 1.44	23.3 $\pm$ 0.7	24.4 $\pm$ 1.0
Отношение А/Г A/G Ratio	1.29; 1.69	1.69; 1.58	1.45 $\pm$ 0.07	1.50 $\pm$ 0.027	1.42 $\pm$ 0.0 4	1.41 $\pm$ 0.07	1.46 $\pm$ 0.0 3	1.45 $\pm$ 0.06
Глюкоза Glucose	5.77; 5.95	5.67; 5.21	5.62 $\pm$ 0.25	5.98 $\pm$ 0.22	6.19 $\pm$ 0.1 3	5.61 $\pm$ 0.22	6.19 $\pm$ 0.1 0	5.22 $\pm$ 0.16
Результаты биохимического анализа крови (270 сут эксперимента) Blood biochemistry results (Day 270)								
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, $\mu\text{mol/L}$	82.7; 100.1	67.5; 55.8	90.3 $\pm$ 2.0	81.1 $\pm$ 5.3	83.5 $\pm$ 3.9	78.5 $\pm$ 3.4	92.2 $\pm$ 2.5	90.5 $\pm$ 2.3
Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/L	3.53; 4.45	4.48; 4.17	5.19 $\pm$ 0.39	4.62 $\pm$ 0.09	3.77 $\pm$ 0.23	3.77 $\pm$ 0.23	4.16 $\pm$ 0.18	4.15 $\pm$ 0.33

Таблица 2. Продолжение

Table 2. Continuation

Аспарагиновая трансаминаза, Ед/л Aspartate aminotransferase, U/L	33.6; 38.6	36.8; 32.1	37.3±0.8	30.9±1.1	36.6±2.0	34.3±1.5	34.7±2.1 [*]	37.0±3.5
Аланиновая трансаминаза, Ед/л Alanine aminotransferase, U/L	43.4; 63.3	54.6; 45.2	57.2±4.1	51.4±2.5	52.1±3.0	53.9±3.6	53.3±0.5	58.2±2.9 [*]
Щелочная фосфатаза, Ед/л Alkaline phosphatase, U/L	137; 218	187; 155	116±16	171±12	162±17	191±10 [*]	154±20	192±12
Билирубин общий, мкмоль/л Total bilirubin, μmol/L	2.61; 2.83	2.18; 3.03	2.50±0.16	2.70±0.25	2.57±0.29	2.29±0.12	2.38±0.33	1.97±0.32
Холестерин, ммоль/л Cholesterol, mmol/L	4.21; 4.44	5.64; 5.37	4.80±0.10	4.88±0.61	3.64±0.27	4.09±0.12	3.76±0.44 [*]	5.19±0.88
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	0.18; 0.17	0.46; 0.64	0.33±0.05 [*]	0.52±0.08	0.28±0.07 [*]	0.54±0.06	0.27±0.03 [*]	0.58±0.04
Общий белок, г/л Total protein, g/L	57.2; 61.9	56.7; 58.0	58.9±0.3	57.1±1.3	57.4±2.2	59.5±1.0	51.4±1.3 [*]	58.5±1.7
Альбумин (А), г/л Albumin (A), g/L	35.9; 33.4	28.9; 32.3	31.2±1.0	31.3±0.5	29.8±1.0	33.5±0.8	26.5±1.0 [*]	30.8±1.7 [*]
Глобулины (G), г/л Globulins (G), g/L	21.3; 28.5	27.8; 25.7	27.8±0.8	25.8±1.1	27.6±1.6	26.0±0.4	24.9±0.5	27.7±1.0
Отношение А/Г A/G Ratio	1.69; 1.17	1.04; 1.26	1.13±0.075 [*]	1.22±0.057 [*]	1.09±0.055 [*]	1.29±0.036	1.06±0.031 [*]	1.12±0.089 [*]
Глюкоза Glucose	4.52; 4.24	4.99; 5.03	4.31±0.24	4.96±0.11	4.67±0.24	4.61±0.12	4.80±0.20 [*]	5.08±0.17
Результаты клинического анализа крови (-2 сут эксперимента)								
Blood count results (Day -2)								
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leucocytes, 10 ⁹ /L	12.3; 8.5	7.8; 10.7	11.1±1.2	9.7±0.5	10.8±0.5	10.4±0.5	9.9±0.5	9.4±0.6
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	7.2; 10.5	7.4; 9.3	8.8±1.2	10.0±0.8	11.2±0.7	10.3±1.9	10.0±0.5	10.0±0.3
Моноциты, % Monocytes, %	4.5; 6.1	4; 6; 1.0	4.6±0.2	5.2±0.1	5.4±0.1	4.5±0.3	5.7±0.3	5.7±0.2
Гранулоциты, % Granulocytes, %	88.3; 83.4	88.6; 84.6	86.6±1.3	84.8±0.9	83.4±0.7	85.2±1.9	84.3±0.7	84.5±0.4
Эритроциты, 10 ¹² /л Red blood cells, 10 ¹² /L	8.7; 7.6	8.6; 7.69	7.9±0.1	8.4±0.1	7.4±0.3	7.7±0.5	6.9±0.3	7.9±0.2
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	165; 154	173; 161	159±2.6	169±1.7	145±5.2	155±9.8	137±4.2	161±4.0
Гематокрит, % Hematocrit, %	56.2; 54.3	61.3; 57.5	56.9±0.0	59.7±0.0	51.1±0.0	55.2±0.0	48.2±0.0	56.8±0.0
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, пг Mean red blood cell haemoglobin, pg	19.1; 20.3	20.2; 20.9	20.0±0.1	20.1±0.2	19.7±0.1	20.5±0.2	20.1±0.5	20.2±0.3

