

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРОТИВОПАЗИТАРНОГО ПРЕПАРАТА «ПЕНТАВЕТ»

Н. Ю. ЩЕМЕЛЕВА, М. П. КУЧИНСКИЙ, Е. А. СТЕПАНОВА, А. С. ЯСТРЕБОВ

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220003, e-mail: Natashaschurova@mail.ru

(Поступила в редакцию 21.01.2022)

В статье представлены материалы по доклиническим исследованиям нового ветеринарного противопаразитарного препарата. Данные исследования являются основополагающим этапом в разработке и внедрении нового лекарства в ветеринарную практику, позволяющие своевременно изучить безопасность и особенности влияния на макроорганизм фармакологического средства.

Проведена токсикологическая оценка нового комплексного противопаразитарного препарата «Пентавет» в опытах на лабораторных животных в доклинических испытаниях.

При изучении общетоксического влияния противопаразитарного препарата «Пентавет» установлено, что испытуемый образец препарата не обладает токсичностью и согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу опасности (вещества малоопасные). В результате изучения специфической токсичности, были получены данные, которые свидетельствуют о том, что препарат не обладает раздражающим, сенсибилизирующим действием на макроорганизм. Пентавет не вызывает аллергических реакций и патологических изменений внутренних органов у лабораторных животных в течение доклинических опытов.

Ключевые слова: *противопаразитарный препарат, доклинические исследования, острая токсичность, хроническая токсичность, специфическая токсичность.*

The article presents materials on preclinical studies of a new veterinary antiparasitic drug. These studies are a fundamental step in the development and implementation of a new drug in veterinary practice, allowing timely study of the safety and characteristics of the effect on the macroorganism of a pharmacological agent.

A toxicological evaluation of the new complex antiparasitic drug «Pentavet» was carried out in experiments on laboratory animals in preclinical trials.

When studying the general toxic effect of the antiparasitic drug «Pentavet», it was found that the test sample of the drug does not have toxicity and, according to GOST 12.1.007-76, belongs to hazard class IV (substances of low hazard). As a result of the study of specific toxicity, data were obtained that indicate that the drug does not have an irritating, sensitizing effect on the macroorganism. Pentavet does not cause allergic reactions and pathological changes in internal organs in laboratory animals during preclinical experiments.

Key words: *antiparasitic drug, preclinical studies, acute toxicity, chronic toxicity, specific toxicity.*

Введение

Создание нового синтетического лекарственного препарата – процесс сложный и трудоемкий. Комплекс необходимых для решения этой задачи исследований, начиная с разработки формулы и конструировании лабораторных и экспериментальных образцов, выявления лечебной активности, оценки безопасности на лабораторных животных, включает множество этапов, прежде чем потенциальный лекарственный препарат будет применяться на практике для лечения животных [2, 5, 6]. В этой связи роль доклинических исследований трудно переоценить. Они направлены, прежде всего, на обеспечение безопасности дальнейшего применения новых лекарственных средств в широкой ветеринарной практике. Практическое приложение доклинических фармако-токсикологических исследований весьма многосторонне. Изучение свойств препаратов и их влияния на организм позволяет уже на доклиническом уровне определить оптимальные пути их введения, что, в дальнейшем, способствует подбору рациональной дозировки для использования в клинических опытах и в лечебной практике. Сведения о фармако-токсикологических свойствах лекарственных средств позволяют уточнить показания и противопоказания к их применению. Так, вещества, хорошо проникающие через гематоплацентарный барьер, следует с осторожностью применять стельным животным, животным-продуцентам (донорам яйцеклеток и т.д.). Препараты, активно экскретирующиеся или накапливающиеся в печени, не пригодны для лечения продуктивных животных (лактующие коровы, куры-несушки и др.). Данные по особенностям влияния препарата во многом способствуют лучшему пониманию механизма действия лекарственных препаратов, создает основу для рационального поиска новых лекарственных средств с желаемыми закономерностями распределения в организме, а в некоторых случаях и с более высокой активностью или более широким спектром действия, например при выявлении метаболитов, обладающих преимуществами перед исходным веществом по специфической активности или безопасности [3, 4, 8].

