

УДК 615.281.8:615.099.092:615.076.9



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА VMU-2012-05 – ОРИГИНАЛЬНОГО НЕНУКЛЕОЗИДНОГО ИНГИБИТОРА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1

В.А. Вавилова¹, Е.В. Шекунова¹, Е.А. Джайн (Корсакова)², В.Ю. Балабаньян²,
А.А. Озеров³, М.Н. Макарова¹, В.Г. Макаров¹

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

188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г. п. Кузьмолловский, ул. Заводская, д. 3, корп. 245

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т., дом 27, корп. 1

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

E-mail: Ekaterina.korsa@gmail.com

Получено 15.02.2021

Принята к печати 20.04.2021

Антиретровирусная терапия в настоящее время является основным компонентом лечения больных ВИЧ-инфекцией. Разработка новых более эффективных и более безопасных препаратов, является актуальной задачей.

Цель. Изучение токсических свойств готовой лекарственной формы (ГЛФ) VMU-2012-05- нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил) для лечения ВИЧ-1 инфекции при однократном и многократном энтеральном введении.

Материалы и методы. Изучение токсических свойств при однократном введении проводили на беспородных мышах, препарат вводили в лимитирующей дозе 2000 мг/кг (по активному веществу). Токсические свойства при многократном ежедневном, в течение 90 дней, введении изучали на крысах обоего пола в дозах 0 мг/кг (плацебо), 9 мг/кг (1 ВТД), 45 мг/кг (5 ВТД), 90 мг/кг (10 ВТД) и кроликах обоего пола при 28-дневном введении в дозах 0 мг/кг, 4 мг/кг (1 ВТД), 20 мг/кг (5 ВТД), 40 мг/кг (10 ВТД), период отсроченного наблюдения – 30 дней. В ходе эксперимента проводили клинические наблюдения и осмотры, регистрацию массы тела, проводили физиологические и клинико-лабораторные исследования. По окончании периода введения (50% животных) и по окончании периода отсроченного наблюдения проводили патоморфологическое исследование.

Результаты. LD₅₀ препарата – более 2000 мг/кг. При многократном введении установлен уровень доз, не вызывающих нежелательных эффектов (NOAEL), который для крыс составил 9 мг/кг (1 ВТД), для кроликов – 4 мг/кг (1 ВТД). По результатам экспериментов, проведенных на кроликах и крысах, основной орган-мишень токсического действия препарата – печень. По данным, полученным в исследовании на крысах, показано токсическое влияние на органы мужской репродуктивной системы (гипоплазия сперматогенного эпителия). Препарат в условиях проведенного эксперимента не оказал влияния на органы ЖКТ.

Заключение. Результаты показали, что препарат обладает благоприятным профилем безопасности, не уступающим показателям применяемых в клинической практике препаратов аналогичной фармакологической группы, и может рассматриваться как перспективный лекарственный кандидат для лечения ВИЧ-1 инфекции.

Ключевые слова: доклинические исследования; ВИЧ-1; VMU-2012-05; 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил; токсичность; однократное введение; многократное введение

Список сокращений: АЛТ – аланинаминотрансфераза; АО – акционерное общество; ВААРТ – высоко активная антиретровирусная терапия; АСТ – аспартатаминотрансфераза; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; БЭК – биоэтическая комиссия; ВТД – высшая терапевтическая доза; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ГЛФ – готовая лекарственная форма; ГОСТ – государственный стандарт; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; LD₅₀ – полуметальная доза; НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ННИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; НПО – научно-производственное объединение; ОТ – обратная транскриптаза; ПВ – протромбиновое время; РНК – рибонуклеиновая кислота; СПИД – синдром приобретенного иммунного дефицита; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЩФ – щелочная фосфатаза; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ЭКГ – электрокардиография; GLP – Good Laboratory Practice / надлежущая лабораторная практика; NOAEL – no-observed-adverse-effect level / уровень доз, не вызывающих нежелательных эффектов

Для цитирования: В.А. Вавилова, Е.В. Шекунова, Е.А. Джайн (Корсакова), В.Ю. Балабаньян, А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров. Экспериментальное изучение токсических свойств препарата VMU-2012-05 – оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):205-221. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-205-221

© В.А. Вавилова, Е.В. Шекунова, Е.А. Джайн (Корсакова), В.Ю. Балабаньян, А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, 2021

For citation: V.A. Vavilova, E.V. Shekunova, E.A. Jain (Korsakova), V.Yu. Balabanyan, A.A. Ozerov, M.N. Makarova, V.G. Makarov. Experimental study of toxic properties of VMU-2012-05 drug – original non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):205-221. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-205-221

EXPERIMENTAL STUDY OF TOXIC PROPERTIES OF VMU-2012-05 DRUG – ORIGINAL NON-NUCLEOSIDE INHIBITOR OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE

V.A. Vavilova¹, E.V. Shekunova¹, E.A. Jain (Korsakova)², V.Yu. Balabanyan²,
A.A. Ozerov³, M.N. Makarova¹, V.G. Makarov¹

¹ «Research-and manufacturing company «HOME OF PHARMACY» Joint Stock Company
Bldg. 245, 3, Zavodskaya St., Vil. Kuzmolovsky, Vsevolozhsky Dist., Leningrad Reg., Russia, 188663

² Moscow State University named after M.V. Lomonosov
Bldg. 1, 27, Lomonosov Ave., Moscow, Russia, 119991

³ Volgograd State Medical University
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: Ekaterina.korsa@gmail.com

Received 15 Feb 2021

Accepted 20 April 2021

Antiretroviral therapy is currently the main component of treatment for HIV patients. The development of new, more effective and safer drugs is an urgent task.

The aim of the research is to study the toxic properties of the finished dosage form (FDF) VMU-2012-05, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil) for the HIV-1 infection treatment in single and repeated enteral administrations.

Materials and methods. The study of toxic properties in single administrations was carried out on outbred mice; the drug was administered at the limiting dose of 2000 mg/kg (by reference to the active substance). For 90 days, in repeated daily administrations, the toxic properties were studied in rats of both sexes at the doses of 0 mg/kg (placebo), 9 mg/kg (1 HTD), 45 mg/kg (5 HTD), 90 mg/kg (10 HTD). The toxic properties were also studied in rabbits of both sexes within a 28-day administration at the doses of 0 mg/kg, 4 mg/kg (1 HTD), 20 mg/kg (5 HTD), 40 mg/kg (10 HTD); the recovery period 30 days. Clinical observations and examinations, body weight registrations, physiological and clinical laboratory studies were carried out during the experiment. At the end of the administration period (50% of animals) and at the end of the recovery period, a pathological examination was performed.

Results. The LD₅₀ of the drug is more than 2000 mg/kg. In the repeated administrations, the no observed adverse effect level (NOAEL) has been established. For rats, it is 9 mg/kg (1 HTD), for rabbits – 4 mg/kg (1 HTD). According to the results of the experiments carried out on rabbits and rats, the main target organ of the drug toxic effect is the liver. According to the data obtained in the study on rats, a toxic effect on the organs of the male reproductive system has been manifested (hypoplasia of the spermatogenic epithelium). Under the conditions of the experiment, the test drug had no effect on the gastrointestinal tract.

Conclusion. The results have manifested a favorable safety profile of the drug, not inferior to the ones of a similar pharmacological group used in clinical practice; it can be considered a promising drug candidate for the HIV-1 infection treatment.

Keywords: preclinical studies; HIV-1; VMU-2012-05; 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil; toxicity; single administration; repeated administration

Abbreviations: ALT – Alanine transaminase; JSC – joint-stock company / ZAO; HAART – Highly Active Anti-Retroviral Therapy; AST – aspartate aminotransferase; APTT – activated partial thromboplastin time; BEC – Bioethics committee; HTD – highest therapeutic dose; HIV – human immunodeficiency virus; FDF – finished dosage form; AUSS – All-Union state standard; DNA – Deoxyribonucleic Acid; GIT – gastrointestinal tract; LD₅₀ – half-lethal dose / 50% lethal dose; NRTI – Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NNRTI – Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; SPA – Scientific Production Association; RT – reverse transcriptase; PT – prothrombin time; RNA – ribonucleic acid; AIDS – acquired immune deficiency syndrome; HR – heart-rate; AP – alkaline phosphatase; EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid; ECG – electrocardiography; GLP – Good Laboratory Practice; NOAEL – no-observed-adverse-effect level

ВВЕДЕНИЕ

С начала 1980-х годов были достигнуты большие успехи в лечении ВИЧ-инфицированных пациентов. Многолетние усилия ученых привели к созданию препаратов различного механизма действия с антиретровирусной активностью, которые могут быть разделены на несколько групп [1]:

1. Нуклеозидные ингибиторы обратной транс-

криптазы (НИОТ) ВИЧ, конкурирующие с природными дезоксирибонуклеотидами за включение в растущую цепь вирусной ДНК с последующим нарушением процесса обратной транскрипции, то есть синтеза вирусной ДНК на матрице вирусной РНК (абакавир, эмтрицитабин, ламивудин; тенофовир, зидовудин) [2].

2. Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ), блокирующие обратную транс-

криптазу (ОТ) ВИЧ путем прямого связывания с ферментом (эфавиренц, этравирин, невирапин, рилпивирин) [3].

3. Ингибиторы слияния, связывающиеся с гликопротеидом gp41 ВИЧ и нарушающие связывание, слияния и проникновение вирионов в клетки (энфуртид) [4].

4. Ингибиторы протеаз, блокирующие протеолитическое расщепление белков-предшественников, которые необходимы для производства вирусных частиц (атазанавир, дарунавир, фосампренавир, ритонавир, саквинавир, типранавир) [5].

5. Антагонист CCR5-рецепторов, блокирующий рецептор CCR на Т-клетке и предотвращающий прикрепление вируса (Маравирок) [6].