Таблица 2. Продолжение

Table 2. Continuation

Ширина распределения эритроцитов по объему, % Red blood cell distribu- tion width by volume. %	14.2; 14.0	14.1; 13.4	13.9±0.2	13.8±0.2	14.3±0.3	13.8±0.3	14.0±0.2	14.2±0.2
Результаты клинического анализа крови (270 сут эксперимента)								
Blood count results (Day 270)								
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leucocytes, 10 ⁹ /L	9.4; 6.7	7.0; 7.7	8.7±0.4	6.8±0.5 *	9.5±0.2	7.0±0.6 *	7.8±0.6	7.6±0.5
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	6.2; 7.3	9.8; 8.3	8.0±1.2	7.3±0.6	11.2±1.3	9.5±1.2	9.5±0.6	9.8±0.7
Моноциты, % Monocytes, %	1.5; 2.0	1.5; 2.1	1.8±0.2 *	2.0±0.1 *	2.5±0.2 *	2.2±0.1 *	2.4±0.2 *	2.1±0.1 *
Гранулоциты, % Granulocytes, %	92.3; 90.7	88.7; 89.6	90.3±1.4	90.7±0.6	86.3±1.2	88.3±1.2	88.1±0.6	88.1±0.7
Эритроциты, 10 ¹² /л Red blood cells, 10 ¹² /L	7.0; 7.56	6.4; 6.54	6.9±0.1 *	6.0±0.2 *	6.6±0.2 *	6.7±0.1 *	6.0±0.2 *	6.0±0.1 *
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	129; 141	125; 133	132±2.4 *	116±3.3 *	124±3 *	130±3 *	115±2 *	120±2 *
Гематокрит, % Hematocrit, %	48.9; 53.6	45.6; 49.5	50.3±0.0 *	43.3±0.0 *	48.0±0.0 *	48.4±0.0 *	45.5±0.0	44.6±0.0 *
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, пг Mean red blood cell hae- moglobin, pg	18.6; 18.7	19.5; 20.3	19.1±0.1 *	19.1±0.1 *	18.9±0.3 *	19.3±0.1 *	19.1±0.4 *	20.1±0.2
Ширина распределения эритроцитов по объему, % Red blood cell distribu- tion width by volume, %	13.2; 13.2	12.7; 11.8	12.5±0.3 *	12.4±0.1 *	12.8±0.4 *	12.5±0.1 *	12.5±0.2 *	12.4±0.1 *
Результаты клинического анализа крови (300 сут эксперимента)								
Blood count results (Day 300)								
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leucocytes, 10 ⁹ /L	-	-	8.1	8.0; 8.2	9.9; 6.4	8.7; 9.4	8.1; 7.5	8.3; 6.7
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	-	-	5.5	5.8; 4.2	6.3; 8.7	6.9; 11.2	7.6; 9.0	5.9; 8.9
Моноциты, % Monocytes, %	-	-	1.3	1.3; 1.1	1.5; 1.7	1.6; 1.2	1.0; 1.6	1.1; 1.8
Гранулоциты, % Granulocytes, %	-	-	93.2	92.9; 94.7	92.2; 89.6	91.5; 87.6	91.4; 89.4	93.0; 89.3
Эритроциты, 10 ¹² /л Red blood cells, 10 ¹² /L	-	-	6.49	7.05; 6.77	7.11; 7.01	6.06; 6.47	7.08; 6.63	6.26; 6.77
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	-	-	131	137; 132	142; 134	124; 133	130; 131	126; 135
Гематокрит, % Hematocrit, %	-	-	46.8	50.5; 48.7	50.9; 47.9	43.2; 47.8	46.1; 46.7	47.2; 49.1
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, пг Mean red blood cell hae- moglobin, pg	-	-	20.2	19.4; 19.5	20.0; 19.1	20.5; 20.6	18.4; 19.8	20.1; 19.9

Таблица 2. Окончание

Table 2. End

Ширина распределения эритроцитов по объему. % Red blood cell distribu- tion width by volume. %	-	-	12.4	12.3; 12.6	12.7; 13.5	12.0; 12.1	13.0; 12.4	12.1; 13.3
---	---	---	------	------------	---------------	------------	---------------	------------

Примечание: данные представлены в формате $M \pm SEM$ – среднее значение и стандартная ошибка среднего, для контрольной группы – индивидуальные значения. Для самцов группы 2 $n=4$ поскольку животное 2.4 выведено из эксперимента в связи с индивидуальной непереносимостью препарата. На 300-й день для контрольной группы не определяли (-), для дозы 24 мг/кг самцов $n=1$ (поскольку животное 2.4 выведено из эксперимента), для остальных случаев – $n=2$. * Уровень значимости $p < 0,05$, статистически значимые отличия от исходного уровня, критерий Тьюки.

Note: data are presented as $M \pm SEM$ (mean and standard error of the mean), for control group – individual values. For Group 2 males, $n = 4$ since animal 2.4 was withdrawn from the experiment due to individual intolerance to the drug. Day 300 for control group not determined (-), for dose 24 mg/kg $n=1$ (since animal 2.4 was withdrawn from the experiment), for other cases $n=2$. * Probability level $p < 0.05$, statistically significant differences from basic level, Tukey's test.

Таблица 3

Table 3

Массовые коэффициенты основных органов собак, получавших препарат фенозановой кислоты

Relative weights of major organs of dogs treated with phenosan acid product

Основные органы Major organs	Массовый коэффициент (% от массы тела) в зависимости от применяемого препарата Relative organ weights (% of total body weight) according to the product received			
	Контроль, n=2 Control	Тестируемый препарат Tested drug		
		24 мг/кг, n=3 24 mg/kg	60 мг/кг, n=3 60 mg/kg	120 мг/кг, n=3 120 mg/kg
271 сут эксперимента, самцы Day 271, males				
Сердце Heart	0.74; 0.83	0.89±0.07	0.95±0.03	0.87±0.02
Легкие с трахеей Lungs and trachea	0.82; 0.76	0.73±0.03	0.82±0.07	0.85±0.02
Тимус Thymus	0.060; 0.086	0.078±0.011	0.057±0.017	0.046±0.007
Печень Liver	3.52; 3.71	3.53±0.18	4.35±0.58	4.94±0.57
Селезенка Spleen	0.26; 0.22	0.32±0.05	0.26±0.02	0.25±0.03
Почки Kidneys	0.58; 0.47	0.48±0.01	0.54±0.04	0.48±0.05
Надпочечники Adrenal glands	0.012; 0.009	0.009±0.000	0.010±0.001	0.012±0.002
Головной мозг Brain	0.64; 0.70	0.63±0.02	0.74±0.07	0.72±0.04
Семенники Testes	0.113; 0.141	0.106±0.016	0.137±0.002	0.126±0.019
271 сут эксперимента, самки Day 271, females				
Сердце Heart	0.80; 0.76	0.75±0.06	0.80±0.02	0.81±0.02
Легкие с трахеей Lungs and trachea	0.79; 0.79	0.79±0.09	0.76±0.04	0.71±0.03

Таблица 3. Окончание

Table 3. End

Тимус Thymus	0.039; 0.047	0.076±0.004	0.060±0.017	0.045±0.018
Печень Liver	5.10; 4.07	4.02±0.19	3.84±0.13	4.14±0.23
Селезенка Spleen	0.28; 0.25	0.35±0.08	0.37±0.09	0.22±0.02
Почки Kidneys	0.42; 0.40	0.38±0.02	0.41±0.01	0.36±0.01
Надпочечники Adrenal glands	0.009; 0.011	0.01±0.000	0.007±0.001	0.009±0.001
Головной мозг Brain	0.56; 0.59	0.62±0.03	0.55±0.02	0.62±0.04
Яичники Ovaries	0.017; 0.015	0.011±0.001	0.008±0.001	0.011±0.002

Примечание. Данные представлены в формате $M \pm SEM$ – среднее значение и стандартная ошибка среднего, для контрольной группы – индивидуальные значения.