Доклинические исследования проводятся в соответствии с едиными ветеринарно-санитарными требованиями Республики Беларусь, международно-правовыми актами, составляющими право

Евразийского экономического союза, в области ветеринарии и требованиями ведущих ветеринарных центров, утвержденных методических указаний и протоколов исследований [1, 2, 5, 7].

Так как требования к качеству животноводческой продукции с каждым годом ужесточаются, то и требования к разрабатываемым препаратам также повышаются, одним из главных требований на сегодняшний момент является низкая токсичность и безвредность лекарственных ветеринарных препаратов. Доклинические исследования это, как основополагающий этап разработки и внедрения лекарственного препарата в ветеринарную практику, позволяющий своевременно изучить безопасность и особенности влияния на макроорганизм фармакологического средства. Они же составляют значительную часть регистрационного досье, формируемого с целью государственной регистрации нового препарата [2].

Доклинические исследования безопасности нового лекарственного средства направлены на выявление его возможного повреждающего действия. Такие исследования условно делятся на два крупных блока:

1. Исследование *общей токсичности*, куда входит оценка острой, подострой и хронической токсичности. На данном этапе происходит выявление токсических доз и биологические особенности влияния лекарственного средства на основные органы и системы организма, подверженные повреждающему действию фармакологического средства.

2. Исследование *специфической токсичности* направлено на выявление репродуктивной токсичности (эмбриотоксичности, тератогенности, влияния на генеративную функцию), аллергенности и раздражающих свойств фармакологического средства.

Возможность проведения клинического исследования должна основываться на результатах доклинического исследования.

Таким образом, **целью данной работы** является токсикологическая оценка нового комплексного противопаразитарного препарата «Пентавет» в доклинических исследованиях.

Основная часть

Изучение токсикологических свойств лабораторного образца комплексного препарата «Пентавет» проводили, согласно методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии [6, 7].

Опыты проводили в соответствии с требованиями к биологическому эксперименту по подбору аналогов, постановке контроля, соблюдению одинаковых условий кормления и содержания лабораторных животных [5].

Для изучения *острой токсичности* провели 2 серии опытов. В опытах использовали 60 клинически здоровых белых мышей обоего пола, массой 18–20 г. Животные содержались на стандартном рационе со свободным доступом к корму и воде.

Препарат задавали на 0,3%-ном крахмальном клейстере в 50%-ной концентрации внутрижелудочно натощак при помощи шприца с зондом однократно. Поение и кормление проводили через 2,5–3 часа после введения препарата. За животными вели постоянное клиническое наблюдение в течение 14 дней, при этом учитывали поведенческие реакции (возбуждение или угнетение), поедаемость корма, степень проявления реакции на внешние раздражители, клинический статус, время возникновения и характер проявления интоксикации, сроки наступления гибели животных. Павших животных подвергали патологоанатомическим исследованиям.

В *первой серии опыта* для проведения предварительных испытаний сформировали три опытных группы белых мышей и одну контрольную группу (по 5 голов в каждой). Первой группе животных препарат применили в дозе 4000,0 мг/кг, животным второй группы в дозе 5000,0 мг/кг, животным третьей группы – 8000,0 мг/кг, мышам четвертой – контрольной группы ввели 0,3%-ный крахмаль- ный клейстер по объему соответствующей вводимой суспензии.

Для определения среднесмертельной дозы провели *вторую серию опыта*, для чего было сформировано семь опытных и одна контрольная группа по 6 белых мышей в каждой. Мышам 1 группы ввели препарат в дозе 6000,0 мг/кг, 2 группы – 7000,0 мг/кг, 3 группе – 8000,0 мг/кг, 4 группе – 9000,0 мг/кг, 5 группы – 10000,0 мг/кг, 6 группы – 11000,0 мг/кг, 7 группы – 12000,0 мг/кг, мышам контрольной группы вводили 0,3%-ный крахмаль- ный клейстер по объему соответствующей вводи- мой суспензии.

Для определения *хронической токсичности* экспериментального образца противопаразитарного препарата было сформировано 4 группы белых мышей по 6 животных в каждой. Животным 1 группы внутрижелудочно ввели препарат- 1/10 дозы LD₅₀ (1050,0 мг/кг), 2 группы – 1/20 дозы LD₅₀ (525,0 мг/кг), 3 группы – 1/50 дозы LD₅₀ (210,0 мг/кг), мыши 4 группы служили контролем.

