

УДК: 616-009.7: 616.857: 616-092.9

Аспекты, описывающие доклинические исследования ацеклофенака, как инструмент регистрации воспроизведенного препарата

©2020. Н.А. Анисимова¹, Н.О. Селизарова¹, Г.А. Плиско¹, Е.Д. Семивеличенко¹, С.М. Напалкова^{1*}¹ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: svetlana.napalkova@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 19.11.2020 г.

После доработки 08.12.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

В данном обзоре рассмотрены аспекты токсичности, специфической активности, фармакокинетики и фармакодинамики ацеклофенака, приведенные в различных источниках, описывающих его доклинические исследования.

Поиск источников информации для обзора осуществлялся по отечественным и международным базам eLibrary и PubMed с использованием контекстных запросов, включающих международные непатентованные названия, термины доклинических исследований фармакокинетики, фармакодинамики и используемые виды животных.

Ацеклофенак – один из самых назначаемых препаратов при острых и хронических болях. Относится к нестероидным противовоспалительным препаратам, которые рассматриваются в качестве лекарственных средств первого выбора в терапии воспаления и боли.

На фармацевтическом рынке Российской Федерации ацеклофенак представлен в виде таблеток, порошка для приготовления суспензии, крема для наружного применения, что позволяет назначать его при различных заболеваниях. Особенно эффективно он показал себя при симптоматическом лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, для купирования острой и хронической боли.

Обзор материалов доклинических исследований, приведенных в различных литературных источниках и включающих в себя аспекты изучения токсичности, специфической активности, фармакокинетики и фармакодинамики препарата ацеклофенак, по нашему мнению, позволит использовать полученные в ходе нашего исследования данные как один из инструментов для дальнейшей регистрации дженериков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ацеклофенак; фармакокинетика; фармакодинамика; доклинические исследования; дженерики; общая токсичность; местнораздражающее действие; специфическая токсичность

10.17816/phf50498/2713-153X-2020-4-2-90-97

СОКРАЩЕНИЯ:

AUC – площадь под фармакокинетической кривой;

 C_{\max} – максимум или пик концентрации лекарственного вещества в крови; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования; K_e – константа скорости элиминации; $T_{1/2}$ – период полувыведения; T_{\max} – время достижения максимальной концентрации вещества в плазме крови;

АЛТ – аланинаминотрансфераза;

АСТ – аспартатаминотрансфераза;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГРЛС – Государственный реестр лекарственных средств;

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза;

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты;

ПГ – простагландины;

ЦОГ – циклооксигеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные препараты рассматриваются в качестве лекарственных средств первого выбора в терапии воспаления и болевого синдрома (например, ревматоидный артрит, остеоартрит) [1–4]. Эффект НПВП опосредуется ингибированием циклооксигеназы, которая играет ключевую роль в контроле воспаления, нарушая синтез простагландинов. ПГ представляют собой семейство химических веществ, которые вырабатываются клетками организма и способствуют развитию воспаления, боли и лихорадки, поддерживают функцию свертывания крови, защищают слизистую оболочку желудка от разрушающего воздействия соляной кислоты [5, 6].

Ацеклофенак представляет собой [[2-(2,6-дихлорфенил)амино]ацетил]окси]уксусную кислоту. В США и Европе ацеклофенак доступен для перорального, ректального и инъекционного введения [7]. В Российской Федерации в ГРЛС зарегистрированы таблетки короткого действия, таблетки с модифицированным высвобождением, порошок для приготовления суспензии для приема внутрь и крем для наружного применения.

Побочные эффекты ацеклофенака включают желудочно-кишечные расстройства, дерматологические и аллергические реакции [8]. Первоначальные исследования токсического действия предоставляют информацию о вреде здоровью, который может возникнуть в перспективе при применении ацеклофенака [9]. Острая передозировка препаратом может привести к потенциально смертельному повреждению печени. В редких случаях даже терапевтическая доза может быть опасной [10]. Нефротоксичность ацеклофенака менее выражена, чем у диклофенака [11].

Механизмом действия ацеклофенака является подавление циклооксигеназы – ключевого фермента метаболизма арахидоновой кислоты в простагландины. Известны две изоформы циклооксигеназы – ЦОГ-1 и ЦОГ-2, вовлеченные, соответственно, в продукцию физиологических и провоспалительных ПГ. ЦОГ-1 определяется в эндотелии, слизистой оболочке желудка и почках, в то время как ЦОГ-2 индуцируется провоспалительными цитокинами и эндотоксином в клетках *in vitro* и очаге воспаления *in vivo*.

Ацеклофенак ингибирует оба изофермента, но преимущественно экспрессию ЦОГ-2, и таким образом приближается к селективному. Однако препарат ингибирует еще и синтез таких воспалительных цитокинов, как IL-1b, который производится многими клетками, в том числе хондроцитами. Как известно, именно IL-1b подавляет синтез хондроцитов и активизирует дегградацию хряща, повышая высвобождение протеолитических ферментов. В этом отношении противовоспалительная ингибирующая активность ацеклофенака многосторонне влияет на воспаление и боль, подавляя и ЦОГ-2, и IL-1b.

Несмотря на длительное присутствие ацеклофенака на фармацевтическом рынке, представлено мало доступной информации о доклинических исследованиях профиля токсичности препарата.