Note. Data are presented as $M \pm SEM$ (mean and standard error of the mean), for control group – individual values.

данных. По окончании периода отсроченного наблюдения клинически значимых изменений биохимических показателей крови не выявлено.

По результатам общего анализа мочи не выявлено клинически значимого влияния препарата на показатели общего анализа мочи, как по окончании периода введения, так и по окончании периода отсроченного наблюдения.

Исследуемый препарат не оказал влияния на ЭКГ, ЧСС, а также на АД у наркотизированных животных (как по сравнению с контрольной группой, так и по отношению к исходным данным). Показатели ЭКГ и АД находились в пределах физиологических норм для данного вида лабораторных животных [13].

Наиболее значимые параметры представлены в таблице 2 «Основные показатели клинического и биохимического анализов крови собак, получавших препарат фенозановой кислоты».

После прекращения введения тестируемого препарата в исследованном диапазоне доз не было выявлено каких-либо поведенческих изменений, которые могли бы свидетельствовать о развитии синдрома отмены. По показателям температуры тела, АД и потреблению корма и воды клинически значимых изменений у самцов и самок, получавших тестируемый препарат, после окончания введений не выявлено.

На 271-е и на 301-е сут эксперимента при патологоанатомическом исследовании по окончании периода введения в группах самцов средней и максимальной доз, отмечено повышение массовых коэффициентов печени (в средней дозе на 20 %, в максимальной дозе на 37%) без статистической значимости; по окончании периода отсроченного наблюдения влияния тестируемо-

го препарата на массовые коэффициенты органов не зарегистрировано (табл. 3 «Массовые коэффициенты основных органов собак, получавших препарат фенозановой кислоты»). Гистологическое строение органов соответствовало норме.

Местнораздражающее действие. На 271-е и на 301-е сут эксперимента у всех животных в месте введения (ротовая полость, пищевод, желудок) и в кишечнике макроскопически видимых изменений не обнаружено. Гистологическое строение желудка, тонкой и толстой кишки соответствовало норме.

Иммунотоксические свойства. Отличий от контроля по параметрам клинического и биохимического анализа крови (общее количество лейкоцитов, абсолютное количество лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов, уровень глобулинов, табл. 2), массовым коэффициентам тимуса и селезенки (табл. 3) выявлено не было. Гистологическое строение лимфоидных органов (тимус, селезенка, околушные лимфатические узлы) у всех животных соответствовало норме. Полученные данные позволили сделать вывод об отсутствии иммунотоксического действия при курсовом введении препаратов в исследуемом диапазоне доз, как после окончания введения, так и после окончания отсроченного наблюдения.

Изменений, свидетельствующих о наличии канцерогенных свойств тестируемого препарата, не обнаружено.

У собак были зарегистрированы признаки интоксикации при введении преимущественно средней 60 мг/кг и максимальной дозы 120 мг/кг тестируемого препарата. Основными клиниче-

скими проявлениями токсических эффектов были: тремор в покое, единичные случаи незначительного угнетения поведения и отказ от корма. В группе минимальной дозы 24 мг/кг тестируемого препарата отмечены случаи тремора и снижение потребления или отказ от корма. Признаки интоксикации во всех группах тестируемого препарата постепенно разрешались в течение 4-5 дней после окончания введений.

Таким образом, данные полученные в ходе оценки общетоксических свойств препарата фенозановой кислоты, свидетельствовали, что токсические эффекты тестируемого препарата увеличивались с увеличением дозы препарата, достигая наибольшей выраженности в группе максимальной дозы. По совокупности полученных данных доза, не оказывающая явного нежелательного действия (NOAEL), не установлена.

Оценка токсикокинетики

Кинетика фенозановой кислоты в плазме крови после однократного и многократного (в течение 270 сут) введения препарата в трех дозах была характерной для лекарственных форм, применяемых перорально (рис. 1) – после введения наблюдали постепенный подъем концентрацией анализита в плазме крови, максимальную концентрацию фенозановой кислоты отмечали через 2-4 ч после введения, далее наблюдали постепенное ее снижение. К 24 ч после введения концентрация фенозановой кислоты составила около 16-50% от максимального уровня, что свидетельствовало о медленном выведении действующего вещества тестируемого препарата из системного кровотока собак. В нулевой точке (перед введением препаратов) исследование проб плазмы крови всех собак не выявило наличия определяемого соединения; значения концентраций анализита ниже НПКО принимали равными нулю. Фенозановая кислота не обнаружена ни в одной из проб, полученных от животных группы 1 в первый и последний дни введения, что свидетельствовало об отсутствии контаминации животных группы, получавшей контрольное вещество. Доказательство отсутствия контаминации важно для подтверждения корректности исследования токсикокинетики и в целом, исследования токсичности и безопасности тестируемого препарата¹³ [14].

Токсикокинетические профили фармакологического средства в крови при его пероральном введении охарактеризованы такими параметрами, как C_{max}, AUC, MRT, T_{1/2}, T_{max}¹⁴, рассчитанными внемоделным методом статистических моментов [12]. Обобщенные данные по фармакокинетическим параметрам, полученным для исследованного препарата за весь период эксперимента, представлены в таблице 4.

Результаты оценки токсических свойств показали, что исследуемый препарат при многократном пероральном введении в течение 270-х сут в высшей терапевтической дозе и дозах, превышающих терапевтическую, оказал токсическое действие на организм лабораторных животных – выявлены тремор в покое, случаи незначительного угнетения поведения, снижения потребления или отказа от корма (для ВТД – единичные случаи). Исследуемый препарат не оказал местнораздражающего действия на слизистую оболочку желудка и кишечника. По данным проведенного исследования не установлена доза, не оказывающая видимого нежелательного эффекта (no observed adverse effect level, NOAEL), поскольку, по-видимому, она ниже минимально изученной дозы (24 мг/кг).