6. Ингибиторы пост-прикрепления, представляющие собой моноклональные антитела, которые связывают CD4, препятствуя проникновению вируса в клетку (ибализумаб) [8].

7. Ингибиторы интегразы, блокирующие действие фермента и предотвращающие встраивание вирусного генома в ДНК клетки-хозяина (долутегравир, ралтегравир, элвитегравир, биктегравир) [7].

8. Фармакокинетические усилители, ингибирующие фермент CYP3A человека и повышающие концентрацию в плазме других антиретровирусных препаратов (кобицистат) [9].

В настоящее время основным методом лечения ВИЧ-инфекции является высоко активная антиретровирусная терапия (ВААРТ), подразумевающая одновременное использование нескольких веществ, нацеленных на разные этапы жизненного цикла ВИЧ [10]. Использование комбинации различных агентов обеспечивает синергический противовирусный эффект, тем самым повышая эффективность подавления репликации вируса. Правильно подобранная ВААРТ значительно увеличивает продолжительность и качество жизни пациентов [11]. В 1981–1982 годах, когда были зафиксированы первые случаи ВИЧ-инфекции, средняя продолжительность жизни человека с диагнозом СПИД составляла 1–2 года [12, 13]. Сегодня для ВИЧ-инфицированного в возрасте 20-ти с лишним лет, получающего ВААРТ, прогнозируемая продолжительность жизни составляет около 53 лет [14]. Согласно недавним отчетам Объединенной программы Организации Объединенных Наций по ВИЧ / СПИД (ЮНЭЙДС) 19,5 миллиона человек в настоящее время получают жизненно важную ВААРТ (что составляет 53% всех людей, живущих с ВИЧ в мире), а количество смертей от СПИД сократилось вдвое с 2005 г.¹

За последние четыре десятилетия внедрение указанных методов лечения столкнулось с рядом проблем, связанных с токсичностью лекарств, непо-

следовательным соблюдением сложных схем лечения, лекарственной устойчивостью, низкой приверженностью пациентов назначенному лечению и недостаточным доступом к препаратам определенных групп населения [15, 16]. Однако главными ограничениями применения существующих соединений являются образование в процессе терапии мутантных, устойчивых штаммов вируса, что делает необходимой постоянную смену препаратов, и побочные действия, в ряде случаев приводящие к преждевременной отмене лечения [17–19]. Таким образом, поиск новых соединений, обладающих антиретровирусной активностью как в отношении дикого штамма, так и в отношении резистентных изолятов вируса, представляет крайне важное направление современной вирусологии и медицинской химии.

С появлением новых классов ННИОТ пиримидиновой природы, содержащих сложные по строению двудерные ароматические заместители, могут быть связаны перспективы создания новых оригинальных препаратов для терапии ВИЧ-1 инфекции. Некоторые представители пиримидиновых производных, имеющие фрагменты дифенилового эфира, дифенилметана или бензофенона в боковой цепи, продемонстрировали активность в отношении дикого и мутантных штаммов ВИЧ-1 в наномолярном диапазоне [20]. Показано, что пиримидиновые производные бензофенона проявляют анти-ВИЧ-1 активность *in vitro*, превосходящую активность невирапина и не уступающую активности эфавиренза [21]. Представители данного класса соединений по уровню противовирусного действия *in vitro* в среднем в 5–10 раз превосходят самые активные соединения-аналоги при отсутствии у новых веществ цитотоксических свойств во всем диапазоне изученных концентраций (0,001–100 μM) [22].

В проведенных ранее исследованиях показано, что представитель указанного класса соединений, 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, проявляет высокую активность в отношении ВИЧ-1 в исследованиях *in vitro*, в 2,5 раз превосходит невирапин и не уступает эфавирензу. Изучение острой токсичности субстанции на крысах и мышах показало, что LD_{50} соединения более 2000 мг/кг при пероральном введении, что в совокупности с полученными ранее данными об эффективности субстанции в отношении ВИЧ-1 свидетельствует о перспективности применения этого соединения в терапии ВИЧ. Была разработана готовая лекарственная форма для перорального применения, содержащая в качестве активного вещества 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил.

Одним из основных этапов разработки лекарственного кандидата после установления и доказательства его фармакологической эффективности и механизма действия, является оценка его безо-

¹ UNAIDS. Press release. 2017. [Электронный ресурс]. URL: http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2017/july/20170720_PR_Global_AIDS_Update_2017

пасности. В связи с этим было проведено изучение токсических свойств готовой лекарственной формы лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона при однократном и многократном применении. В соответствии с современными требованиями к доклиническим исследованиям безопасности², эксперименты были проведены на нескольких видах лабораторных животных при способе введения, аналогичном планируемому для применения в клинической практике.

ЦЕЛЬ. Исследование токсических свойств готовой лекарственной формы (ГЛФ) препарата VMU-2012-05 – нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил) для лечения ВИЧ-1 инфекции (далее по тексту – тестируемый объект) при однократном и многократном энтеральном введении на мышах, крысах и кроликах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Эксперименты по изучению токсических свойств ГЛФ VMU-2012-05 при однократном введении проводили на половозрелых самцах и самках беспородных мышей возраста 9–11 недель (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Изучение токсических свойств при многократном введении проводили на половозрелых самцах и самках беспородных крыс возраста 10–12 недель (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») и на половозрелых самцах и самках кроликов породы «Белый Великан» возраста 2,5–3,5 месяцев (крестьянское фермерское хозяйство «Нера»).

Перед началом каждого эксперимента проведено заседание биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Проведение экспериментов единогласно одобрено членами комиссии (протоколы БЭК №5.3/18 от 17 января 2018 г. и БЭК № 6.3/18 от 17 января 2018 г.).

Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп, отбор животных был проведен при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (Постановление Главного государственного санитарного врача

РФ от 29 августа 2014 г. № 51). Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды. Световой режим составил 12 часов света и 12 часов темноты.

Животные получали корм для содержания лабораторных животных, изготовленный по ГОСТ Р50258-92 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия». Корм и воду давали *ad libitum*.

Дизайн исследования

Планирование и проведение всей работы осуществлялось в строгом соответствии с требованиями МЗ РФ и международными стандартами в области доклинического изучения безопасности новых фармакологических средств – системы GLP (Good Laboratory Practice)^{3,4}.

Во всех описанных ниже исследованиях использовали ГЛФ следующего состава:

Активное вещество: 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил – 50 мг

Вспомогательные вещества: повидон – 200 мг; лактозы моногидрат – 59 мг; микрокристаллическая целлюлоза – 29 мг; кросповидон – 40 мг; карбоксиметилкрахмал натрия – 16 мг; кремния диоксид коллоидный безводный – 4 мг; магния стеарат – 2 мг

Контрольные животные получали плацебо (только вспомогательные вещества).

Изучение токсических свойств при однократном введении на мышах

Результаты ранее проведенных исследований по изучению острой токсичности фармацевтической субстанции лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона показали, что ЛД₅₀ субстанции при внутрижелудочном введении крысам и мышам – более 2000 мг/кг. При введении препарата в дозе 2000 мг/кг гибели крыс и мышей не было зафиксировано, выраженных признаков интоксикации не отмечено. С учетом имеющихся данных о низкой токсичности субстанции, в соответствии с рекомендациями^{5,6}, а также в соответствии с принципами «3Rs», острая токсичность ГЛФ тестируемого

³ Межгосударственный стандарт РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115791>.

⁴ Решение Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 года № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» [Электронный ресурс]. URL: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0081/>.

⁵ Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure No 420. OECD (2001) [Электронный ресурс]. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en

⁶ Межгосударственный стандарт ГОСТ 32296-2013 «Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы». [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200111000>

² Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 56701-2015 от 01.07.2016 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств» [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200126923>.

объекта (таблетки для приема внутрь, 50 мг) была изучена при введении в лимитирующей дозе 2000 мг/кг на мышах. Мыши (5 самцов и 5 самок) получали внутрижелудочно с помощью атравматичного зонда суспензию (в 1% растворе крахмала) ГЛФ препарата в дозе 2000 мг/кг (по активному веществу), 5 самцов и 5 самок – получали суспензию плацебо ГЛФ тестируемого объекта (контрольная группа). Общий объем введения составил 1,6 мл на животное массой 20 г. Поскольку общий объем превышал допустимый для однократного в/ж введения мышам⁷, суспензии вводили дробно (по 0,4 мл на животное массой 20 г), с интервалами между введениями не менее 30 мин.

Общий период наблюдения за животными составил 14 дней. В ходе эксперимента с целью регистрации признаков интоксикации проводили клиническое наблюдение (в течение 4-х ч после введения препаратов), далее ежедневно и еженедельно осуществляли подробный клинический осмотр/взвешивание мышей проводили непосредственно до введения, через сутки после введения, на 7-й и 15-й дни эксперимента. Для регистрации возможного отсроченного влияния препарата на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность животных на 14-й день эксперимента проводили тест «Открытое поле». Эвтаназию осуществляли на 15-й день с помощью CO₂ – камеры. Последующее патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов. Было проведено исследование состояния грудной и брюшной полости и макроскопическое исследование внутренних органов. Проведено взвешивание сердца, тимуса, печени, селезенки, почек, головного мозга, семенников.