В данном обзоре рассмотрены аспекты токсичности, специфической активности, фармакокинетики и фармакодинамики ацеклофенака, приведенные в различных источниках, описывающих его доклинические исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск источников информации для обзора осуществлялся по отечественным и международным базам elibrary (<https://elibrary.ru/>) и PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием контекстных запросов, включающих международные непатентованные названия, термины доклинических

исследований фармакокинетики, фармакодинамики и используемые виды животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Физико-химические свойства ацеклофенака, химический анализ

Ацеклофенак (CAS 89796-99-6) представляет собой белый кристаллический порошок, который практически нерастворим в воде, растворим в ацетоне и в спирте [12]. Раствор в метаноле дает максимум поглощения при 275 нм [13]. Структура ацеклофенака ([[[2-(2,6-дихлорфенил)амино]ацетил]окси]уксусной кислоты) представлена на рис. 1.

Молекулярная формула ацеклофенака – C₁₆H₁₃Cl₂NO₄, относительная молекулярная масса – 354,2.

Экспериментально доказана стабильность ацеклофенака в плазме при комнатной температуре в течение шести часов [14].

2. Фармакодинамика ацеклофенака

Исследования *in vitro* показали, что ацеклофенак ингибирует медиаторы воспаления: ПГ E₂, интерлейкины IL-1, IL-6 и фактор некроза опухоли TNF [15].

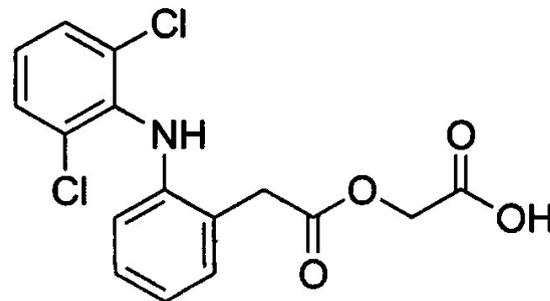
Ацеклофенак продемонстрировал стимулирующее действие на синтез гликозаминогликанов в хряще человека при остеоартрите [16] и хондропротекторные эффекты, опосредованные подавлением металлопротеаз и синтезом протеогликанов, в кроличьих суставных хондроцитах и ревматоидных синовиальных клетках человека [17, 18].

Исследования с использованием цельной крови человека показали, что ацеклофенак и его метаболит 4'-гидроксиацеклофенак вызывают 50%-е ингибирование ЦОГ-2 (IC₅₀ = 0,77 и 36 мкМ, соответственно) и имеют относительно незначительное влияние на ЦОГ-1 (IC₅₀ = 100 мкМ) [9]. Чем выше значение IC₅₀, тем меньше ингибирующее действие соединения. Диклофенак, другой метаболит ацеклофенака, ингибирует ЦОГ-1 и ЦОГ-2 (IC₅₀ = 0,6 и 0,04 мкМ, соответственно). ЦОГ-2/ЦОГ-1 селективность была продемонстрирована для ацеклофенака, но не для пироксикама, индометацина, кетопрофена, теноксикама [19].

В исследованиях *in vivo* на грызунах ацеклофенак облегчал боль и лихорадку и показал более слабое ulcerогенное действие, чем напроксен или индометацин, и аналогичный или более низкий ulcerогенный потенциал, чем диклофенак [20, 21].

Модель каррагинан-индуцированного отека лапы крысы использовали для оценки противовоспалительного действия ацеклофенака при введении в виде стандартной лекарственной формы и сферических агломератов [22]. Голодавшие в течение ночи крысы были разделены на три группы (n = 6):

Группа I: чистый ацеклофенак (10 мг/кг) в 0,5%-м растворе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы.



Ацеклофенак

Рис. 1. Структурная формула ацеклофенака
Fig. 1. Structural formula of aceclofenac

Группа II: агломераты ацеклофенака (10 мг/кг) в 0,5% КМЦ.
Группа III (контроль): 2,5 мл 0,5% КМЦ.

Через 30 минут после введения лекарственного средства крысы получали подкожное введение в подошвенную область левой задней лапы 0,05 мл 1%-го раствора каррагинана в физиологическом растворе. Объемы подушечки были измерены с помощью плетизмометра перед введением каррагинана, через один, два, три, четыре и пять часов после введения. Исследователи рассчитывали процент ингибирования отека в течение всех временных интервалов.

Препарат в форме сферических агломератов показал максимальное ингибирование отека (83,6±1,70%) через четыре часа, в то время как чистый препарат продемонстрировал максимальную активность (82,9±1,42) через пять часов. Значения ингибирования отека ацеклофенаком, введенным в виде агломератов, были выше по сравнению с обычной формой препарата во всех временных точках.

Тест «Уксуснокислые корчи» был использован на мышах для оценки анальгетической активности препарата [22, 23]. Голодавшие в течение ночи мыши были разделены на три группы (n = 6) и получали ацеклофенак или КМЦ перорально, как указано в процедуре исследования противовоспалительной активности. Через час после введения ацеклофенака был введен раствор 1%-й уксусной кислоты (0,1 мл/10 г, внутривентрально). Число корчей регистрировали в течение 30 минут. Обезболивающую активность оценивали по доле уменьшения корчей (брюшные сокращения, схватки).