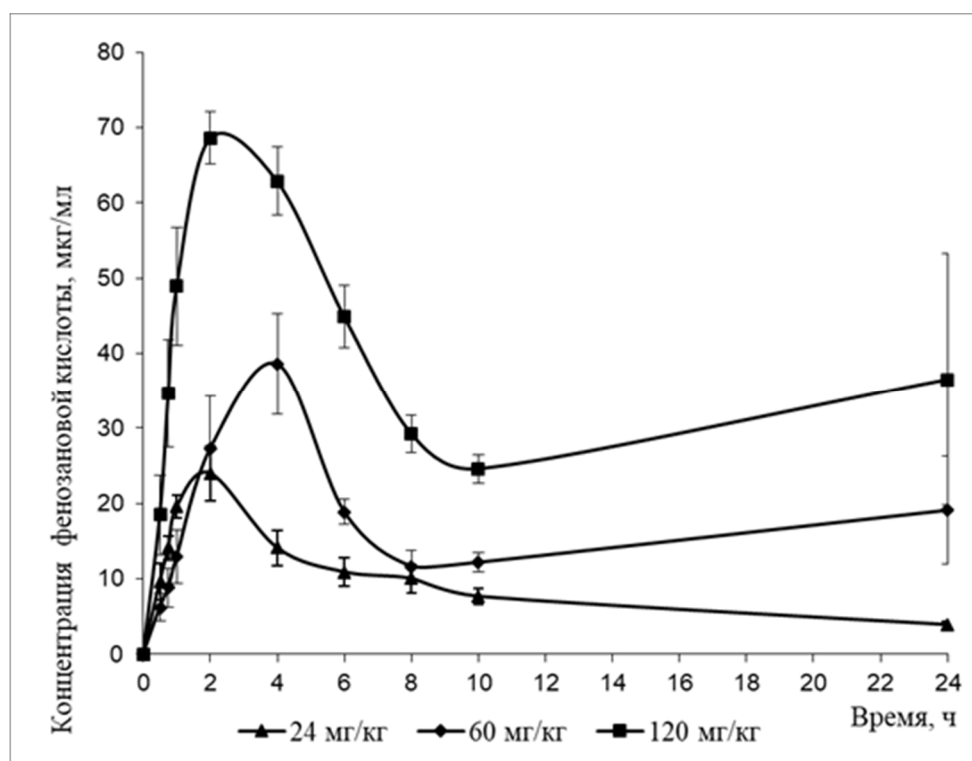
Целесообразность изучения более низких доз для установления NOAEL представляется сомнительной по ряду причин – в данном исследовании нежелательные явления для ВТД были редкими; выбор дозы (24 мг/кг) и принятие ее в качестве ВТД выполнено на основании максимальной суточной (не разовой) дозы, рекомендованной для применения у человека, с учетом межвидовых коэффициентов пересчета доз с человека на различные виды лабораторных животных, что является общепринятым, но все-таки достаточно условным и не лишенным погрешностей приемом. Таким образом, ВТД можно рассматривать как пограничную дозу между терапевтической и превышающей терапевтическую.

Кроме того, препарат зарегистрирован в РФ и рекомендован для медицинского применения у человека, поэтому углубленные пострегистрационные исследования безусловно важны, как мы отмечали ранее, но приоритетным является

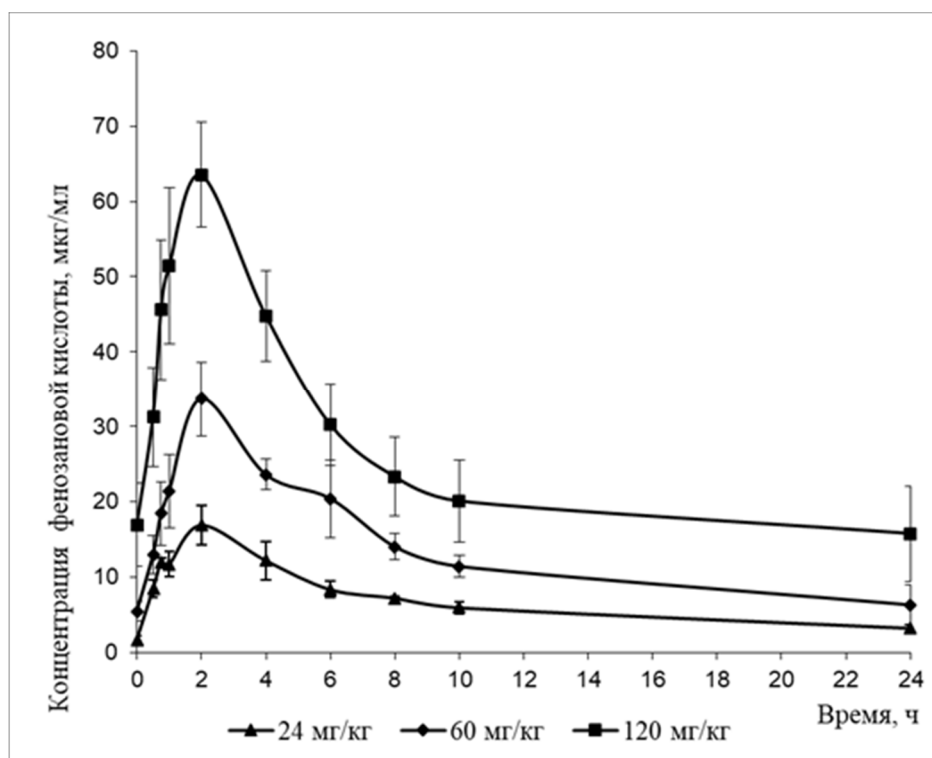
Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu

¹⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Милованов А.Н. М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

¹³ Рекомендациям ЕАЭК №10 от 21.05.2020 г. «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».



А.



В.

Рис. 1. Фармакокинетические кривые фенозановой кислоты в плазме крови после однократного (А) и многократного (В) перорального введения тестируемого препарата в дозах 24, 60 и 120 мг/кг в линейных координатах (количество животных n=5, среднее значение и стандартная ошибка среднего $M \pm SEM$).

Fig. 1. Pharmacokinetic curves of phenosanic acid in dog plasma after single (A) and multiple (B) oral administration of the test product in the doses of 24, 60 and 120 mg/kg in linear coordinates (n=5 animals; $M \pm SEM$, mean and standard error of the mean).