Изучение токсических свойств при многократном введении на крысах и кроликах

Согласно проекту инструкции по медицинскому применению препарата VMU-2012-05, разработанной на основании изучения фармакологической активности, механизма действия и с учетом опыта клинического применения препаратов аналогичной фармакологической группы и сходного механизма действия, клиническая высшая терапевтическая доза (ВТД) препарата предположительно составляет 100 мг в день. Для человека со средней массой тела 60 кг – 1,7 мг/кг. С учетом коэффициентов межвидового пересчета доз⁸, ВТД для крысы составит 9 мг/кг, для кролика – 4 мг/кг. В данном исследовании тестируемый объект вводили крысам внутрижелудочно в трех дозах: 9 мг/кг (1 ВТД); 45 мг/кг (5 ВТД); 90 мг/кг (10 ВТД). Непосредственно перед введениями готовили суспензию препарата в 1% растворе крахмала с

концентрацией активного вещества 0,94 мг/мл, 4,69 мг/мл, 9,38 мг/мл соответственно. Объем разового введения составил 2,4 мл на крысу массой 250 г. Кроликам препарат вводили перорально в дозах 4 мг/кг (1 ВТД), 20 мг/кг (5 ВТД), 40 мг/кг (10 ВТД). Непосредственно перед введениями готовили суспензию ГЛФ в 1% растворе крахмала с концентрацией активного вещества 2,79 мг/мл, 13,95 мг/мл, 27,91 мг/мл соответственно. Суспензию вводили в объеме 1,45 мл на 1 кг массы тела. Контрольные животные получали плацебо в объеме, соответствующем объему введения суспензий тестируемого объекта. В каждой из 4-х групп было по 16 самцов и 16 самок крыс и по 8 самцов и 8 самок кроликов. Период введения крысам составил 90 дней, кроликам – 28 дней. На 91-й день эксперимента (крысы) или на 29-й день (кролики) эвтаназию подвергали 50% животных каждой группы (основные группы), эвтаназию оставшихся животных проводили через 30 дней отсроченного наблюдения (группы отсроченного наблюдения).

В ходе эксперимента ежедневно в течение 1 ч после введения препарата и в восстановительный период осуществляли клиническое наблюдение; еженедельно проводили подробный клинический осмотр, регистрировали массу тела животных. У крыс для оценки возможного влияния препарата на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность на 30-й и 90-й дни эксперимента (для животных основных групп) и на 120-й день (для животных групп отсроченного наблюдения) проводили тест «Открытое поле». На 30-й и 90-й дни (для животных основных групп) и на 120-й день (для животных групп отсроченного наблюдения) проводили клинический анализ крови, а также оценивали показатели системы гемостаза: протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). У кроликов кровь забирали дважды: на 28-й день (у всех животных) и на 56-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Кровь забирали из хвостовой вены (крысы) или краевой вены уха (кролики). Кровь для клинического анализа отбирали в пробирки с ЭДТА. С использованием гематологического анализатора «ABACUS JuniorVet» (Австрия) в цельной крови определяли количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов, лейкоцитарную формулу. Кровь для определения показателей гемостаза отбирали в пробирки с цитратом натрия, далее центрифугировали 15 мин для получения плазмы. Плазму переносили во вторичные пробирки. Показатели гемостаза определяли с помощью коагулометра АПГ4-02-П. Протромбиновое время (ПВ) определяли с использованием набора реагентов «Техпластин-тест», Технология-стандарт, Россия. АЧТВ определяли с помощью набора реагентов «АПТВ-Эл-тест», Технология-стандарт, Россия. Биохимические показатели крови у крыс определяли на 30-й и 90-й дни (для живот-

⁷ Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств // ФГБУ «НЦЭМСП». Под редакцией Миронова А.Н. Том 1. 2012. 942 с.

⁸ Там же.

ных основных групп) и на 120-й день (для животных групп отсроченного наблюдения). У кроликов кровь забирали дважды: на 28-й день (у всех животных) и на 56-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Для исследования использовали кровь, которую отбирали в пробирки без антикоагулянта. Для получения плазмы кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Полученную плазму перенесли во вторичные пробирки. Образцы исследовали с помощью анализатора «А-25» (Испания) с использованием реагентов фирмы BioSystems (Испания) и в соответствии с инструкциями производителя. Оцениваемые параметры: аминотрансферазы (АЛТ и АСТ), креатинин, мочевины, альбумин, щелочная фосфатаза (ЩФ), общий белок, триглицериды, холестерин, отношение альбумины/глобулины (расчетные значения), общий билирубин, глобулин (расчетные значения), глюкоза.

Регистрацию ЭКГ у крыс проводили на 29-й и 89-й дни у животных основных групп, и на 119-й у животных групп отсроченного наблюдения; у кроликов на 26-й день (50% животных) и на 54-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Для регистрации ЭКГ животное предварительно наркотизировали смесью Золетила®+Ксилы® в дозах 25 мг/кг + 5 мг/кг, внутримышечно (крысы) и 5 мг/кг + 2 мг/кг, внутривенно (кролики), фиксировали на операционном столике. Регистрацию ЭКГ проводили с помощью компьютерного электрокардиографа для ветеринарии «Поли-спектр-8В». ЭКГ записывали в отведении II. Оценивались следующие показатели: частота сердечных сокращений (ЧСС), интервал RR (мс), P (мс), PQ (мс), QRS (мс), QT (мс).

Исследование физико-химического состава мочи проводили с помощью диагностических тест-полосок «LabStripurinalysis REF ANA-9910» и анализатора «DocURader 2» у крыс на 28-й и 88-й дни (основные группы) и на 118-й день (группы отсроченного наблюдения), у кроликов на 27-й день (50% животных, основные группы) и на 55-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Мочу собирали с помощью метаболических клеток, куда помещали животное на 4 ч. Перед помещением в метаболическую клетку крысы получали питьевую воду в/ж в объеме 10 мл/кг, кролики помещались в метаболические клетки без предварительной водной нагрузки. Определяемые параметры: глюкоза, pH, билирубин; уробилиноген, белок, удельный вес, лейкоциты, эритроциты, кетоны, нитриты.

Эвтаназию крыс осуществляли на 91-й день (животные основных групп) и на 121-й день (животные групп отсроченного наблюдения) с помощью CO₂-камеры. Кроликов подвергали эвтаназии на 29-й день (50% животных) и на 57-й день. Эвтаназию кроликов осуществляли посредством передозировки анестетиком (Золетил®; 25 мг/кг; внутривенно). После эвтаназии животные были тщательно обследованы

на предмет внешних патологических признаков. Органы, извлеченные при некропии, были взвешены (сердце, тимус, печень, селезенка, легкие с трахеей, почки, надпочечники, головной мозг, семенники/яичники). Рассчитывали массовые коэффициенты органов (отношение массы органа к массе тела, выраженное в процентах).

Проведено гистологическое исследование следующих органов: аорта, сердце, трахея, лёгкие с бронхами, тимус, желудок, тонкая кишка, толстая кишка, поджелудочная железа, печень, селезенка, почки, мочевой пузырь, семенники (самцы), яичники (самки), подчелюстные лимфатические узлы, щитовидная железа, головной мозг.

Для оценки местнораздражающего действия препаратов при проведении процедуры некропии были визуально оценены отклонения во внешнем виде органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также проведена их гистологическая оценка.

Анализ данных

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Проверка на соответствие закону нормального распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением (post-hoc) с использованием теста Тьюки (post-hoc Tukey's). В случае ненормально распределенных данных использовали критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis) с дальнейшим применением непараметрического метода средних рангов для множественных сравнений в случае обнаружения достоверного влияния исследуемого фактора. Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Statistica 10.0. (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение токсических свойств на мышцах при однократном введении

При введении препарата в дозе 2000 мг/кг гибели животных не зарегистрировано.

На начало эксперимента масса тела самок мышшей составляла 19–21 г, самцов – 21–23 г, в течение 14-ти дней после введения отмечалась положительная динамика массы тела как в группе контроля, так и в группах самцов и самок, получивших VMU-2012-05. У всех животных после введения последней порции, как тестируемого объекта, так и плацебо наблюдали диарею. Спустя 5 часов состояние животных нормализовалось и далее на протяжении 14 дней наблю-

дения каких-либо отклонений от нормы не фиксировали.

Доза 2000 мг/кг может рассматриваться как максимально переносимая, так как при введении данной дозы гибели животных и/или выраженных признаков интоксикации не наблюдали.

Изучение токсических свойств при многократном введении. Влияние на общее состояние, результаты функциональных тестов

На протяжении всего эксперимента зарегистрировано три случая гибели самцов крыс. Один случай в группе, получавшей тестируемый препарат в дозе 45 мг/кг (51-й день эксперимента), и два – в дозе 90 мг/кг (на 36-й и 48-й дни). За 3–4 дня до гибели у этих животных отмечали угнетение поведения, взъерошенность шерсти, за день до гибели к наблюдаемым изменениям добавилась одышка и снижение тонуса мускулатуры. У погибших животных выявлены отек и геморрагическое пропитывание ткани легких, отек и умеренное полнокровие сосудов головного мозга, на основании чего признано, что непосредственной причиной смерти животных стала острая сердечная недостаточность. Общее состояние и поведенческие реакции остальных животных, получавших препарат, как в период введения, так и в период отсроченного наблюдения не отличались от показателей контрольной группы. Отсутствие влияния препарата на общее состояние животных подтвердилось и при проведении теста «Открытое поле»: изменений в индивидуальном поведении животных, получавших препарат, по сравнению с группой контроля, отмечено не было. У кроликов также никаких отклонений от нормы по результатам клинических осмотров и наблюдений за весь эксперимент не отмечено.

Масса тела крыс на начало эксперимента составляла 190–200 г (самцы) и 178–185 г (самки), масса тела кроликов 2800–3200 г (самцы) и 2300–2600 г (самки). Некоторое замедление положительной динамики массы тела к окончанию периода введения наблюдалось только у самцов крыс, получавших препарат в максимальной исследованной дозе. К 91-му дню масса тела животных этой группы была статистически значимо снижена по сравнению с группой контроля, при этом снижение составляло не более 10% от показателей контроля (таблица 1). У самок крыс так же, как и у кроликов, за весь период эксперимента влияния препарата на динамику массы тела не выявлено (таблицы 2 и 3).