Эффект чистого ацеклофенака и его агломератов на уксуснокислые корчи у мышей оценивали в сравнении с контрольной группой (без медикаментозного лечения). Контрольные животные показали 34,83±13,04 схваток. Обезболивающее действие агломератов ацеклофенака (8,83±1,42 схваток) было быстрее, и процент ингибирования сокращений (74,64±1,52%) был более высоким по сравнению с таковыми для чистого препарата (количество сокращений – 10,16±1,90; ингибирование сокращений – 70,82±1,25%). Эти наблюдения могут свидетельствовать о повышенной анальгетической активности, которая может быть связана с повышением скорости абсорбции и биодоступности ацеклофенака в сферических агломератах.

3. Фармакокинетические доклинические исследования

Фармакокинетические исследования проводились на крысах, голодавших в течение ночи. Животные были разделены на три группы (n = 6):

Группа I: чистый ацеклофенак (10 мг/кг) в 0,5% КМЦ.

Группа II: агломераты ацеклофенака (10 мг/кг) в 0,5% КМЦ.

Группа III: порошкообразный препарат, полученный путем измельчения таблеток ацеклофенака (10 мг/кг) в 0,5% КМЦ.

После введения соответствующих препаратов образцы крови отбирали из орбитальной пазухи через определенные ин-

тервалы времени (полчаса, час, два часа, четыре часа, шесть часов, восемь часов) в гепаринизированные пробирки. Отделяли плазму немедленно, используя холодное центрифугирование (оборудование Remi Ltd., Мумбаи) при 3000 оборотах в минуту в течение 15 минут. Плазму хранили при -72 °С до анализа.

Абсорбция ацеклофенака после перорального введения была быстрой во всех трех группах, показателем чего является низкое значение T_{max} , равное одному часу. Однако величина C_{max} была более высокой при применении сферических агломератов ацеклофенака, что указывает на более высокую скорость абсорбции данной лекарственной формы. Период полувыведения ацеклофенака в агломератах был меньше, что указывает на его более быстрое выведение из организма.

Кроме того, было показано меньшее значение среднего времени существования и высокое – константы скорости элиминации агломератов по сравнению с препаратом и чистым веществом. Значение площади под фармакокинетической кривой при введении агломератов ацеклофенака свидетельствует о повышенной биологической доступности и более быстром поглощении ацеклофенака из агломератов по сравнению с другими лекарственными формами препарата.

Для количественного определения ацеклофенака в плазме крови крыс использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [24]. В эксперименте выявлена стабильность образцов крови с ацеклофенаком через шесть часов экспозиции при комнатной температуре, после трех циклов замораживания при -70 °С и оттаивания, после длительного хранения при -70 °С в течение 30 дней.

Фармакокинетические параметры, которые исследовали у крыс после однократного приема ацеклофенака внутрь в дозе 9 мг/кг, были сопоставимы с данными других исследований, за исключением T_{max} , которое в данном исследовании в четыре раза меньше. Вероятно, это отклонение обусловлено тем, что у крыс ацеклофенак ведет себя как пролекарство, быстро превращается в диклофенак путем гидролиза [25].

Достоверность T_{max} по R. Mustade et al. подтверждена в работе K. Noh et al. [26], в которой представлены фармакокинетические параметры ацеклофенака и трех его метаболитов у крыс после перорального (20 мг/кг) или внутривенного (10 мг/кг) однократного введения. Определяли клиренс, биодоступность и объем распределения, также оценивалась фармакокинетика метаболитов ацеклофенака.

Данные по фармакокинетике пролонгированных таблеток ацеклофенака (добавление гидроксипропилметилцеллюлозы и этилцеллюлозы плюс влажное гранулирование) представлены в статье S. SHANMUGAM [27]. Лишенные на ночь корма крысы линии Вистар были разделены на три группы (n = 6). Животные группы I получили ацеклофенак, суспендированный в 0,5%-м растворе натриевой соли КМЦ, перорально в дозе 10

Фармакокинетика препаратов ацеклофенака пролонгированного действия
Pharmacokinetics of long-acting aceclofenac drugs

Табл. 1.

Table 1.

Параметр	Чистый ацеклофенак	Воспроизведенный препарат	Препарат сравнения
C_{max} , мкг/мл	3,48±0,192	2,15±0,474	2,34±0,259
T_{max} , ч	1,00±0,000	2,00±0,000*	2,00±0,000*
$T_{1/2}$, ч	3,34±0,984	4,33±1,150	4,08±0,718
AUC _{0-t} , мкгч/мл	13,63±0,755	17,99±0,602*	18,48±,956*
K_e , ч ⁻¹	0,207±0,004	0,160±0,001*	0,170±0,004**

Примечания: * – значимо по сравнению с чистым ацеклофенаком (p < 0,05),

** – значимо по сравнению с препаратом сравнения (p < 0,05).

Notes: * – significant compared to pure aceclofenac (p < 0,05),

** – significant compared to the comparison drug (p < 0,05).

мг/кг (чистый ацеклофенак). Животные группы II получили составленные авторами таблетки из гранул ацеклофенака с замедленным высвобождением, которые суспендировали в 0,5%-м растворе КМЦ, перорально в дозе 10 мг/кг. Животные группы III получали выпускаемые фармацевтической промышленностью измельченные гранулы ацеклофенака с замедленным высвобождением. Их также суспендировали в 0,5%-м растворе КМЦ и вводили перорально в дозе 10 мг/кг. Образцы крови были собраны с интервалом полчаса, час, два часа, четыре часа, шесть часов, восемь часов и двенадцать часов после введения дозы в гепаринизированные пробирки из орбитального синуса животных. Плазму немедленно отделяли с использованием холодной центрифуги при 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут и до анализа хранили при -20 °С.