Таблица 4

Table 4

Сводная таблица основных фармакокинетических параметров (количество животных $n=5$, самцы)Summary table of the main pharmacokinetic parameters ($n=5$ animals, males)

Сутки введения Day of administration	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Значения фармакокинетических параметров Values of pharmacokinetic parameters				
		$C_{\max}^A$, МКГ/МЛ $C_{\max}$, $\mu\text{g/mL}$	$T_{\max}^B$, ч $T_{\max}$, h	AUC_{0-24}^A , ч $\times$ МКГ/МЛ AUC_{0-24} , h $\times\mu\text{g/mL}$	MRT^B , ч MRT , h	$T_{1/2}^B$, ч $T_{1/2}$, h
1	24	24.8 $\pm$ 7.5	1.8 $\pm$ 0.5	214.0 $\pm$ 56.1	17.8 $\pm$ 5.3	13.5 $\pm$ 4.6
	60	45.0 $\pm$ 11.4 ^C	3.2 $\pm$ 1.1	422.7 $\pm$ 140.0 ^C	53.8 $\pm$ 39.0	36.6 $\pm$ 26.7
	120	77.9 $\pm$ 9.8 ^C	6.8 $\pm$ 9.7	875.3 $\pm$ 231.2 ^C	84.6 $\pm$ 137.7	57.3 $\pm$ 93.9
270	24	17.1 $\pm$ 5.0	1.7 $\pm$ 0.6	164.8 $\pm$ 37.6	19.1 $\pm$ 7.6	14.3 $\pm$ 6.4
	60	38.1 $\pm$ 6.6 ^C	2.8 $\pm$ 1.8	326.4 $\pm$ 95.3 ^C	16.1 $\pm$ 9.1	11.4 $\pm$ 5.3
	120	65.7 $\pm$ 14.0 ^C	2.6 $\pm$ 1.3	622.2 $\pm$ 175.5 ^C	26.7 $\pm$ 27.1	18.4 $\pm$ 15.3

Примечания: данные представлены в формате $M \pm SEM$ – среднее значение и стандартная ошибка среднего; $C_{\max}$ – максимальная концентрация; AUC – площадь под кривой «концентрация–время» в интервале дозирования 0–24 ч; MRT – среднее время удерживания; $T_{1/2}$ – период полувыведения. ^A – дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора «группа» («доза») после первого и после последнего введения на значения параметров $C_{\max}$ и AUC_{0-24} ($p < 0,05$, примечание ^C). При сравнении критерием Стьюдента данных после первого и последнего введения для каждой дозы отличий не выявлено; ^B – влияние фактора «группа» на исследуемые показатели не выявлено (критерий Краскела-Уоллиса, $p > 0,05$); Критерий Манна-Уитни не показал отличий между первым и последним введением для каждой дозы; ^C – статистически значимые отличия от минимальной дозы в соответствующей день введения (критерий Тьюки, $p < 0,05$).

Note: data are presented as $M \pm SEM$ (mean and standard error of the mean). $C_{\max}$, maximum concentration; AUC , area under the curve; MRT , mean retention time; $T_{1/2}$, half-life time. ^A – analysis of variance (ANOVA) revealed the effect of the "group" ("dose") factor after the first and last administration on the $C_{\max}$ and AUC_{0-24} parameters ($p < 0.05$, note ^C). When comparing the Student's criteria, there were no differences for each dose after the first and last administration; ^B – the influence of the "group" factor on the studied parameters was not detected (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$); Mann-Whitney test showed no difference between first and last dosing for each dose; ^C – statistically significant differences from the minimum dose on the corresponding day of administration (Tukey test, $p < 0.05$).

накопление и систематизация информации о его дальнейшем клиническом применении.

В ходе проведенного исследования кроме сравнительной оценки общетоксических свойств и местнораздражающего действия было изучено влияние препарата фенозановой кислоты на иммунокомпетентные органы с целью выявления возможного иммунотоксического действия¹⁵. Полученные результаты позволили заключить, что при введении в дозах, соответствующих 1, 2,5 и 5 ВТД, в течение 270-х сут препарат не оказал иммунотоксического действия. Не выявлено также канцерогенных свойств препарата фенозановой кислоты.

Продолжительный прием лекарственных средств центрального действия может вызвать развитие лекарственной зависимости в течение нескольких дней после отмены приема, на что могут указывать изменения температуры тела, массы тела, появление признаков тревожного поведения, судорожной активности. Такие симптомы, в частности, были описаны после

длительного введения собакам противосудорожных препаратов [15]. Отсутствие каких-либо поведенческих изменений, клинически значимых изменений температуры тела, АД и потребления корма и воды после прекращения введения тестируемого препарата в исследованном диапазоне доз свидетельствовало о том, что препарат фенозановой кислоты не вызывал развития синдрома отмены.

Были выявлены признаки интоксикации, которые увеличивались с увеличением дозы препарата, достигая наибольшей выраженности в группе максимальной дозы.

При анализе основных токсикокинетических данных фенозановой кислоты у собак после однократного введения препарата в трех дозах выявлено, что параметры, характеризующие степень биологической доступности препарата, $C_{\max}$ и AUC_{0-24} , имели статистически значимые различия (критерий Тьюки, таблица 4, $p < 0,05$) в зависимости от введенной дозы препарата. С увеличением дозы наблюдали увеличение значений параметров $C_{\max}$ и AUC_{0-24} , что позволило установить линейность фармакокинетики в исследованном диапазоне доз. Пара-

¹⁵ ICH S8 Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. CHMP/167235/2004. EMA; 2006.

метры T_{max} , MRT и $T_{1/2}$ не имели статистически значимых отличий (критерий Краскела-Уоллеса, таблица 4, $p > 0,05$).

При сопоставлении фармакокинетических данных, полученных после однократного и многократного введения тестируемого препарата во всех исследуемых дозах, не выявлено статистически значимых отличий ни для одного из оцениваемых параметров (C_{max} , AUC_{0-24} - критерий Стьюдента, T_{max} , MRT и $T_{1/2}$ - критерий Манна-Уитни, $p > 0,05$).

После перорального введения тестируемого препарата собакам фенозановая кислота достаточно быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта и определяется в плазме крови на протяжении 24 ч. Средние значения периода полувыведения составили более 11 часов, средние значения MRT – более 16 часов, что указывало на длительное нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Средние значения C_{max} в плазме крови составили более 17 мкг/мл, средние значения T_{max} – около 2–3 ч. Длительное нахождение неизменного действующего вещества в системном кровотоке может быть связано с особенностями его связывания с белками плазмы крови и сравнительно высокой микросомальной стабильностью, выявленными при проведении соответствующих тестов *in vitro* [16]. Схожие особенности были выявлены при исследовании фармакокинетики препарата фенозановой кислоты на крысах [16], на собаках [11] и ранее на кроликах [17].