При оценке индивидуального поведения крыс в тесте «Открытое поле» влияния тестируемого препарата на оцениваемые показатели не обнаружено ни на 30-й, 90-й (таблицы 4 и 5), ни на 120-й дни эксперимента.

В ходе эксперимента было проведена оценка функционального состояния сердечно-сосудистой

системы по данным ЭКГ. Ни у крыс, ни у кроликов, получавших препарат, изменений параметров ЭКГ по сравнению с контрольной группой не выявлено (таблицы 6, 7 и 8).

Результаты клинично-лабораторных исследований

Результаты анализа физико-химических свойств мочи показали, что в группе самок кроликов, получавшей тестируемый препарат в максимальной исследованной дозе, наблюдалось снижение уровня рН мочи (до 5,5) по сравнению с внутрилабораторными нормами (рН от 7 до 9)⁹. После периода отсроченного наблюдения снижение уровня рН мочи (до 6,3) по сравнению с физиологической нормой отмечалось в группах самок кроликов, получавших тестируемый препарат в средней и максимальной дозах. В остальных группах кроликов и крыс никаких отклонений от нормы не обнаружено, как после курса введения, так и после периода отсроченного наблюдения.

По результатам клинического анализа крови на 30-й и 90-й дни (таблица 9) эксперимента в группах самок крыс, получавших препарат в дозах 45 мг/кг и 90 мг/кг, наблюдалось значимое увеличение количества тромбоцитов, на 90-й день в этих группах отмечено увеличение количества лейкоцитов по сравнению с группой контроля (таблица 9). В группе максимальной дозы наблюдался сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону снижения процентного содержания гранулоцитов и увеличения лимфоцитов (по сравнению с контролем). При этом все выявленные изменения по лейкоцитам и лейкоцитарной формуле не выходили за границы установленных внутрилабораторных норм для самок беспородных крыс (лейкоциты $5,5-18,0 \times 10^9/\text{л}$, процентное содержание лимфоцитов 59–87%, процентное содержание гранулоцитов – 13,5–37,6%, количество тромбоцитов $348-950 \times 10^9/\text{л}$). У самок кроликов групп средней и максимальной доз по окончании введения препарата также обнаружено увеличение процентного содержания лимфоцитов по отношению к группе контроля, отмечена тенденция к снижению процентного количества гранулоцитов (таблица 10), изменения не выходили за рамки внутрилабораторных норм для кроликов (процентное содержание лимфоцитов 30–70%, гранулоцитов – 20–58%). Других отличий от группы контроля или отклонений от физиологической нормы ни у крыс, ни у кроликов за весь период введения препарата не выявлено. Отсроченных эффектов также не установлено.

По результатам анализа параметров системы гемостаза клинически значимых эффектов препарата на ПВ и АЧТВ у кроликов и крыс не установлено (таблицы 11–14).

⁹ Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Под. ред. Макарова В.Г. и Макаровой М.Н. – СПб, 2013. – 116 с.

Таблица 1 – Влияние VMU-2012-05 на массу тела самцов крыс в период 90-дневного введения препарата, $M \pm SEM$, г

День исследования	Контроль	VMU-2012-05		
		9 мг/кг	45 мг/кг	90 мг/кг
1-й	193,3±3,05 n=16	193,3±3,35 n=16	193,3±3,23 n=16	193,2±3,91 n=16
7-й	222,3±3,38* n=16	223,6±3,77* n=16	220,3±4,56* n=16	211,8±4,95 n=16
14-й	256,1±4,15* n=16	251,6±3,59* n=16	248,3±4,08* n=16	243,1±4,49* n=16
21-й	286,0±4,91* n=16	275,9±3,62* n=16	271,9±3,77* n=16	267,8±4,33* n=16
28-й	320,6±5,65* n=16	303,0±4,44* n=16	306,7±5,05* n=16	305,7±4,71* n=16
35-й	302,1±4,59* n=16	286,7±5,73* n=16	284,2±5,45* n=16	281,6±4,27* n=16
42-й	337,1±6,99* n=16	316,1±6,58* n=16	309,3±5,63* n=16	310,9±5,48* n=15
49-й	373,2±9,09* n=16	348,2±7,04* n=16	343,3±6,95* n=16	344,1±6,10* n=14
56-й	372,7±8,61* n=16	345,7±7,07* n=16	339,2±6,81* n=15	344,6±6,25* n=14
63-й	380,3±9,03* n=16	351,2±6,90* n=16	346,3±7,63* n=15	355,4±6,88* n=14
70-й	392,6±9,78* n=16	361,1±7,13* n=16	355,9±8,52* n=15	359,0±6,97* n=14
77-й	401,9±9,85* n=16	369,6±7,06* n=16	366,5±8,50* n=15	374,3±7,15* n=14
84-й	407,8±10,22* n=16	374,6±6,77* n=16	369,9±8,26* n=15	379,3±6,61* n=14
91-й	425,6±11,44* n=16	389,6±7,28* n=16	383,7±9,77*# n=15	385,5±6,89*# n=14

Примечания: * – $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем в соответствующей группе, критерий Тьюки;
– $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, критерий Тьюки

Таблица 2 – Влияние VMU-2012-05 на массу тела самок крыс в период 90-дневного введения препарата, $M \pm SEM$, n=16, г

День исследования	Контроль	VMU-2012-05		
		9 мг/кг	45 мг/кг	90 мг/кг
1-й	180,4±1,93	180,7±1,78	180,2±2,16	180,8±2,25
7-й	188,8±3,09	191,1±1,91	192,3±2,83	194,6±2,45
14-й	199,7±3,64*	202,3±2,64*	200,4±2,99*	203,0±2,96*
21-й	207,1±3,76*	213,7±3,51*	212,1±3,24*	221,0±5,06*
28-й	231,4±4,30*	236,3±2,84*	234,6±3,65*	225,3±6,76*
35-й	219,6±4,12*	224,2±2,98*	225,2±3,73*	222,5±4,22*
42-й	225,9±4,64*	232,9±3,46*	230,3±3,49*	233,6±4,94*
49-й	241,3±5,53*	245,4±4,07*	248,1±4,68*	245,9±4,78*
56-й	235,9±5,00*	245,8±5,00*	247,4±4,27*	239,6±5,25*
63-й	233,1±5,04*	242,6±5,21*	243,3±4,29*	236,6±4,88*
70-й	238,7±5,17*	243,9±4,75*	248,5±4,14*	242,3±4,82*
77-й	242,6±5,56*	250,1±5,02*	255,9±4,92*	246,7±4,85*
84-й	241,3±5,89*	253,1±5,86*	254,5±4,90*	244,6±4,94*
91-й	257,1±6,26*	265,8±5,92*	269,6±5,39*	257,2±4,50*

Примечание: * – $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем в соответствующей группе, критерий Тьюки

Таблица 3 – Влияние VMU-2012-05 на массу тела самцов и самок кроликов в период 28-дневного введения препаратов, М±SEM, n=8, г

День исследования	Пол	Контроль	VMU-2012-05		
			4 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг
1-й	Самцы	3120,6±50,54	2886,3±128,79	2843,8±93,84	2895,0±112,83
	Самки	2443,1±50,87	2591,3±89,16	2516,9±56,50	2540,6±47,70
7-й	Самцы	3248,8±59,83*	2982,5±136,27	2990,6±85,48*	2966,9±112,12
	Самки	2495,6±51,05	2678,1±94,76	2568,8±51,27	2620,0±49,78
14-й	Самцы	3268,8±52,46*	3073,1±129,90*	3088,1±105,08*	3078,8±110,82*
	Самки	2524,4±48,93	2737,5±90,28*	2591,3±61,17	2677,5±49,31*
21-й	Самцы	3324,4±51,98*	3122,5±132,78*	3144,4±104,69*	3148,8±107,20*
	Самки	2657,5±35,98*	2767,5±90,48*	2626,3±57,65*	2708,1±48,91*
29-й	Самцы	3383,1±61,68*	3311,3±141,92*	3281,3±121,92*	3277,5±102,93*
	Самки	2891,9±43,31*	2917,5±91,68*	2830,0±54,18*	2817,5±54,62*

Примечание: * – $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем в соответствующей группе, критерий Тьюки.

Таблица 4 – Локомоторная активность крыс в тесте «Открытое поле» на 30-й и 90-й дни многократного внутрижелудочного введения VMU-2012-05, М±SEM, n=16

Группы	Доза, мг/кг	Количество посещенных квадратов		Количество пристеночных стоек	
		30-й день	90-й день	30-й день	90-й день
Контроль	0	27,5±1,54	27,6±2,87	12,8±0,78	9,9±1,16
	9	28,1±1,53	29,8±3,19	14,0±0,97	10,4±1,23
VMU-2012-05	45	26,8±1,16	28,6±2,24	13,1±1,05	10,9±1,50
	90	24,1±1,49	27,5±2,48 [§]	11,8±0,91	11,0±1,14 [§]

Примечание: [§] – количество животных в группе n=15.