Концентрацию ацеклофенака в плазме определяли методом ВЭЖХ. Полученные фармакокинетические параметры отражены в табл. 1.

4. Доклинические исследования ацеклофенака

4.1. Исследования общей токсичности

Оценка субхронической токсичности ацеклофенака проведена на 48 крысах линии Wistar SPF-статуса (24 самца и 24 самки), полученных из вивария Индийского института химической биологии, Калькутта [28]. Животные были акклиматизированы в течение семи дней до начала испытания и случайным образом разделены на четыре группы, каждая из которых состояла из шести самцов и шести самок. Размещались группы в комнате с барьерной системой, где поддерживались следующие условия:

- температура от 20 до 24 °С;
- относительная влажность от 30 до 70%;
- частота вентиляции 18 раз в час;
- 12-часовой цикл день/ночь.

Животных содержали в клетках из поликарбоната на мягком подстиле, заменяемом раз в трое суток. Крысы получали чистую воду AquaGuard в стеклянных бутылках (без ограничения доступа) и гранулированный корм, поставляемый Ghosh Enterprise, Калькутта.

Ацеклофенак суспендировали в воде и вводили крысам внутривентриально в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг в объеме воды, равном 1 мл/100 г массы тела. Свежие суспензии тестируемых образцов готовили ежедневно в течение 28 дней. Контрольным животным вводили только растворитель (воду). Внутривентриальный путь введения был выбран как один из наиболее точных для дозирования вещества.

Животные каждого пола были разделены на четыре группы (n= 6). Животные группы I получали стерильную воду и использовались для контроля. Группы II, III и IV получали следующие дозы: 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг массы тела, соответствующие низкой, средней и высокой дозам, в течение 28 дней.

После окончания эксперимента голодавших в течение ночи животных забивали и собирали образцы крови и тканей. Гематологические, биохимические и гистологические параметры были оценены во всех группах.

Кровь для анализов отбирали из орбитального синуса с использованием гепарина в качестве антикоагулянта. Подсчет количества клеток крови проводили в мазке крови, гематологические параметры были изучены с помощью счетчика клеток Sysmex-K1000. Изучали следующие параметры: гемоглобин, количество эритроцитов, ретикулоцитов, гематокрит, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина, средняя концентрация гемоглобина, количество тромбоцитов, белых кровяных телец, нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов и моноцитов.

Биохимические исследования сыворотки были проведены с использованием Robonik ASP-300. Азот мочевины (мг%),

аланинаминотрансфераза (МЕ/л), аспаратаминотрансфераза (МЕ/л), щелочная фосфатаза (МЕ/л) и уровень сахара были оценены в образце плазмы.

Все животные были умерщвлены с помощью CO₂-камеры. Проводилась аутопсия с фиксацией веса следующих органов: печень, почки и сердце. Массы органов были записаны как абсолютные значения. Вычислялись их относительные значения (процент от массы тела). Образцы тканей органов животных из групп контроля и животных на самом высоком уровне дозы (20 мг/кг) были сохранены в 10%-м формалине для гистопатологической экспертизы (сердце, почки, легкие, желудок).

Данные по массе тела и относительному весу органов, показатели гематологии и биохимии сыворотки были статистически проанализированы. Полученные данные выражали в виде среднего значения плюс/минус стандартное отклонение. Статистические данные анализировали с помощью теста Деннета, в котором приводилось сравнение контрольных групп и групп, получавших препарат. Различия считались статистически значимыми при p < 0,05.

Во всех группах крыс в течение всего периода дозирования не зафиксировано существенных изменений в массе тела. Тем не менее животные из групп контроля и низких доз имели нормальный вес тела, а при высоких и средних дозах скорость увеличения массы тела снизилась по сравнению с контрольной группой. Среднее потребление корма в сутки было приблизительно равно 7,77 г как для самцов, так и для самок.

При прекращении приема препарата на 29-й день не наблюдалось существенных изменений в значениях гематологических параметров по сравнению с контрольными группами. Полученные значения находились в пределах биологических и лабораторных норм для самцов и самок крыс. Биохимические показатели содержания белка, щелочной фосфатазы, азота мочевины и сахара в крови были сравнимы с контрольной группой и находились в нормальных биологических и лабораторных пределах. Однако значения АЛТ и АСТ были высокими в случае и высоких, и средних доз ацеклофенака. Никаких признаков значительной токсичности не наблюдалось ни в одном органе при гистопатологическом анализе животных, получавших малую дозу ацеклофенака.

Таким образом, результаты гистологических исследований подтверждают безопасность ацеклофенака, как и другие исследованные физиологические, биохимические и гематологические параметры. Однако высокие (20 мг/кг) и средние дозы (10 мг/кг) лекарственного средства у всех животных вызывали очаговые зоны гиперемии, преимущественно в антральном отделе желудка. Кроме того, в группе высоких доз у некоторых животных наблюдалось кровотечение из прямой кишки, черный стул и гибель четырех животных через 12 дней после начала эксперимента.