Необходимо подчеркнуть, что результаты оценки основных фармакокинетических параметров на собаках в данном исследовании близки к полученным нами ранее [16] и сопоставимы с данными для других видов лабораторных животных (крысы, кролики) [16, 17], но кардинально отличались по уровням C_{max} и AUC_{0-24} от результатов, полученных у человека (при сопоставимых значениях параметров T_{max} , MRT и $T_{1/2}$) [18]. Этот факт, подтверждаемый независимыми исследованиями на разных биологических видах, может быть связан с различием метаболизма у человека и животных, и с нашей точки зрения обуславливает необходимость более углубленного изучения фармакокинетики фенозановой кислоты у человека.

В целом, при многократном введении исследованного препарата в дозах 24, 60 и 120 мг/кг средние максимальные концентрации фенозановой кислоты в плазме крови собак составили около 17–78 мкг/мл. Приведенные уровни концентраций могут быть отнесены к токсичным, поскольку при введении изученных доз тестируемого препарата выявлены токсические эффекты препарата.

Соотнесение выявленных уровней плазменных концентраций и фармакокинетических кривых с моментом появления, нарастания и длительностью или выраженностью наблюдаемых токсических проявлений затруднительно, поскольку параметры фармакокинетики оценивали только в первый и последний дни введения, в то время, как нежелательные явления наблюдали и регистрировали в течение всего периода введения исследуемого препарата.

Таким образом, проведенное исследование токсических свойств, иммунотоксичности, токсикокинетики и элементов развития лекарственной зависимости, оценка возможных канцерогенных свойств препарата фенозановой кислоты на половозрелых собаках при многократном пероральном введении с периодом отсроченного наблюдения позволило сделать следующие выводы:

- Основными клиническими проявлениями токсических эффектов, зарегистрированными при введении преимущественно средней 60 мг/кг и максимальной дозы 120 мг/кг тестируемого препарата, были: тремор в покое, единичные случаи незначительного угнетения поведения и отказ от корма, которые постепенно разрешались в течение 4–5 дней после окончания введения.

- Тестируемый препарат не оказал влияния на массу тела животных, на потребление корма и воды, на показатели системы гемостаза, общего анализа мочи, ЭКГ и АД. Не выявлено клинически значимых изменений по результатам патоморфологического исследования; установлено, что тестируемый препарат не обладал местно-раздражающим и иммунотоксическим действием, канцерогенными свойствами; не вызывал синдром отмены. Отмечено влияние на ряд показателей клинического анализа крови (снижение гематокрита, уровня эритроцитов и гемоглобина, среднего содержания гемоглобина в эритроцитах, снижение ширины распределения эритроцитов по объему), биохимического анализа крови (снижение содержания альбуминов, общего белка, холестерина, отношения А/Г, что свидетельствовало о снижении синтетической функции печени), отмечено повышение массовых коэффициентов печени (в средней дозе на 20%, в максимальной дозе на 37%) без статистической значимости.

- Основные фармако- и токсикокинетические параметры фенозановой кислоты после однократного и многократного введения тестируемого препарата в дозах 24, 60 и 120 мг/кг не имели статистически значимых различий, что свидетельствовало об отсутствии кумуляции действующего вещества в организме при мно-

гократном применении. Обнаруженные средние и максимальные концентрации фенозановой кислоты (17-78 мкг/мл) отнесены к токсическим, поскольку у животных в ходе эксперимента наблюдали токсические проявления.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при применении препарата фенозановой кислоты в клинической практике необходимо учитывать возможные побочные эффекты (неврологического и поведенческого характера), которые связаны с непосредственным фармакологическим профилем препарата.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все исследования были выполнены в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследования было одобрено на заседании биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», протокол заседания БЭК от 13.08.2021 № 1.41/21.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Существует потенциальный конфликт интересов в силу финансирования данной научной работы компанией ООО «ПИК-ФАРМА». Однако при написании статьи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена без государственного бюджетного финансирования при финансовой поддержке ООО «ПИК-ФАРМА», Россия.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Косман В.М. – анализ методом ВЭЖХ-УФ, расчет и анализ фармакокинетических параметров, написание текста рукописи; Карлина М.В. – обсуждение результатов оценки фармако- и токсикокинетики; Мазукина Е.В. – координация планирования и выполнения исследовательской работы, сбор, анализ и интерпретация данных, обсуждение результатов оценки токсических свойств; Морозов С.В. – критический анализ дизайна исследования и рукописи; Гущина Е.Е. – согласование итоговой версии рукописи, для публикации; Макарова М.Н. – критический пересмотр содержания рукописи, Журавская Н.В. – анализ данных литературы и нормативных документов; Макаров В.Г. – критический пересмотр содержания и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бурд С.Г., Лебедева А.В., Пантина Н.В., Рублева Ю.В., Пизова Н.В., Васильев С.В., Белова А.Н., Воробьева О.В. и др. Клинические результаты и перспективы применения фенозановой кислоты у взрослых пациентов с фокальной эпилепсией. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021;121(10):52-59 [Burd S.G., Lebedeva A.V., Pantina N.V., Rubleva Yu.V., Pizova N.V., Vasil'ev S.V., Belova A.N., Vorobeva O.V., et al. Clinical results and prospects for the use of phenosan acid in patients with focal epilepsy. *S.S. Korsakov Journal of neurology and psychiatry*. 2021;121(10):52-59 (in Russ.)]. DOI: 10.17116/jnevro202112110152. EDN: TKWELY.
2. Воронкова К.В., Алиева А.М., Никитин И.Г., Мусина Г.М., Сурская Е.В., Зайцева О.С., Машкевич Н.Г., Гомонова Л.В. и др. Роль фенозановой кислоты в лечении пациентов с эпилепсией. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2023;123(2):151-157 [Voronkova K.V., Alieva A.M., Nikitin I.G., Musina G.M., Surskaya E.V., Zaitseva O.S., Mashkevich N.G., Gomonova L.V., et al. The role of the phenosan acid in the combined treatment of patients with epilepsy. *S.S. Korsakov Journal of neurology and psychiatry*. 2023;123(2):151-157 (in Russ.)]. DOI: 10.17116/jnevro2023123021151. EDN: SSDKMR.
3. Беспалов В.Г., Александров В.А., Корман Д.Б. Антисканцерогенный эффект фенольного антиоксиданта фенозана (4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенилпропионовой кислоты) на спонтанный канцерогенез у крыс и мышей. *Сибирский онкологический журнал*. 2012;2(50):52-56 [Bespalov V.G., Alexandrov V.A., Korman D.B. Anticarcinogenic effect of antioxidant phenozan (4-oxy-3,5 di-tert-butylphenylpropionic acid) on spontaneous carcinogenesis in rats and mice. *Siberian journal of oncology*. 2012; 2(50):52-56 (in Russ.)]. EDN: PBMFBZ.
4. Chasovskaya T.E., Plashchina I.G., Pal'mina N.P. Physicochemical alterations in liposomes induced by low concentrations of synthetic antioxidant potassium phenosan. *Dokl Phys Chem*. 2013;449:94-97. DOI: 10.1134/S0012501613040106. EDN: RFJVTD.
5. Яковлева А.А., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Ивашова Д.М., Касабов К.А., Гущина Е.Е., Морозов С.В., Кудрин В.С. Изучение потенцирования эффектов вальпроевой кислоты и карбамазепина фенозановой кислотой с анализом нейрохимических показателей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(12):31-37 [Yakovleva A.A., Litvinova S.A., Voronina T.A., Ivashova D.M., Kasabov D.M., Gushchina E.E., Morosov S.V., Kudrin V.S. Study of potentiation of valproic acid and carbamazepine by phenosan acid and analysis of neurochemical parameters. *Experimental and clinical pharmacology*. 2022;85(12):31-37 (in Russ.)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-12-31-37. EDN: UAYIVL.
6. Мычко Е.Н. *Поведение собаки. Пособие для собаководов*. Москва: ООО «АКВАРИУМ ПРИНТ», 2004. 160 с. [Mychko E.N. *Dog behavior. A manual for dog breeders*. Moscow: ООО «AKVARIUM PRINT», 2004. 160 p.(in Russ.)]
7. Russell W.M.S, Burch R.L. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen and Co; 1959. 238 p.
8. Мазукина Е.В., Шекунова Е.В., Косман В.М., Уракова И.Н., Котельникова И.Г., Фонарев М.Ю., Ежова Е.А., Закалюкина Е.В., и др. Изучение эффективности и безопасности препарата Хондроитин сульфат в доклинических исследованиях. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2021;9(1):43-57