Препарат животным вводили в виде суспензии на 0,3%-ном крахмальном клейстере внутрижелудочно в течение 3 дней один раз в сутки натошак, контрольной группе мышей вводили 0,3%- крахмальный клейстер. Животных опытных и контрольных групп содержали в одинаковых условиях, кормление и поение осуществляли спустя 3 часа после введения. Клинические наблюдения за животными вели в течение 14 дней, учитывали общее состояние, активность, состояние шерстного покрова, наличие или отсутствие аппетита, жажды.

В опыте по определению *местного раздражающего действия* препарата на кожные покровы были использованы 3 кролика массой 2,0–2,5 кг. Препарат наносили на выстриженные 1,5x2,0 см боковые поверхности кожи (правая сторона) в разведениях 1:10, 1:50 и 1:100 на этаноле. Контролем служила противоположная сторона (левая) тела, куда наносили в этой же дозе этанол. Экспозиция составила 4 часа, после чего остатки вещества аккуратно смыли. Наблюдение вели первые 8 часов ежедневно, а затем через 16 часов после экспозиции.

При определении раздражающего действия препарата на слизистые оболочки использовали метод конъюнктивальной пробы на 3 кроликах массой 2,0–2,5 кг путем внесения тонко измельченного препарата в дозе 50 мг однократно в конъюнктивальный мешок глаза кроликов.

Изучение *аллергических реакций на препарат и сенсibiliзирующей способности* проводили методом накожных аппликаций на 6 морских свинок массой 320–350 г. Для этого препарат наносили путём многократных аппликаций на участок кожи подопытных свинок ежедневно в течение 15 дней в разведении 1:50 и 1:100 на этаноле. Контрольным животным наносили дистиллированную воду по аналогичной методике. Затем после 14 дневного перерыва на свежеевыстриженные участки кожи с противоположной стороны наносили, аналогично разрешающую дозу испытуемого препарата. Реакцию учитывали в течение 72 часов.

В первой серии опыта при проведении общетоксических испытаний мыши 1-й, 2-й опытных групп оставались активными, хорошо поедали корм, шерсть сохраняла гладкий и блестящий вид. Падежа животных отмечено не было. У животных 3-й и 4-й опытных групп, получавших препарат в дозе 8000,0 мг/кг и более в течение первых двух часов наблюдалось угнетение, в дальнейшем их состояние стабилизировалось, явления интоксикации и угнетения отсутствовали, животные были активными, хорошо поедали корм, шерсть сохраняла гладкий и блестящий вид, падежа животных отмечено не было.

В процессе проведения второй серии опытов по определению среднесмертельной дозы установлены следующие результаты, которые представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты определения острой токсичности препарата на белых мышах

№ группы	Доза препарата мг/кг	Количество животных в опыте	После применения препарата	
			пало	выжило
1	6000,0	6	0	
2	7000,0	6	0	6
3	8000,0	6	0	6
4	9000,0	6	1	5
5	10000,0	6	2	4
6	11000,0	6	3	3
7	12000,0	6	6	0
к	-	6	0	6

Выявлено, что у мышей 1–3 групп (доза 6000,0-8000,0 мг/кг) в течение всего срока наблюдения (14 дней) не было клинических признаков интоксикации. Клинико-функциональный статус у всех животных не имел отклонений от физиологического состояния, присущего мышам данной возрастной группы. В течение опытного периода гибели мышей в группах 1–3 не было. У животных 4 группы (доза 9000,0 мг/кг) была отмечена гибель 1 мыши на 4 сутки наблюдения. У животных 5 группы (доза 10000,0 мг/кг) в течение первых суток, а также на 3–4 сутки наблюдалось снижение двигательной активности и реакции на внешние раздражители, после чего произошла нормализация выявленных нарушений, а через 4 часа и на 5-е сутки была отмечена гибель по 1 мыши в указанные промежутки времени. У животных 6 группы (доза 11000,0 мг/кг) в течение первых 4 часов, наблюдалось снижение двигательной активности и реакции на внешние раздражители, после чего произошла нормализация выявленных нарушений, а через 12 часов, на 2 и на 3 сутки после введения препарата была отмечена гибель по 1 мыши в указанные промежутки времени. В 7 группе (доза 12000,0 мг/кг) в течение первых 24 часов наблюдалось снижение двигательной активности и реакции на внешние раздражители и в течение 24 часов после введения препарата была отмечена массовая гибель мышей.