В другом исследовании изучено влияние ацеклофенака в дозах 2, 5 и 10 мг/кг при внутривенном введении [29]. Результаты, полученные на самцах и самках, свидетельствуют о высокой безопасности препарата без гендерных различий.

Интерес представляет исследование токсичности ацеклофенака на птицах (цыплятах), описанное в статье Patel N. J. и соавт. [30].

Ацеклофенак является смертельным для птиц в дозах, которые вводят скоту, чтобы уменьшить боль и отеки вследствие ревматизма или артрита. Корма для птицы включают много побочных продуктов животного происхождения, таких как мясо и костная мука, кровь, баранина сальная и т. д., которые, вероятно, содержат ацеклофенак. Это приводит к развитию висцеральной подагры у птиц. Птицы практически не вырабатывают фермента уриказы, конечного продукта

белкового метаболизма мочевой кислоты, и, следовательно, имеют потенциал для развития подагры. Мочевая кислота вырабатывается печенью и выводится из организма через почки. Патология возникает в результате тяжелой почечной дисфункции, в то время как снижение почечной фильтрации приводит к увеличению уровня мочевой кислоты в крови [31].

Для более глубокого понимания токсических эффектов ацеклофенака авторы провели исследование на суточных цыплятах BV-300. В общей сложности 100 цыплят были закуплены у местного коммерческого инкубатора (Shakti Pvt. Ltd., Sarsa, Ананд, Гуджарат, Индия) и содержались при стандартных условиях в клетках.

Ацеклофенак, обладающий меньшим токсическим потенциалом, чем диклофенак, был использован в дозе, вдвое большей, чем диклофенак в предыдущем исследовании на цыплятах-бройлерах [32]. Цыплята были случайным образом разделены на четыре группы, состоящие из 25 птиц каждая. Таблетку ацеклофенака (100 мг) измельчали до тонкого порошка и смешивали с кормом. Цыплята групп II, III и IV получали градуированные дозы ацеклофенака в размере десяти частей на миллион (низкая доза), 20 частей на миллион (средняя доза), 30 частей на миллион (высокая доза) соответственно с кормом каждый день в течение 21 дня. Цыплята группы I использовали для контроля и кормили чистым кормом. Взвешивание цыплят проводили с недельными интервалами. Показатели смертности и заболеваемости регистрировали в течение всего периода эксперимента.

После завершения эксперимента выжившие птицы из всех групп были подвергнуты эвтаназии посредством цервикальной дислокации. Образцы тканей органов (почки, печень, сердце, легкие, селезенка и кишечник) были собраны в 10%-м формалине для гистопатологического исследования. Кусочки ткани из почек и печени фиксировали в абсолютном спирте и окрашивали с помощью специального метода окрашивания De-Galantha для демонстрации кристаллов уратов.

Данные по потреблению корма, массе тела и смертности были подвергнуты одностороннему испытанию ANOVA, где $p < 0,05$ рассматривалась как статистически значимая и $p < 0,01$ – как весьма значительная.

У цыплят из групп I и II не выявили каких-либо наблюдаемых патологических клинических признаков, тогда как птенцы групп III и IV показали сходные признаки, которые постепенно становились более выраженными в группе IV. Птицы демонстрировали тенденцию апатично стоять на одном месте с вздерженными серыми перьями и поникшими крыльями. У них появились истощение, обезвоживание, подавленность. Глаза стали вялыми и сморщенными. Появились такие знаки, как анорексия, выщипывание пера и неравномерный рост. Такие птицы показали перемежающуюся хромоту и неспособность стоять.

Большинство клинических признаков, наблюдаемых при введении ацеклофенака цыплятам, соответствовало более ранним отчетам, посвященным токсичности диклофенака и кетопрофена [33, 34]. Максимальная смертность (16%) наблюдалась в группе IV, начиная с 16-го по 19-й день. В группе III смертность была 4%, начиная с 19-го дня.

Дозозависимое снижение массы тела наблюдалось во всех группах цыплят, получавших ацеклофенак. В конце 1-й недели только птенцы группы IV показали значительное снижение ($p < 0,05$) массы тела. В течение эксперимента наблюдалось снижение потребления корма в группе IV, а затем в группах III и II, по сравнению с контрольной.

Вскрытие птиц, погибших в ходе эксперимента, показало истощение и обезвоживание. При вскрытии брюшной полости – отложение уратов в виде сухих белых пятен над различными висцеральными органами. Пораженные почки

были более расширенными и матовыми, с меловыми белыми отложениями уратов и контактными точечными кровоизлияниями на поверхности. Степень поражения почек варьировалась от легкой до умеренной. При микроскопическом анализе были отмечены признаки поражения: трубчатые кровоизлияния, паренхиматозная дегенерация, некроз канальцев и отложение кристаллов мочевой кислоты.