Таблица 5 – Активность крыс в тесте «Открытое поле» на 30-й и 90-й дни многократного внутрижелудочного введения VMU-2012-05, Ме (Q₁; Q₃)

День	Группы	Доза, мг/кг	n	Кол-во центровых посещений	Кол-во свободных стоек	Кол-во груминга	Кол-во уринаций	Кол-во дефекаций
9	16	0,5 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)		
VMU-2012-05	45	16	1,0 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;2,0)	
	90	16	0,5 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;0,0)	1,0 (0,0;2,5)	0,0 (0,0;0,5)	1,0 (0,0;2,0)	
90-й	Контроль	0	16	0,5 (0,0;1,0)	1,0 (1,0;4,5)	1,5 (0,5;3,5)	0,5 (0,0;3,0)	0,0 (0,0;1,0)
		9	16	1,0 (0,0;2,5)	1,0 (0,0;3,5)	1,0 (0,0;2,5)	2,0 (0,0;3,5)	0,0 (0,0;0,0)
	VMU-2012-05	45	16	0,5 (0,0;1,0)	1,0 (0,5;3,0)	0,0 (0,0;2,5)	1,0 (0,0;6,5)	0,0 (0,0;0,0)
		90	15	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;3,0)	1,0 (0,0;1,0)	2,0 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;0,0)

Таблица 6 – Влияние VMU-2012-05 на показатели работы сердца крыс на 29-й день эксперимента, М±SEM, n=8

Группы	Доза мг/кг	Пол	Показатели					
			ЧСС уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Контроль	0	Самцы	254,9±9,2	237,1±8,7	45,8±2,7	57,0±2,4	63,0±2,5	136,8±6,6
		Самки	234,4±14,1	263,8±18,6	42,3±0,9	57,3±3,5	65,1±2,9	131,0±8,2
	9	Самцы	280,3±6,2	214,9±4,8	41,9±0,4	53,9±2,2	69,5±2,4	142,9±9,9
		Самки	264,8±13,4	219,6±10,7	37,6±1,9	49,0±1,4	75,1±2,9	149,0±8,5
VMU-2012-05	45	Самцы	280,3±15,9	215,1±11,3	39,9±0,8	50,4±2,6	63,4±2,2	146,0±11,0
		Самки	235,5±5,1	255,5±5,5	42,3±0,7	53,4±1,9	67,1±4,1	125,8±3,1
	90	Самцы	242,4±11,1	242,3±15,2	45,0±4,4	57,8±4,5	63,8±1,5	128,1±4,9
		Самки	248,5±8,4	243,6±8,3	42,4±1,5	50,6±1,5	64,0±1,4	152,6±8,9

Таблица 7 – Влияние VMU-2012-05 на показатели работы сердца крыс на 89-й день эксперимента, M±SEM

Группы	Доза мг/кг	Пол	n	Показатели					
				ЧСС уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Контроль	0	Самцы	8	278,3±5,1	215,3±3,4	41,8±0,8	53,1±2,1	62,1±6,5	139,9±9,9
		Самки	8	304,8±7,9	198,1±4,9	47,3±2,6	56,0±2,4	65,4±2,9	154,4±9,3
VMU-2012-05	9	Самцы	8	294,8±5,8	204,3±3,8	42,0±1,0	52,1±2,5	64,5±3,0	139,4±6,7
		Самки	8	306,5±5,7	196,3±3,6	43,9±1,9	51,5±2,6	73,5±4,6	146,0±7,6
	45	Самцы	8	297,8±5,9	202,1±4,3	39,0±2,0	52,3±1,2	58,4±3,3	134,4±10,2
		Самки	8	298,8±10,6	202,5±6,3	40,8±0,9	50,1±0,7	67,4±4,1	150,5±9,9
	90	Самцы	7	284,6±14,2	215,0±13,3	48,6±4,2	57,3±2,9	63,0±4,1	136,4±7,4
		Самки	8	296,1±6,7	203,4±4,5	49,0±5,2	59,9±5,1	71,8±4,4	133,8±7,7

Таблица 8 – Влияние VMU-2012-05 на показатели работы сердца кроликов обоих полов на 26-й день эксперимента, M±SEM, n=4

Группы	Доза мг/кг	Пол	Показатели					
			ЧСС уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Контроль	0	Самцы	274,8±21,3	222,3±16,2	45,5±4,8	71,3±6,2	142,5±4,1	170,8±11,1
		Самки	187,5±10,5	322,5±18,7	59,0±6,4	77,0±2,5	158,8±2,0	156,8±8,1
VMU-2012-05	4	Самцы	300,0±9,3	200,8±5,9	55,8±7,7	70,3±7,5	139,0±7,7	163,3±11,0
		Самки	208,8±6,1	288,5±8,7	51,5±2,5	82,0±4,7	146,0±12,2	192,3±14,4
	20	Самцы	251,3±24,9	246,3±25,2	46,5±10,1	70,8±6,2	168,8±20,4	229,5±27,6
		Самки	200,3±9,7	302,3±14,9	49,5±1,0	73,0±2,6	159,0±5,2	190,5±10,5
	40	Самцы	267,3±7,0	225,0±6,2	52,0±3,7	66,3±4,3	166,8±3,3	190,0±8,8
		Самки	182,3±6,9	330,0±12,1	49,3±2,3	79,0±2,9	156,5±3,7	206,3±23,5

Таблица 9 – Влияние тестируемого препарата на показатели клинического анализа крови самок крыс на 30-й день эксперимента, M±SEM, n=8

Исследуемые показатели	Контроль	VMU-2012-05		
		9 мг/кг	45 мг/кг	90 мг/кг
WBC Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,6±0,48	9,6±0,40	13,1±1,30*	12,3±1,18*
LYM Лимфоциты, %	70,9±2,54	74,2±1,41	73,1±1,84	79,3±2,28*
MON Моноциты, %	5,0±0,49	4,8±0,28	6,9±0,44	6,3±0,83
GRA Гранулоциты, %	24,1±2,18	20,9±1,18	20,1±1,98	14,4±1,68*
RBC Эритроциты, 10 ¹² /л	7,6±0,21	7,4±0,08	7,6±0,12	7,0±0,41
HGB Гемоглобин, г/л	153,5±1,95	148,1±1,36	149,1±2,81	137,9±8,18
HCT Гематокрит, %	42,0±0,60	40,4±0,35	41,3±0,55	38,5±1,79
PLT Тромбоциты, 10 ⁹ /л	748,0±30,84	865,3±47,25	969,9±40,58*	989,5±57,61*

Примечание: * – p<0,05, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки)

Таблица 10 – Влияние тестируемого препарата на показатели клинического анализа крови самок кроликов, 28-й день эксперимента, M±SEM, n=8

Исследуемые показатели	Контроль	VMU-2012-05		
		4 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг
WBC Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,2±0,29	7,6±0,60	6,5±0,51	7,9±0,46
LYM Лимфоциты, %	61,1±1,54	61,1±2,19	67,6±1,72	67,9±2,54*
MON Моноциты, %	3,1±0,25	3,2±0,17	2,6±0,18	3,1±0,15
GRA Гранулоциты, %	35,9±1,61	35,7±2,19	29,5±1,48	29,2±2,50
RBC Эритроциты, 10 ¹² /л	6,1±0,15	6,2±0,25	5,9±0,21	6,0±0,11
HGB Гемоглобин, г/л	130,9±2,33	133,4±5,98	126,9±3,42	127,6±2,38
HCT Гематокрит, %	43,5±0,64	43,2±1,41	43,0±1,04	43,3±0,82
PLT Тромбоциты, 10 ⁹ /л	302,5±17,76	320,3±30,74	289,0±22,75	304,4±32,31

Примечание: * – p<0,05, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки)

Таблица 11 – Результаты определения протромбинового времени (ПВ) у крыс, с, М±SEM

Группы	Доза, мг/кг	30-й день эксперимента		90-й день эксперимента		120-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	0	21,6±0,37 n=8	22,7±0,16 n=8	18,4±0,25 n=8	20,0±0,35 n=8	17,3±0,27 n=8	17,6±0,27 n=8
	9	21,8±0,19 n=8	22,6±0,31 n=8	17,7±0,41 n=8	18,8±0,45 n=8	18,0±0,50 n=8	16,9±0,68 n=8
VMU-2012-05	45	21,4±0,50 n=8	22,3±0,51 n=8	17,4±0,73 n=8	19,0±0,28 n=8	18,3±0,86 n=7	16,0±0,40 n=8
	90	22,5±0,19 n=8	20,0±0,96* n=8	17,3±0,54 n=7	19,8±0,41 n=8	20,1±0,72* n=7	16,1±0,43 n=8

Примечание: * – статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, p<0,05

Таблица 12 – Результаты определения протромбинового времени (ПВ) у кроликов, с, М±SEM

Группы	Доза, мг/кг	28-й день эксперимента		56-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	0	8,3±0,17 n=8	8,7±0,37 n=8	8,6±0,25 n=4	8,5±0,08 n=4
	4	8,1±0,20 n=8	7,9±0,26 n=8	8,0±0,18 n=4	8,0±0,16 n=4
VMU-2012-05	20	7,4±0,17* n=8	7,5±0,14 n=8	8,3±0,20 n=4	8,1±0,19 n=4
	40	7,5±0,13* n=8	7,2±0,42* n=8	7,9±0,05 n=4	7,7±0,12* n=4

Примечание: * – статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, p<0,05

Таблица 13 – Результаты определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) у крыс, с, М±SEM

Группы	Доза, мг/кг	30-й день эксперимента		90-й день эксперимента		120-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	0	16,2±0,67 n=8	17,6±0,89 n=8	12,8±0,42 n=8	13,3±0,94 n=8	12,2±0,33 n=8	14,2±1,06 n=8
	9	13,8±0,66 n=8	15,5±1,65 n=8	12,7±0,47 n=8	16,2±0,51* n=8	13,7±1,05 n=8	12,3±0,50 n=8
VMU-2012-05	45	13,8±0,43 n=8	18,8±0,85 n=8	12,8±0,65 n=8	14,5±0,72 n=8	13,5±0,76 n=8	12,2±0,30 n=8
	90	16,9±0,75 n=8	17,7±0,62 n=8	15,4±0,92* n=7	16,2±0,33* n=8	13,0±0,62 n=7	12,1±0,57 n=8

Примечание: * – статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, p<0,05

Таблица 14 – Результаты определения у кроликов активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), с, М±SEM

Группы	Доза, мг/кг	28-й день эксперимента		56-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	0	15,2±0,35 n=8	15,6±0,44 n=8	18,5±0,69 n=4	18,4±0,47 n=4
	4	15,1±0,72 n=8	16,8±0,61 n=8	16,9±1,16 n=4	17,4±0,51 n=4
VMU-2012-05	20	16,1±0,72 n=8	17,2±1,04 n=8	17,7±1,36 n=4	15,7±0,63* n=4
	40	17,1±0,87 n=8	17,0±0,78 n=8	16,8±1,08 n=4	15,7±0,59* n=4