- [Mazukina E.V., Shekunova E.V., Kosman V.M., Ura-kova I.N., Kotelnikova I.G., Fonarev M.Yu., Ezhova E.A., Zakalyukina E.V., et al. Preclinical Study of the Efficacy and Safety of Chondroitin Sulfate. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2021;9(1):43–57 (in Russ.)]. DOI: 10.30895/2312-7821-2021-9-1-43-57. EDN: JZGHVP.
9. Вавилова В.А., Шекунова Е.В., Джайн Е.А., Балаба-нмян В.Ю., Озеров А.А., Макарова М.Н., Мака-ров В.Г. Экспериментальное изучение токсиче-ских свойств препарата VMU-2012-05 – ориги-нального ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):205–221 [Vavilova V.A., Shekunova E.V., Jain E.A., Balabanyan V.Yu., Ozerov A.A., Ma-ka-rova M.N., Makarov V.G. Experimental study of toxic properties of VMU-2012-05 drug – original non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *Pharmacy and Pharmacology*. 2021;9(3):205–221 (in Russ.)]. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-205-221. EDN: ZLXLH.
10. Косман В.М., Карлина М.В., Мазукина Е.В., Гло-бенко А.А., Джайн Е.А., Макарова М.Н., Мака-ров В.Г. Изучение безопасности и токсикокине-тики препарата эзомепразол в доклинических исследованиях. *Безопасность и риск фармакотера-пии*. 2023;11(2):176–190 [Kosman V.M., Karlina M.V., Mazukina E.V., Globenko A.A., Jain E.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Preclinical Evaluation of Esomeprazole Safety and Toxicokinet-ics. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):176–190 (in Russ.)]. DOI:10.30895/2312-7821-2023-11-2-342. EDN: ZLXLH.
11. Карлина М.В., Косман В.М., Макаров В.Г., Макаро-ва М.Н., Морозов С.В., Гущина Е.Е., Журав-ская Н.В. Оценка фармакокинетического взаимо-действия препарата фенозановой кислоты с пре-паратами вальпроевой кислоты и карбамазепина на собаках. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2022;10(4):420–433 [Karlina M.V., Kosman V.M., Makarov V.G., Makarova M.N., Morozov S.V., Gush-china E.E., Zhuravskaya N.V. Pharmacokinetic Inter-actions of Phenosanic Acid with Valproic Acid and Carbamazepine in Dogs. *Safety and Risk of Pharma-cotherapy*. 2022;10(4):420–433 (in Russ.)]. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-4-420-433. EDN: WVBMMZ.
12. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
13. Луговик И.А., Шекунова Е.В. Оценка использования различных формул коррекции интервала QT (QTc) и референтные интервалы ЭКГ у наркотизированных собак породы бигль. Лабораторные животные для научных исследований. 2022;(2):32–43 [Lugovik I.A., Shekunova E.V. Evaluation of the use of various formula for correction of the QT interval (QTc) and ECG reference intervals in anesthetized beagle dogs. *Laboratory Animals for Science*. 2022;(2):32–43 (in Russ.)]. DOI: 10.29296/2618723X-2022-02-04. EDN: IFUVQE.
14. Косман В.М., Карлина М.В., Петрова Е.М., Макаро-ва М.Н., Макаров В.Г. Об оценке контаминации и анализе контрольных проб в исследованиях токсикокинетики. *Трансляционная медицина*. 2024;11(4):351–363 [Kosman V.M., Karlina M.V., Pe-trova E.M., Makarova M.N., Makarov V.G. On the as-sessment of contamination and analysis of control samples in toxicokinetics studies. *Translational Medi-cine*. 2024;11(4):351–363 (in Russ.)]. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-351-363. EDN: FWCXVC.
15. Löscher W., Potschka H., Rieck S., Tipold A., Rund-feldt C. Anticonvulsant efficacy of the low-affinity partial benzodiazepine receptor agonist ELB 138 in a dog seizure model and in epileptic dogs with sponta-neously recurrent seizures. *Epilepsia*. 2004;45(10):1228–1239. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2004.21204.x.
16. Косман В.М., Карлина М.В., Тютин К.В., Мака-ров В.Г., Макарова М.Н., Морозов С.В., Гущина Е.Е., Журавская Н.В. Доклиническое изу-чение фармакокинетических процессов ADME фенозановой кислоты в системах in vitro и in vi-vo. *Обзоры по клинической фармакологии и лекар-ственной терапии*. 2022;20(3):297–308 [Kosman V.M., Karlina M.V., Tyutina K.V., Makarov V.G., Makarova M.N., Morozov S.V., Gush-china E.E., Zhuravskaya N.V. Preclinical study of pharmacokinetic ADME processes of phenosanic acid in vitro and in vivo. *Reviews on Clinical Pharma-cology and Drug Therapy*. 2022;20(3):297–308 (in Russ.)]. DOI: 10.17816/RCF203297-308. EDN: MJQPAM.
17. Prokopov A.A., Shukil' L.V., Berlyand A.S. Studying the bioavailability of fenozan acid in various medi-cinal forms. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2006;40(1):1–4. DOI: 10.1007/s11094-006-0046-2. EDN: LJUTH.
18. Kondratenko S.N., Starodubtsev A.K., Belyakova G.A. HPLC determination and pharmacokinetics of the new original domestic drug Dibufelon®. *Pharmaceuti-cal chemistry journal*. 2009;43(11):641–643. DOI: 10.1007/s11094-010-0370-4. EDN: LPOAXF.