О поражении почек подагрическим нефритом, уратами и осаждением мочевой кислоты сообщили и другие авторы [35–37]. Печень мертвых птиц имела меловые белые отложения на ее поверхности, что соответствует результатам Japa и соавт. [38]. В миокарде наблюдалось осаждение уратов, наряду с разрушением кардиомиоцитов и инфильтрацией воспалительных клеток, что подтверждает результаты Mig и соавт. [39], Patel [40] и Шульц и соавт. [41]. Повреждения селезенки представлены скоплениями селезеночной паренхимы с фокальной или мультифокальной зоной некроза и истощением лимфоцитов (от легкой до умеренной степени). Наблюдались кровоизлияния в альвеолярной паренхиме и другие легочные поражения, от легкой до умеренной степени тяжести.

Исследования подострой токсичности, противовоспалительного и болеутоляющего эффектов, фармакокинетических параметров были проведены на крысах Wistar и швейцарских мышах-альбиносах [42]. Самцы крыс линии Wistar (массой 200–250 г) и швейцарские мыши-альбиносы (весом 25–30 г) были размещены в повышенных проволочных клетках, по четыре животных на клетку, со свободным доступом к пищевым продуктам (корма Lipton, Мумбай, Индия) и воде. Использовали пероральное введение чистого лекарственного средства, агломератов и порошковой массы, полученной из продаваемых таблеток.

Исследование подострой токсичности проводили на крысах линии Wistar [43]. Крысы были разделены на три группы ($n = 6$) и получали ацеклофенак перорально в течение 30 дней, как и в схеме исследования противовоспалительной активности. Определяли гематологические параметры (такие как общее количество эритроцитов, количество лейкоцитов и гемоглобина) в крови, собранной из ретроорбитального синуса в гепаринизированные пробирки на 15-й и 30-й день исследования. В первый и последний дни лечения уровень глюкозы в крови был проверен с помощью прибора Accu-Chek (Roche, США). Крысы в течение ночи перед введением препаратов были лишены пищи. На 31-й день образцы крови собирали от каждой крысы индивидуально в негепаринизированную трубку и анализировали сывороточные уровни АЛТ, АСТ, мочевины, креатинина, холестерина, триглицеридов и липопротеидов высокой плотности с помощью автоанализатора (Hitachi 911, Токио, Япония).

Не было ни одного случая смерти животных при изучении подострой токсичности. У всех животных не наблюдались никаких отличий в отношении приема пищи и потребления воды, общего поведения и других физиологических видов деятельности. Результаты тестируемых гематологических и биохимических показателей крови животных не отразили каких-либо изменений.

4.2. Изучение местнораздражающего действия

В исследовании субхронической токсичности у белых крыс ацеклофенак при внутривенном введении вызывал желудочно-кишечные кровотечения, приводящие к анемии [29]. Хроническое пероральное введение ацеклофенака может приводить к неблагоприятным эффектам со стороны слизистой оболочки желудка из-за ингибирования синтеза простагландинов [44] и благодаря его кислотному характеру [45]. При местном нанесении возможно умеренное или слабое местное раздражение, ко-

торое сопровождается покраснением и мягким зудом, исчезающими с прерыванием лечения. Возможно развитие реакций светочувствительности при лечении участков кожи, которые подвергаются сильному солнечному свету без надлежащей защиты [46].

4.3. Исследования специфической токсичности ацеклофенака

Результаты доклинических исследований специфических видов токсичности (аллергенность, иммунотоксичность, мутагенность, канцерогенность, репродуктивная токсичность) на животных показывают, что у крыс не было выявлено доказательств тератогенеза. У кроликов лечение ацеклофенаком (10 мг/кг/день) приводило к ряду морфологических изменений у плодов некоторых животных. Ацеклофенак не проявлял мутагенную активность в трех исследо-

ваниях *in vitro* и в исследовании *in vivo* у мышей. Препарат не оказался канцерогенным ни у мышей, ни у крыс [47].

ВЫВОДЫ

Данный обзор обобщает сведения, приведенные в различных источниках, описывающих доклинические исследования токсичности, специфической активности, фармакокинетики и фармакодинамики ацеклофенака.