Примечание: * – статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, p<0,05

Таблица 15 – Влияние VMU-2012-05 на биохимические показатели крови крыс, М±SEM, n=8#

Пол	Доза, мг/кг	АЛТ, Ед/л			АСТ, Ед/л			ЩФ, Ед/л		
		День эксперимента								
		30	91	121	30	91	121	30	91	121
Самцы	0	42±3,4	66±3,3	57±2,5	94±7,9	103±8,0	128±8,7	124±14,8	152±11,3	113±9,4
Самки	0	36±5,1	57±5,0	53±2,9	86±2,2	115±4,0	139±5,6	96±7,1	134±12,0	100±4,6
Самцы	9	42±4,2	67±2,7	61±4,1	83,9±8,07	107±6,8	135±6,5	111±14,8	153±12,6	120±9,1
Самки	9	32±2,0	56±3,8	55±7,5	95±3,6	112±5,5	135±7,3	92±12,3	125±19,3	92±9,9
Самцы	45	43±6,5	62±5,3	60±5,7	98±10,4	108±6,7	134±7,5	106±7,2	159±12,9	139±11,0
Самки	45	31±2,5	62±5,0	50±4,6	91±4,8	98±4,8	131±10,8	117±13,1	144±12,4	91±7,7
Самцы	90	40±4,3	52±2,7	57±2,9	76±3,3	107±7,5	134±9,9	116±8,7	103±12,7*	122±7,0
Самки	90	39±5,4	65±4,0	52±3,3	118±14,0*	112±4,6	148±4,9	103±13,5	155±14,6	87±4,5

Примечания: * – p<0,05, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки); # – n=7 (самцы, группа 90 мг/кг, 91-й и 121-й день и группа 45 мг/кг – 121-й день)

Таблица 16 – Влияние VMU-2012-05 на биохимические показатели крови кроликов, M±SEM

Пол	Доза, мг/кг	АЛТ, Ед/л		АСТ, Ед/л		ЩФ, Ед/л	
		День эксперимента					
		28	56	28	56	28	56
		n=8	n=4	n=8	n=4	n=8	n=4
Самцы	0	61±4,7	50±6,3	34±3,6	24±1,4	120±7,0	106±14,8
Самки	0	50±6,1	54±8,9	34±4,4	34±14,0	126±5,0	130±4,0
Самцы	4	56±6,7	59±6,2	33±8,3	40±11,7	123±7,3	102±10,0
Самки	4	47±4,5	54±10,2	38±9,5	46±10,1	131±5,7	109±6,9
Самцы	20	60±5,0	57±12,0	45±7,0	29±7,5	131±3,6	115±8,4
Самки	20	49±4,9	56±3,7	34±4,5	35±7,9	142±4,7	116±8,5
Самцы	40	64±5,0	53±4,8	53±7,0	24±2,9	139±7,4	108±13,4
Самки	40	49±4,6	52±2,9	32±7,1	67±26,7	152±5,1*	130±9,9

Примечание: * – $p < 0,05$, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки)

Таблица 17 – Влияние VMU-2012-05 на массовые коэффициенты органов самцов крыс, 91-й день исследования, % от массы тела, M±SEM

Исследуемые показатели	Контроль n=8	Тестируемый препарат		
		9 мг/кг n=8	45 мг/кг n=8	90 мг/кг n=7
Печень	3,65±0,154	3,61±0,082	3,38±0,168	3,14±0,071*
Почки	0,76±0,029	0,82±0,020	0,73±0,031	0,65±0,010*
Семенники	1,01±0,064	1,1±0,034	0,97±0,044	0,73±0,072*

Примечание: * – $p < 0,05$, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки)

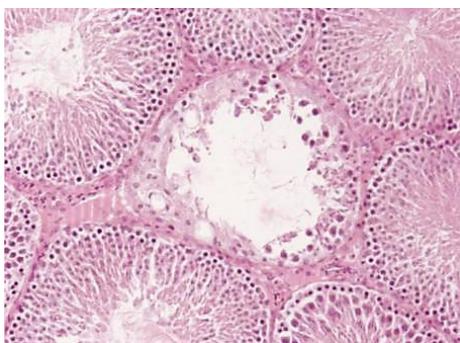


Рисунок 1 – Срез семенника самца крысы группы, получавшей препарат в дозе 45 мг/кг, 91-й день эксперимента

Примечание: гипоплазия сперматогенного эпителия. Окраска – гематоксилин-эозин, ув × 100

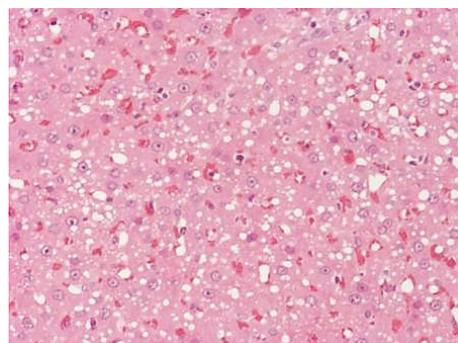


Рисунок 2 – Срез печени самца крысы группы, получавшей препарат в дозе 90 мг/кг, 91-й день эксперимента

Примечание: мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Окраска – гематоксилин-эозин, ув. × 200

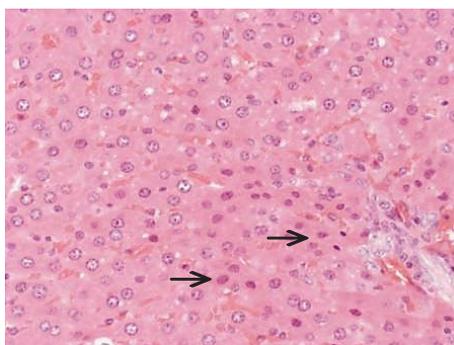


Рисунок 3 – Срез печени самки крысы группы, получавшей препарат в дозе 90 мг/кг, отсроченное наблюдение, 121-й день эксперимента

Примечание: предположительно апоптотические изменения гепатоцитов (стрелки). Окраска – гематоксилин-эозин, ув. × 200

Результаты биохимического анализа крови показали, что на фоне введения тестируемого препарата у самок крыс, получавших препарат в максимальной дозе, на 30-й день эксперимента увеличился уровень активности АСТ (на 40% по сравнению с группой контроля; тенденция, не достигшая статистической значимости) (таблица 15). Аналогичная тенденция (не значимая статистически) отмечена и у самцов кроликов на 28-й день эксперимента: уровень активности АСТ превышал показатели группы контроля на 60% (таблица 16). У самок кроликов, получавших препарат в средней и максимальной дозах, на 28-й день эксперимента отмечен повышенный, по сравнению с внутрилабораторными нормами (15–140 Ед/л) и/или группой контроля, уровень активности щелочной фосфатазы. В период отсроченного наблюдения тестируемый препарат не оказал влияния на биохимические показатели крови лабораторных животных.

Результаты патоморфологического исследования

При некропии погибших до плановой эвтаназии 3-х самцов крыс зарегистрированы отек и геморрагическое пропитывание ткани легких, отек и умеренное полнокровие сосудов головного мозга, а также полнокровие внутренних органов. Непосредственной причиной смерти животных данной группы стала острая сердечная недостаточность.

При гистологическом исследовании, непосредственно после окончания периода введения, у двух крыс на максимальной исследованной дозе 90 мг/кг выявлен альвеолярный гистиоцитоз и инкапсулированные очаги с инородными телами в ткани легких, аналогичное патологическое изменение обнаружено в одном случае после периода отсроченного наблюдения в группе средней дозы. Обнаруженные изменения, вероятно, обусловлены попаданием микрочастиц препарата в ткань легкого, и соответственно, не связаны напрямую с его токсическим действием.

На 91-й день эксперимента у двух самцов крыс из групп, получавших VMU-2012-05 в дозах 45 мг/кг и 90 мг/кг, обнаружена гипоплазия сперматогенного эпителия. Аналогичные изменения в этих же группах обнаружены и после периода отсроченного наблюдения у двух самцов (рис. 1).

В группе крыс максимальной дозы, непосредственно по окончании периода введения, обнаружен один случай мелкокапельной жировой дистрофии печени (рис. 2). По окончании периода отсроченного наблюдения у одной самки группы, получавшей VMU-2012-05 в дозе 90 мг/кг, выявлены предположительно апоптотические изменения гепатоцитов (рис. 3). У трёх животных этой группы обнаружена мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов.

При патоморфологическом исследовании кроли-

ков на 29-й и 57-й дни эксперимента патологических изменений органов не выявлено.

У самцов крыс непосредственно после окончания периода введения на 91-й день выявлено статистически значимое снижение массовых коэффициентов печени, почек и семенников в группе, получавших тестируемый препарат в дозе 90 мг/кг, по сравнению с группой контроля (таблица 17). После периода отсроченного наблюдения отличий от группы контроля не наблюдалось.

У самок крыс и у кроликов обоего пола влияния тестируемого препарата на массовые коэффициенты органов не отмечено.

При оценке местно-раздражающего действия по результатам гистологического исследования на 91-й день эксперимента выявлен один случай катарального гастрита в группе самцов крыс, получавших тестируемый препарат в дозе 90 мг/кг. У кроликов патологических изменений органов ЖКТ не выявлено. По окончании периода восстановления признаков местно-раздражающего действия ни у крыс, ни у кроликов не установлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования по изучению токсических свойств ГЛФ препарата VMU-2012-05 при однократном и многократном энтеральном введении на мышах, крысах и кроликах показали следующее.