Животные контрольной группы оставались клинически здоровы.

Павших животных групп исследования подвергали вскрытию, при этом установлено, что печень, почки, селезенка темно-вишневого цвета и кровенаполнены, катарально-геморрагические изменения в желудочно-кишечном тракте, содержимое в желудке и кишечнике отсутствовало. У выживших мышей при вскрытии патологоанатомических изменений внутренних органов отмечено не было.

При расчете параметров острой токсичности методом Г. Н. Першина установлено, что при пероральном введении *препарата мышам*, LD_{50} составила 10500,0 мг/кг массы тела. Таким образом, испытуемый образец препарата относится к *веществам малоопасным (IV класс)* с LD_{50} более 5000 мг/кг, согласно ГОСТ 12.1.007-76.

При определении *хронической токсичности* противопаразитарного препарата на белых мышах установлено, что в течение всего периода наблюдения (14 суток) гибель мышей в опытных и контрольных группах отсутствовала. Каких-либо заметно выраженных признаков интоксикации у лабораторных животных не регистрировали, животные опытных групп активно двигались, их поведенческие реакции, потребление корма, состояние шерстного покрова и слизистых оболочек, а также физиологические функции не отличались от таковых у животных контрольной группы.

По результатам исследования *специфической токсичности*, установлено что испытуемый противопаразитарный препарат не обладает сенсibiliзирующим, раздражающим действием, не вызывает аллергических реакций.

По истечении срока наблюдения животные контрольных и опытных групп выводились из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики в соответствии со стандартами GLP. При патологоанатомическом вскрытии животных опытных групп патологических изменений внутренних органов установлено не было. Внутренние органы были нормального размера, формы и топографического расположения, отека и кровоизлияний обнаружено не было.

Заключение

При изучении общетоксического влияния противопаразитарного препарата «Пентавет» установлено, что испытуемый образец препарата не обладает токсичностью и согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу опасности (вещества малоопасные). В результате изучения специфической токсичности были получены данные, которые свидетельствуют о том, что препарат не обладает раздражающим, сенсibiliзирующим действием на макроорганизм. Пентавет не вызывает аллергических реакций и патологических изменений внутренних органов у лабораторных животных в течение доклинических опытов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 3 т. / редкол.: А. Шерякова. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии им. В. Хоружей, 2012. – Т. 1. – 1220 с.
2. Инструкция о порядке регистрации ветеринарных препаратов в Республике Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://dvrn.gov.by/>. – Дата доступа: 22.06.2021.
3. Иммунобиохимические изменения при паразитарных болезнях телят и способы их коррекции современными препаратами / М. В. Якубовский, Н. Ю. Щемелева, И. И. Кузьминский // Сборник научных трудов «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы». Вып. 12. – Гродно: ГГАУ, 2013. – С. 270–276.
4. Комплексные препараты: терапевтический и экономический эффект применения при паразитозах животных / М. В. Якубовский, М. П. Кучинский, Н. Ю. Щемелева, В. П. Василькова // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария – 2015. – № 1 – С. 35 – 42.
5. Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств (доклинические исследования) от 3 ноября 2016 г. № 81; введ. РБ 06.03.2018. – Минск: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2018. – 23 с.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — 832 с.
7. Токсикологическая оценка химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии: метод. рекомендации / М. П. Кучинский [и др.]; РУП ИЭВ. – Минск, 2007. – 78 с.
8. Ястреб, В. Б. Побочные эффекты антгельминтиков / В. Б. Ястреб, Т. С. Новик // Восьмой Международный конгресс по проблемам ветеринарной медицины домашних животных, Москва, 6–8 апреля, 2000г. / Рос. с-х. акад. – Москва, 2000. – С. 172–175.