Материалы, полученные в ходе исследования, по нашему мнению, могут быть использованы научными работниками, которые занимаются доклиническими исследованиями лекарственных препаратов, так как на их основе возможно обоснование эффективности и безопасности воспроизведенных лекарственных препаратов (дженериков) для их дальнейшей регистрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein JL, Larson LR, Yamashita BD et al. Management of NSAID induced gastropathy: an economic decision analysis. *Clinical therapeutics* 1997; 19 (6): 496–509. DOI: 10.1016/s0149-2918(97)80021-5.
2. Miller LG, Prichard JG. Prichard: Current issues in NSAID therapy. *Primary Care* 1990; 17 (3): 589–601.
3. Peloso PM. Strategies and practice for use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 1996; 1(105): 29–43.
4. Simon LS. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Opinion in Rheumatology* 1995; 7: 159–166.
5. Higgins CB, Brasunwald E: The prostaglandins: biochemical, physiologic and clinical considerations. *The American Journal of Medicine* 1972; 53 (1): 92–112.
6. Sharma R, Vegad JL. Avian gout: causes, treatment and prevention. *Poultry line*. 2000; 10 (8): 19-21.
7. Skaikh IM, Jadhav KR, Gide PS, Kadam VJ, Pisal SS. Topical delivery of aceclofenac from lecithin organogels: preformulation study. *Current Drug Delivery* 2006; 3 (4): 417–427.
8. Henrotin Y, de Leval X, Mathy-Hartet M, et al. In vitro effects of aceclofenac and its metabolites on the production by chondrocytes of inflammatory mediators. *Inflammation Research*. 2001; 50 (8): 391–399.
9. Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 1983; 54 (4): 275–287.
10. Prieto de Paula JM, Romero CR, Villamandos NYV. Hepatic toxicity caused by aceclofenac. *Gastroenterologia Hepatologia* 1997; 20 (3): 165.
11. Aydin G, Gokcimen A, Oncu M, et al. Histopathological changes in liver and renal tissues induced by different doses of diclofenac sodium in rats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2003; 27: 1131–1140.
12. Aceclofenac. *British Pharmacopoeia* 1. 2004; 36–38.
13. Aceclofenac. *European Pharmacopoeia* 6.2. 2008; 3685–3686.
14. Gowda KV, Rajan DS, Mandal U, et al. Evaluation of bioequivalence of two formulations containing 100 milligrams of aceclofenac. *Drug Dev Ind Pharm*. 2006; 32: 1219–1225.
15. Dooley M, Spencer CM, Dunn CJ. Aceclofenac. A reappraisal of its use in the management of pain and rheumatic disease. *Drugs*. 2001; 61: 1351–1378.
16. Dingle JT, Parker M. NSAID stimulation of human cartilage matrix synthesis. *Clin. Drug Invest*. 1997; 14: 353–362.
17. Akimoto H, Yamazaki R, Hashimoto S, et al. 4'-Hydroxyaceclofenac suppresses the interleukin-1-induced production of promatrix metalloproteinases and release of sulfated-glycosaminoglycans from rabbit articular chondrocytes. *Eur. J. Pharmacol*. 2000; 401: 429–436.
18. Yamazaki R, Kawai S, Mizushima Y, et al. A major metabolite of aceclofenac, 4'-hydroxy aceclofenac, suppresses the production of interstitial pro-collagenase/proMMP-1 and prostromelysin-1/proMMP-3 by human rheumatoid synovial cells. *Inflamm. Res*. 2000; 49: 133–138.
19. Lindbury P, Vojnovic I, Warner T. COX-2/COX-1 selectivity of aceclofenac in comparison with celecoxib and rofecoxib in the human whole blood assay. *Osteoarthr. Cartil*. 2000; 8 (Suppl. B): S40–S41.
20. Arañó A, Zapatero MI, Basi N, et al. Comparison of the anti-inflammatory effect and gastrointestinal tolerability of aceclofenac and diclofenac. *Arzneim-Forsch*. 1996; 46: 398–400.
21. Grau M, Guasch J, Montero J, et al. Pharmacology of the potent new non-steroidal anti-inflammatory agent aceclofenac. *Arzneim-Forsch*. 1991; 41: 1265–1276.
22. Kulkarni SK. *Handbook of experimental pharmacology*, 2nd revised and enlarged edition. India: Vallabh Prakashan; 1997: 52–56.
23. Mutalik S, Paridhavi K, Mallikarjuna RC, et al. Analgesic and antipyretic effect of *Solanum melongena*. *Indian J. Pharmacol*. 2003; 35: 312–315.
24. Musmade P, Subramanian G, Srinivasan KK. High performance liquid chromatography and pharmacokinetics of aceclofenac in rats. *Analytica Chimica Acta* 2007; 585: 103–109.