Поступила в редакцию 18.12.2023
Подписана в печать 25.12.2024

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В., Мазукина Е.В., Морозов С.В., Гущина Е.Е., Журавская Н.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Доклиническое изучение безопасности и токсикокинетики препарата фенозановой кислоты. *Человек и его здоровье*. 2024;27(4):4–21. DOI: 10.21626/vestnik/2024-4/01. EDN: CXVVIN.

PRECLINICAL EVALUATION OF PHENOSANIC ACID SAFETY AND TOXICOKINETICS

© Kosman V.M.¹, Karlina M.V.¹, Mazukina E.V.¹, Morozov S.V.², Gushchina E.E.², Zhuravskaya N.V.²,
Makarova M.N.¹, Makarov V.G.¹

¹Research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" (RMC "HOME OF PHARMACY")

3/245, Zavodskaya Str., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region, 188663, Russian Federation

²LLC "PIQ-PHARMA"

25, bld.1, room I, fl. 1, Oruzheyniy line, Moscow, 125047, Russian Federation

Detailed post-marketing studies of phenosanoic acid, the active ingredient of the original domestic medicinal product Dibufelon®, approved for human medical use as an antiepileptic agent, are aimed at improving its clinical use.

Objective – analysis of toxic properties, immunotoxicity, toxicokinetics and elements of drug dependence development, assessment of possible carcinogenic properties of phenosanoic acid in sexually mature beagle dogs with repeated oral administration with a period of delayed observation.

Materials and methods. Phenosanoic acid was administered orally to dogs (control group of animals, 2 males and 2 females and 3 experimental groups of animals of 5 males and 5 females) for 270 days at doses of 24, 60 and 120 mg/kg (1; 2.5 and 5 higher therapeutic doses (VTD), respectively).

The general toxic properties, local irritating effect, effect on immunocompetent organs, elements of drug dependence development, possible carcinogenic properties, as well as basic pharmacococccinetic parameters (Cmax, Tmax, AUC0-24, MRT, T1/2) were evaluated.

Results. The drug phenosanoic acid did not have a locally irritating, immunotoxic and carcinogenic effect, did not cause withdrawal syndrome. Neurological and behavioral abnormalities (tremors, isolated cases of slight depression of behavior and refusal of feed) were detected when the drug was administered mainly at medium and maximum doses. No dose of no apparent adverse effect (NOAEL) was established (less than 24 mg/kg). Toxicokinetic analysis showed no cumulation of the active ingredient after repeated oral administration.

Conclusion. the use of phenosanoic acid should take into account possible side effects (neurological and behavioral) that are associated with the direct pharmacological profile of the drug.

Keywords: phenosanic acid; safety; toxicokinetics; preclinical studies.

Kosman Vera M. – Cand. Sci. (Pharm.), Head of analytical laboratory, RMC "HOME OF PHARMACY", Kuzmolovsky urban-type settlement, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9690-1935 E-mail: kosman.vm@doclinika.ru (corresponding author).

Karlina Marina V. – Cand. Sci. (Biol.), Head of department of technology, kinetics and analysis of drugs, «RMC «HOME OF PHARMACY», Kuzmolovsky urban-type settlement, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-6292-8934. E-mail: karlina.mv@doclinika.ru

Mazukina Elizaveta V. – Head deputy of Department of Experimental pharmacology and toxicology, RMC «HOME OF PHARMA-CY», Kuzmolovsky urban-type settlement, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-1448-921X. E-mail: mazukina.ev@doclinika.ru

Morozov Sergei V. – Cand. Sci. (Med), development director, LLC "PIQ-PHARMA", Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-8514-792X. E-mail: morozov_s@pikfarma.ru

Gushchina Eugenia E. – medical information specialist, LLC "PIQ-PHARMA", Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-5138-5519. E-mail: gushchina_e@pikfarma.ru

Zhuravskaya Natalia V. – Head of medical department, LLC "PIQ-PHARMA", Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9586-4298. E-mail: zhuravskaya@pikfarma.ru

Makarova Marina N. – Dr. Sci. (Med.), Director, «RMC «HOME OF PHARMACY», Kuzmolovsky urban-type settlement, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-3176-6386. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Makarov Valery G. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Scientific supervisor, «RMC «HOME OF PHARMACY», Kuzmolovsky urban-type settlement, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-2447-7888. E-mail: makarov.vg@doclinika.ru

COMPLIANCE WITH PRICIPLES OF ETHICS

All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The study was approved by the Bioethics Committee of the research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" (Approval No. 1.41/21 of 13.08.2021).

CONFLICT OF INTEREST

There is a potential conflict of interest due to the financial support of this study by LLC "PIQ-PHARMA", Russia. However, when writing the article, the authors were guided by considerations of the scientific value of the material obtained; the authors declare their impartiality in its assessment.

SOURCE OF FINANCING

The study received no government budget funding; the work was supported by LLC "PIQ-PHARMA", Russia.

AUTHORS CONTRIBUTION

Kosman V.M. – HPLC-UV analysis, calculation and compression of pharmacokinetic parameters, drafted the manuscript. Karlina M.V. – discussed the results of the pharmaco- and toxicokinetic study. Mazukina E.V. – coordinated research planning and activities; collected, analysed, and interpreted the data; discussed the results of toxicity tests. Morozov S.V. – critically analyzed the study design and manuscript text. Gushchina EE. – approved the final version of the manuscript for publication. Zhuravskaya NV. – literature data and regulation documents analysis. Makarova Marina N. critically revised the manuscript. Makarov V.G. – critically revised the manuscript and approved the final version for publication.

Received 18.12.2023

Accepted 25.12.2024

For citation: Kosman V.M., Karlina M.V., Mazukina E.V., Morozov S.V., Gushchina E.E., Zhuravskaya N.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Preclinical evaluation of phenosanic acid safety and toxicokinetics. *Humans and their health*. 2024;27(4):4–21. DOI: 10.21626/vestnik/2024-4/01. EDN: CXVVIN.