При внутрижелудочном введении острая токсичность ЛД₅₀ составила > 2000 мг/кг. Следует отметить, что препараты сходной фармакологической группы (ННИОТ), применяемые в клинической практике, по данным доклинических исследований, также обладают умеренной токсичностью при однократном энтеральном введении. Так, для эфавиренза минимальная летальная доза для самок крыс составляла от 250 до 500 мг/кг, для самцов – 1000 мг/кг¹⁰, в экспериментах с неврирапином смертности животных (мыши, крысы, собаки, обезьяны) не наблюдалось при однократном энтеральном введении в диапазоне доз 50–450 мг/кг¹¹.

Токсические свойства VMU-2012-05 при многократном введении изучали на двух видах животных – крысах и кроликах. В ходе эксперимента на крысах погибло три самца: два – из группы максимальной исследованной дозы (10 ВТД), один – промежуточной дозы (5 ВТД). Процент летальных исходов составляет 4,7% от общего числа животных, которые получали препарат в этих дозах. Некропия пока-

¹⁰ Product monograph. AURO-EFAVIRENZ. Efavirenz Tablets, 600 mg. Auro Pharma Inc. August 11, 2017. [Электронный ресурс]. URL: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00040742.PDF

¹¹ Product monograph. VIRAMUNE® (nevirapine). Immediate-Release Tablets 200 mg. Extended-Release Tablets 400 mg. Control Number: 167894.2013. Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.boehringer-ingelheim.ca/sites/ca/files/documents/viramunexrmpmen.pdf>

зала, что причиной смерти животных стала острая сердечная недостаточность. На протяжении периода введения VMU-2012-05 и в период отсроченного наблюдения состояние всех остальных животных характеризовалось как удовлетворительное, у кроликов случаев гибели в ходе эксперимента не зарегистрировано. Следовательно, однозначно утверждать, что причина гибели животных напрямую обусловлена влиянием препарата, не представляется возможным.

Результаты клинико-лабораторных исследований выявили у самок кроликов группы максимальной дозы (40 мг/кг) незначительное снижение уровня рН мочи. У крыс группы максимальной дозы было отмечено снижение (не более 15% от показателей группы контроля) массовых коэффициентов почек. Никаких других изменений, которые могли бы свидетельствовать о нарушении функционирования мочевыделительной системы кроликов и крыс, обнаружено не было. Данные наблюдения не рассматриваются как имеющее существенное значение для прогнозирования клинического профиля безопасности препарата. Для ряда препаратов – НИИОТ при проведении доклинических исследований выявлено негативное влияние на почки. В исследованиях рилпивирин токсическое влияние на почки обнаружено у мышей и собак¹². Нефротоксичность была одним из основных обнаруженных токсических эффектов эфавиренза у крыс: выявлен некроз коркового вещества почек, дилатация и дегенерация канальцев, ведущие к развитию почечной недостаточности. На высоких дозах (более 500 мг/кг) гибель животных была вызвана острым некрозом почечных канальцев. В то же время у обезьян не было выявлено токсического действия эфавиренза на почки, несмотря на достижение системной экспозиции, превышающей таковую у крыс. Позднее было показано, что нефротоксичность, выявленная у крыс, является следствием образования глутатионового конъюгата эфавиренза у этого вида животных, что позволило рассматривать этот эффект как видоспецифичный¹³. Для неврирапина, по результатам изучения токсических свойств, почки не являются мишенью его токсического действия¹⁴, что также по результатам проведенного на двух видах лабораторных животных исследования показано для VMU-2012-05.

Оценка результатов клинического анализа крови показала умеренное влияние на лейкоцитарную формулу и количество тромбоцитов крысы. Надо отметить, что по результатам доклинических исследований гемопозитическая система является

мишенью токсического действия применяемого в клинической практике НИИОТ неврирапина¹⁵. В доклинических исследованиях рилпивирин также установлено токсическое действие на гемопозитическую систему у мышей, крыс и собак¹⁶. В клинической практике среди побочных эффектов неврирапина (по данным пострегистрационных исследований) отмечается лекарственная реакция с эозинофилией и системными симптомами, такими как сыпь, лихорадка, артралгия, миалгия и др.¹⁷ В результате приема этравирина могут наблюдаться следующие побочные эффекты: тромбоцитопения, анемия, снижение числа нейтрофилов¹⁸. В доклинических исследованиях VMU-2012-05 выявлены умеренные изменения по результатам клинического анализа крови, но с учетом опыта клинического применения препаратов сходного спектра действия, при планировании дальнейших доклинических и клинических исследований необходимо принимать во внимание потенциальную возможность влияния на гематологические показатели.

VMU-2012-05 оказал влияние на функциональную активность печени (увеличение активности АСТ, снижение массовых коэффициентов печени у самцов крыс группы максимальной дозы, наличие мелкокапельной жировой дистрофии у 13% крыс группы максимальной дозы, у одной самки (3,3% от общего числа животных) выявлены предположительно апоптотические изменения гепатоцитов.

По опыту клинического применения известно, что все НИИОТ могут спровоцировать повышение уровня трансаминаз, которое может и не сопровождаться клиническими проявлениями гепатита [23]. Так, например, на фоне приема эфавиренза повышение активности АСТ и АЛТ более чем в 5 раз выше верхней границы нормы наблюдалось у 3% пациентов из 1008, принимавших эфавиренз в дозе 600 мг в сутки (5–8% при длительной антиретровирусной терапии с эфавирензом). Аналогичное повышение наблюдалось у пациентов контрольной группы (5% при длительной антиретровирусной терапии без эфавиренза)¹⁹. В доклинических исследованиях эфавиренза было установлено увеличение частоты фиброза желчных протоков печени у крыс при многократном введении

¹⁵ Product monograph. VIRAMUNE® (nevirapine).

¹⁶ Product monograph including patient medication information Predurant® Rilpivirine as Rilpivirine hydrochloride.

¹⁷ Невирапин. Инструкция по медицинскому применению. ЛП-005197-191118. [Электронный ресурс]. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1167f0bc-0600-499f-8b2f-9ab9366bdf5f&t

¹⁸ Интеленс. Инструкция по медицинскому применению. ЛП-006200-120520. [Электронный ресурс]. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=2a18740e-fe4c-4b6e-9680-a6a696993281&t

¹⁹ Эфавиренз. Инструкция по медицинскому применению ЛП-005142-251018. [Электронный ресурс]. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=71eecdcb2-b233-4f11-8cf2-27c5245b9479&t

¹² Product monograph. AURO-EFAVIRENZ. Efavirenz Tablets, 600 mg.

¹³ Product monograph including patient medication information Predurant® Rilpivirine as rilpivirine hydrochloride Tablets, 25 mg Oral. Janssen Inc. Submission Control No: 223865. 2019. [Электронный ресурс]. URL: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00050300.PDF

¹⁴ Product monograph. VIRAMUNE® (nevirapine).

в дозах 500 мг/кг (около 10 ВТД) и выше, которое часто было ассоциировано с гиперплазией желчных протоков. Изменения в желчных протоках обнаружены и у обезьян (в дозах от 150 мг/кг), при этом биохимических признаков холестаза не отмечалось. В доклинических исследованиях на крысах и собаках показано, что печень – орган-мишень токсического действия невирапина²⁰. По опыту клинического применения из группы ННИОТ именно для этого препарата наиболее характерна гепатотоксичность. Токсическое влияние на печень может развиваться на протяжении всего курса терапии и обычно наиболее выражено у пациентов, инфицированных помимо ВИЧ, вирусами гепатитов [23]. Учитывая выявленное в доклинических исследованиях умеренное влияние VMU-2012-05 на функциональную активность печени, при длительном клиническом приеме препарата нельзя исключать появление побочных эффектов в отношении функции печени. При этом имеющиеся экспериментальные данные не позволяют прогнозировать большую выраженность таких эффектов относительно эффектов уже применяющихся в клинической практике ННИОТ.

При изучении токсических свойств VMU-2012-05 установлено наличие гипоплазии сперматогенного эпителия у 12–14% самцов из групп, получавших препарат в средней и максимальной дозах. У самцов крыс непосредственно после окончания периода введения на 91-й день показано снижение массовых коэффициентов семенников в группе максимальной дозы. У кроликов влияния на органы мужской репродуктивной системы не обнаружено, но следует учитывать, что продолжительность введения VMU-2012-05 кроликам составила 28 дней, в то время как крысы получали препарат 90 дней. Хотя обнаруженное патологическое изменение может встречаться у крыс спонтанно [24], отсутствие патологических изменений в контрольной группе и в группах, получавших препарат в минимальной дозе, позволяет предположить, что выявленное отклонение может быть обусловлено влиянием VMU-2012-05. Не исключено, что данное изменение является видоспецифической реакцией крыс на препарат. Для подтверждения (или опровержения) этого предположения необходимы дальнейшие исследования. Поскольку в клинике антиретровирусная терапия назначается длительно или даже пожизненно, следующим шагом для изучения токсических свойств является проведение исследований большей продолжительности (6 месяцев – на грызунах, 9 месяцев – на не грызунах)²¹.

²⁰ Product monograph. AURO-EFVIRENIZ.