25. Bort R, Ponsoda X, Carrasco E, et al. Comparative metabolism of the nonsteroidal anti-inflammatory drug, aceclofenac, in the rat, monkey and human. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24 (9): 969–975.
26. Noh Keumhan, Shin Beom Soo, Kwon Kwang-il et.al. Absolute bioavailability and metabolism of aceclofenac in rats/ *Arch. Pharm. Res.* Опубли. онлайн 18.03.2014.
27. Shanmugam S. Bioequivalence Study of Aceclofenac Formulations in Animal Model. *Asian Journal of Chemistry.* 2010; 22 (10): 8249–8251.
28. Rajesh S, Pallavi B, Pramjit A. Sub-chronic toxicological evaluation of aceclofenac in rats. 2001; 2 (3): 62–72.
29. Tamta A, Payasi A, Chaudhari M, et al. Sub-acute toxicity of aceclofenac drug in albino rat. *Iranian Journal of Toxicology.* 2009; 2 (3): 240–245.
30. Patel NJ, Joshi BP, Prajapati KS, et al. Pathomorphological changes of aceclofenac toxicity in layer chicks. *Veterinary World [Internet].* 2014. Available from: <https://veterinaryworld.org/Vol.7/Feb-2014/10.pdf>
31. Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature.* 2004; 427: 630–633.
32. Gajera AB. M.V. Sc. thesis. Pathological studies on experimental feeding of diclofenac sodium in broilers. Anand: Anand Agricultural University; 2006.
33. Ghanvat DP. M.V. Sc. thesis. Toxicopathological studies of ketoprofen in layer chicks. Anand: Anand Agricultural University; 2012.
34. Jain, T., Koley, K. M., Vadlamudi, V. P., et al. () Diclofenac induced biochemical and histopathological changes in white leghorn birds (*Gallus domesticus*). *Indian J Pharmacol.* 2009; 41(5): 237–241.
35. Irtaza H, Khan MZ, Khan A, et al. Toxicological effects of diclofenac in four avian species. *Avian Pathol.* 2008; 37 (3): 315–321.
36. Senthilkumar K, Thirumurugan R. Visceral gout in a Bengal vulture. *Indian Vet. J.* 2005; 82 (7): 795–796.
37. Sharma R, Vegad JL. Avian gout: causes, treatment and prevention. *Poultry line.* 2000; 10 (8): 19–21.
38. Jana S, Mukhopadhyay SK, Niyogi D, et al. Epidemiopathological studies of gout in broiler birds in West Bengal. *Indian J. Vet. Pathol.* 2009; 33 (2): 222–224.
39. Mir MS, Darzi MM, Khan AA, et al. Investigation of an outbreak of gout in Kashmir Favorella poultry. *Indian. J. Vet. Pathol.* 2005; 29 (1): 35–37.
40. Patel AK. M.V.Sc. thesis. Epidemiological and experimental studies on etiology of visceral gout in broiler chicks. Anand: Anand Agricultural University; 2005.
41. Shultz S, Baral HS, Charman S, et al. Diclofenac poisoning is widespread in declining vulture populations across the Indian subcontinent. *Crossmark.* 2004; 271 (6): 458–460.
42. Achutha NU, Srinivas M, Meka SR, et al. Preparation and, in vitro, preclinical and clinical studies of aceclofenac spherical agglomerates / *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2008; 70: 674–683.
43. Mutalik S, Sulochana B, Chetana M, et al. Preliminary studies on acute and subacute toxicity of an antidiabetic herbal preparation, Dianex. *Indian J. Exptl. Biol.* 2003; 41: 316–320.
44. Hooper L, Brown TJ, Elliott RA, et al. The effectiveness of five strategies for the prevention of gastrointestinal toxicity induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review. *The British Medical Journal.* 2004; 329 (7472): 948–952.
45. Heyneman CA, Lawless-Liday C, Wall GC. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs.* 2000; 60 (3): 555–574.
46. Bujan JG, Alvarez-Eire GMG, Martinez W, et al. Photoallergic contact dermatitis from aceclofenac. *Contact Dermatitis.* 2001; 45 (3): 170.
47. Public Assessment Report. Decentralised Procedure. ACECLOFENAC 100 mg film-coated tablets. UK/H/3717/001/DC. UK Licence No: PL 23088/0008 ASTRON RESEARCH LIMITED. 19th August 2011. Available from: http://e-lactancia.org/media/papers/DS-Aceclofenac-2007_1.pdf.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Наталья Аскольдовна Анисимова, канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: natalia.anisimova@pharminnotech.com

Наталья Олеговна Селизарова, канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: natalia.selizarova@pharminnotech.com

Григорий Алексеевич Плиско, младший научный сотрудник центра экспериментальной фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: grigoriy.plisko@pharminnotech.com

Евгений Дмитриевич Семивеличенко, младший научный сотрудник центра экспериментальной фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Светлана Михайловна Напалкова, д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: svetlana.napalkova@pharminnotech.com

ADDITIONAL INFORMATION ABOUT AUTHORS

Natalia A. Anisimova, Ph.D. in Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: natalia.anisimova@pharminnotech.com

Natalia O. Selizarova, Ph.D. in Medicine, Associate Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: natalia.selizarova@pharminnotech.com

Grigory A. Plisko, Junior Researcher, Center for Experimental Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: grigoriy.plisko@pharminnotech.com

Evgeny D. Semivelichenko, Junior Researcher, Center for Experimental Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Svetlana M. Napalkova, Ph.D. in Biological Sciences, Professor, Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: svetlana.napalkova@pharminnotech.com

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Aspects describing preclinical trials of aceclofenac as a generic drug registration tool

©2020. N.O. Selizarova¹, N.A. Anisimova¹, G.A. Plisko¹, E.D. Semivelichenko¹, S.M. Napalkova^{1*}

¹ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

* e-mail: svetlana.napalkova@pharminnotech.com

Received November 19, 2020;

Revised December 08, 2020;

Accepted December 11, 2020

The paper presents the aspects of the toxicity, specific activity, pharmacokinetics and pharmacodynamics of aceclofenac, given in various sources describing its preclinical studies.

The search for information sources for the study was carried out using domestic and international databases: eLibrary and PubMed using contextual queries, including terms of the international nonproprietary name, preclinical studies of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and animal species.

Aceclofenac is one of the most prescribed drugs for acute and chronic pain. It refers to non-steroidal anti-inflammatory drugs, considered as drugs of first choice in the treatment of inflammation and pain.

On the pharmaceutical market of the Russian Federation, aceclofenac is presented in the form of tablets, powder for suspension preparation, cream for external use, which allows it to be prescribed for various diseases. It has shown itself to be highly effective in the symptomatic treatment of diseases of the musculoskeletal system, for the relief of acute and chronic pain.

A review of preclinical studies materials cited in various literature sources and including aspects of studying the toxicity, specific activity, pharmacokinetics and pharmacodynamics of aceclofenac, in our opinion, will allow using the data obtained in our study as one of the tools for further registration of generics.

KEYWORDS: aceclofenac; pharmacokinetics; pharmacodynamics; preclinical studies; generics; general toxicity; local irritant effect; specific toxicity