²¹ Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 56701-2015 от 01.07.2016 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств»

Обязательным требованием к оценке токсических свойств препарата является оценка его местной переносимости. В случае энтерального введения рассматривается влияние препарата на органы и ткани ЖКТ, непосредственно контактирующие с препаратом. При оценке местно-раздражающего действия по результатам гистологического исследования на 91-й день эксперимента обнаружен один случай катарального гастрита в группе самцов крыс, получавших тестируемый препарат в дозе 90 мг/кг. Учитывая низкую частоту встречаемости (3,3% от общего числа животных) данного патологического изменения в условиях проведенного эксперимента, а также то, что подобные изменения в тканях желудка могут рассматриваться как фоновая патология, связанная со способом введения [25], можно сделать вывод о том, что препарат в исследованном диапазоне доз не оказал местно-раздражающего действия. У кроликов патологических изменений органов ЖКТ не выявлено. Полученные данные позволяют предположить, что препарат относительно безопасен для органов ЖКТ при приеме до 3-х месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено доклиническое изучение токсических свойств готовой лекарственной формы лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона для лечения ВИЧ-1 инфекции при однократном и многократном введении. LD_{50} ГЛФ при внутрижелудочном введении более 2000 мг/кг. В ходе исследования по изучению токсических свойств при многократном введении установлен уровень доз, не вызывающих нежелательных эффектов (NOAEL), который для крыс составил 9 мг/кг (1 ВТД), для кроликов – 4 мг/кг (1 ВТД). Препарат оказал влияние на функциональную активность печени. В исследовании на крысах показано токсическое влияние на органы мужской репродуктивной системы (гипоплазия сперматогенного эпителия). Оценка местнораздражающего действия не выявила негативного влияния на органы ЖКТ. В целом, показано, что VMU-2012-05 обладает благоприятным профилем безопасности, не уступающим показателям применяемых в клинике препаратов аналогичной фармакологической группы, и может рассматриваться как перспективный лекарственный кандидат для лечения ВИЧ-1 инфекции. Поскольку в клинической практике антиретровирусная терапия назначается длительно или пожизненно, следующим шагом для более детального и полного изучения токсических свойств является проведение доклинических исследований токсических свойств с более длительным периодом введения препарата (6 месяцев – на грызунах, 9 месяцев – на не грызунах).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного контракта № 14.N08.11.0154 на выполнение прикладных научных исследований и экспериментальных разработок по теме «Доклинические исследования лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона для лечения ВИЧ-1 инфекций»

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.А. Вавилова – проведение экспериментов, сбор данных, анализ данных, подготовка черновика рукописи; Е.В. Шекунова – планирование эксперимента, анализ данных, анализ литературы; участие в написании рукописи; Е.А. Джайн (Корсакова) – интерпретация результатов, анализ литературы, участие в написании рукописи; В.Ю. Балабаньян – участие в разработке концепции и дизайна исследования, обсуждение результатов; А.А. Озеров – разработка концепции и дизайна исследований, обсуждение результатов; М.Н. Макарова – обсуждение полученных результатов, участие в написании рукописи и окончательное утверждение ее для публикации; В.Г. Макаров – обсуждение полученных результатов, окончательное утверждение рукописи для публикации

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Kemnic TR, Gulick PG. HIV Antiretroviral Therapy. [Updated 2021 Jun 25]. In: Stat Pearls Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2021. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513308/>
- Yoshida Yu., Honma M., Kimura Y., Abe H. Structure, Synthesis and Inhibition Mechanism of Nucleoside Analogues as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) // *Chem. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 16, No.5. – P. 743–766. DOI: 10.1002/cmdc.202000695.
- Wang Y., De Clercq E., Li G. Current and emerging non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for HIV-1 treatment // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2019. – Vol. 15, No.10. – P. 813–829. DOI: 10.1080/17425255.2019.1673367.
- Xu W., Pu J., Su S., Hua C., Su X., Wang Q., Jiang S., Lu L. Revisiting the mechanism of enfuvirtide and designing an analog with improved fusion inhibitory activity by targeting triple sites in gp41 // *AIDS.* – 2019. – Vol. 33, No.10. – P. 1545–1555. DOI: 10.1097/QAD.0000000000002208.
- Chandrashekar Voshavar, Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS: Recent Advances and Future Challenges // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 19, No.18. – P. 1571–1598. DOI: 10.2174/1568026619666190619115243.
- López-Huertas, M.R., Jiménez-Tormo L., Madrid-Elena N., Gutiérrez C., Rodríguez-Mora S., Coiras M., Alcamí J., Santiago M. The CCR5-antagonist Maraviroc reverses HIV-1 latency in vitro alone or in combination with the PKC-agonist Bryostatín-1 // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, No.1. – P. 2385. DOI: 10.1038/s41598-017-02634-y.
- Trivedi J., Mahajan D., Jaffe R.J., Acharya A., Mitra D., Byrareddy S.N. Recent Advances in the Development of Integrase Inhibitors for HIV Treatment // *Curr HIV/AIDS Rep.* – 2020. – Vol. 17, No.1. – P. 63–75. DOI: 10.1007/s11904-019-00480-3.
- Blair H.A. Ibalizumab: A Review in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection // *Drugs.* – 2020. – Vol. 80, No.2. – P. 189–196. DOI: 10.1007/s40265-020-01258-3.
- Deeks E.D. Darunavir/Cobicistat/Emtricitabine/Tenofovir Alafenamide: A Review in HIV-1 Infection // *Drugs.* – 2018. – Vol. 78, No.10. – P. 1013–1024. DOI: 10.1007/s40265-018-0934-2.
- Eggleton J.S., Nagalli S. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- Dionne B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology // *Infect Dis Clin North Am.* – 2019. – Vol. 33, No.3. – P. 787–805. DOI: 10.1016/j.idc.2019.05.006.
- Rothenberg R., Woelfel M., Stoneburner R., Milberg J., Parker R., Truman B. Survival with the acquired immunodeficiency syndrome. Experience with 5833 cases in New York City // *N Engl J Med.* – 1987. – Vol. 317, No.21. – P. 1297–1302. DOI: 10.1056/NEJM198711193172101
- Hellinger F.J. The lifetime cost of treating a person with HIV // *JAMA.* – 1993. – Vol. 270, No.4. – P. 474–478. DOI:10.1001/jama.1993.03510040078033
- Marcus J.L., Chao C.R., Leyden W.A., Xu L., Quesenberry C.P. Jr., Klein D.B., Towner W.J., Horberg M.A., Silverberg M.J. Narrowing the gap in life expectancy between HIV-infected and HIV-uninfected individuals with access to care // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 2016. – Vol. 73, No.3. – P. 39–46. DOI: 10.1097/QAI.0000000000001014.
- Fauci A.S., Marston H.D. Ending the HIV/AIDS pandemic—follow the science // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol. 373. – P. 2197–2199. DOI: 10.1056/NEJMp1502020.
- Wood E., Montaner J.S., Bangsberg D.R., Tyndall M.W., Strathdee S.A., O'Shaughnessy M.V., Hogg R.S. Expanding access to HIV antiretroviral therapy among marginalized populations in the developed world // *AIDS.* – 2003. – Vol. 17. – P. 2419–2427. DOI:10.1097/00002030-200311210-00003.
- Gupta R.K., Gregson J., Parkin N., et al. HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis // *Lancet Infect Dis.* – 2018. – Vol. 18, No.3. – P. 346–355. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30702-8.
- Tang M.W., Shafer R.W. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications // *Drugs.* – 2012. – Vol. 72, No.9. – P. 1–25. DOI: 10.2165/11633630-000000000-00000.
- Chawla A., Wang C., Patton C., Murray M., Puneekar Y., de Ruiter A., Steinhart C. A Review of Long-Term Toxicity of Antiretroviral Treatment Regimens and Implications for an Aging Population // *Infect Dis Ther.* – 2018. – Vol. 7, No.2. – P. 183–195. DOI: 10.1007/s40121-018-0201-6.

20. Еременко Н.Н., Губенко А.И., Зебрев А.И., Лыскова И.В. Современные подходы в лечении ВИЧ-инфицированных больных // Ведомости НЦЭСМП. – 2014 – № 2. – С. 40–45.
21. Петров В.И., Озеров А.А., Луганченко А.И. Пиримидиновые производные бензофенона, обладающие анти-ВИЧ-1 активностью. Пат. России № 2489427 (2013). – Оpubл. 10.08.2013. Бюлл. № 22.
22. Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Tembumikar K., Ozerov A.A., Gurskaya G.V., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K.S. 1-[2-(2-Benzoyl-and 2-benzyl-phenoxy)ethyl]uracilsaspotent anti-HIV-1 agents // Bioorg. Med. Chem. – 2011. – Vol. 19, No.19. – P. 5794–5802. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.025.
23. Аронин С.И. ВИЧ-инфекция: вопросы терапии // Казанский медицинский журнал. – 2005. – Т. 86, №6. – С. 433–450.
24. Creasy D., Bube A., De Rijk E., Kandori H., Kuwahara M., Masson R., Nolte T., Reams R., Regan K., Rehm S., Rogerson P., Whitney K. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system // J. Toxicol. Pathol. – 2012. – Vol. 40. – P. 40–121. DOI: 10.1177/0192623312454337.
25. Uehara T., Elmore S. A., Szabo K. A. Esophagus and stomach. Chapter 6. Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition), Academic Press, 2018. – P. 35–50. DOI: 10.1016/B978-0-12-391448-4.00006-X.

АВТОРЫ

Вавилова Валерия Александровна – фармаколог 1 категории отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». ORCID ID: 0000-0002-1009-3963. E-mail: vavilova.va@doclinika.ru

Шекунова Елена Васильевна – кандидат биологических наук, руководитель отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». ORCID ID: 0000-0002-2689-6891. E-mail: shekunova.ev@doclinika.ru

Джайн (Корсакова) Екатерина Александровна – аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. ORCID ID: 0000-0003-0283-8598. E-mail: Ekaterina.korsa@gmail.com

Балабаньян Вадим Юрьевич – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической

технологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. ORCID ID: 0000-0002-5744-7060. E-mail: bal.pharm@mail.ru

Озеров Александр Александрович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета. ORCID ID: 0000-0002-4721-0959. E-mail: prof_ozarov@yahoo.com

Макарова Марина Николаевна – доктор медицинских наук, заместитель ген. директора по науке АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». ORCID ID: 0000-0003-3176-6386. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадьевич – доктор медицинских наук, профессор, генеральный директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». ORCID ID: 0000-0002-2447-7888. E-mail: makarov.vg@doclinika.ru