

Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 9, Выпуск 3, 2021

Свидетельство регистрации СМИ:
ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016 г.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Главный редактор

Петров Владимир Иванович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Заместители главного редактора

Озеров Александр Александрович доктор химических наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Черников Максим Валентинович доктор медицинских наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Редакционная коллегия

Фармакогнозия, ботаника

Куркин Владимир Александрович доктор фармацевтических наук, профессор, г. Самара, Россия

Зилфикаров Ифрат Назимович профессор РАН, доктор фармацевтических наук, г. Москва, Россия

Фармацевтическая технология и биотехнология

Саканян Елена Ивановна доктор фармацевтических наук, профессор, г. Москва, Россия

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Информационные технологии в фармации

Вавер Ивона PhD, профессор, г. Варшава, Польша

Фармакология и клиническая фармакология

Ханферьян Роман Авакович доктор медицинских наук, профессор, г. Москва, Россия

Буске Паскаль MD, профессор, г. Страсбург, Франция

Кампизи Коррадино профессор, MD, PhD, г. Генуя, Италия

Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины

Наркевич Игорь Анатольевич доктор фармацевтических наук, профессор, г. Санкт-Петербург, Россия

Сомасундарам Субраманиан MD, Россия/Индия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / Краткие сообщения / Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии** могут быть рассмотрены любыми членами редакционной коллегии.

Ответственный секретарь: Корянова Ксения Николаевна, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

Корректор: Мищенко Екатерина Сергеевна, г. Пятигорск, Россия

Переводчик: Давыденко Любовь Григорьевна, кандидат филологических наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Технический редактор: Доценко Марина Александровна, г. Пятигорск, Россия

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

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

Адрес издательства: 357532, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России

Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы. Индекс 94183

Формат А4, тираж 1000 экз. Цена свободная.

Журнал «Фармация и фармакология» включен в перечень рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Перечень ВАК), Scopus, Web of Science (ESCI), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, КиберЛенинка, Соционет, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами в ООО «Амирит»,

410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.

© ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 2021

© Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2021

© Авторы, 2021

Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov Academian RAS, PhD (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Aleksandr A. Ozerov PhD (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

Maxim V. Chernikov PhD (Medicine), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Editorial Board

Pharmacognosy, Botany

Vladimir A. Kurkin PhD (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Ifrat N. Zilfikarov PhD (Pharmacy), Professor of the RAS, Moscow, Russia

Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Elena I. Sakanyan PhD (Pharmacy), Professor, Moscow, Russia

Pharmaceutical and Toxicological Chemistry / Information Technologies in Pharmacy

Iwona Wawer PhD, Professor, Warsaw (Poland)

Pharmacology and Clinical Pharmacology

Roman A. Khanfer`yan PhD (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet MD, PhD Professor, Strasbourg, France

Campisi Corradino Professor, MD, PhD, Genoa, Italy

Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Igor A. Narkevich PhD (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Somasundaram Subramanian MD, Russia/India

Manuscripts presented in sections **Reviews, Lectures / Pharmaceutical Education / Brief Reports / Discussions, Referee Reports, Anniversaries, School of Thought, History of Pharmacy and Pharmacology** can be considered by any members of the editorial board.

Executive Editor: Koryanova Ksenia N., PhD (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Proofreader: Mischenko Ekaterina S., Pyatigorsk, Russia

Translator: Davydenko Lubov G., PhD (Philology), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Technical editor: Dotsenko Marina A., Pyatigorsk, Russia

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

Editors office address: 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University

Phone number: +7(8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Union catalogue. Russian Press / Newspapers and journals. Code 94183

A4 size, 1000 issues circulation. Price free

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Scopus, Web of Science (ESCI), Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Printed in the LLC "Amirit" in accord with provided materials, 410004, Saratov, 88, Chernishevsky Str.

© Volgograd State Medical University, 2021

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2021

©Authors, 2021

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS**ОБЗОР / REVIEW**

<i>И.Н. Шишиморов, О.В. Магницкая, Ю.В. Пономарева</i>	<i>I.N. Shishimorov, O.V. Magnitskaya, Yu.V. Ponomareva</i>
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАКОТЕРАПИИ COVID-19	GENETIC PREDICTORS OF SEVERITY AND EFFICACY OF COVID-19 PHARMACOTHERAPY.....
174	174

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / RESEARCH ARTICLE**Фармакогнозия, ботаника / Pharmacognosy, Botany**

<i>В.А. Куркин, Т.К. Рязанова</i>	<i>V.A. Kurkin, T.K. Ryazanova</i>
ВОПРОСЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ	STANDARDIZATION PROBLEMS OF MEDICINAL PREPARATIONS FROM <i>RHODIOLA ROSEA</i> L.
185	185

Фармацевтическая технология и биотехнология / Pharmaceutical Technology and Biotechnology

<i>И.И. Краснюк (мл.), С.Р. Нарышкин, И.И. Краснюк, А.В. Беляцкая, О.И. Степанова, И.С. Бобров, В.Г. Янкова, Д.В. Рау, А.Н. Воробьев</i>	<i>I.I. Krasnyuk (Jr.), S.R. Naryshkin, I.I. Krasnyuk, A.V. Belyatskaya, O.I. Stepanova, I.S. Bobrov, V.G. Yankova, J.V. Rau, A.N. Vorobiev</i>
ВЛИЯНИЕ ТВЁРДЫХ ДИСПЕРСИЙ НА РАСТВОРИМОСТЬ МЕТРОНИДАЗОЛА.....	EFFECT OF SOLID DISPERSIONS ON THE SOLUBILITY OF METRONIDAZOLE.....
195	195

Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

<i>В.А. Вавилова, Е.В. Шекунова, Е.А. Джайн (Корсакова), В.Ю. Балабаньян, А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров</i>	<i>V.A. Vavilova, E.V. Shekunova, E.A. Jain (Korsakova), V.Yu. Balabanyan, A.A. Ozerov, M.N. Makarova, V.G. Makarov</i>
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА VMU-2012-05 – ОРИГИНАЛЬНОГО НЕНУКЛЕОЗИДНОГО ИНГИБИТОРА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1.....	EXPERIMENTAL STUDY OF TOXIC PROPERTIES OF VMU-2012-05 DRUG – ORIGINAL NON-NUCLEOSIDE INHIBITOR OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE.....
205	205
<i>А.К. Брель, Н.В. Атапина, Ю.Н. Будаева, С.В. Лисина, С.С. Царук, Д.В. Куркин, И.Н. Тюренков</i>	<i>A.K. Brel, N.V. Atapina, Y.N. Budaeva, S.V. Lisina, S.S. Tsaruk, D.V. Kurkin, I.N. Tyurenkov</i>
СИНТЕЗ, АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ С ТАУРИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ	SYNTHESIS, ANTIAGGREGATION AND ANTITROMBOTIC ACTIVITIES OF NEW DERIVATIVES OF HYDROXYBENZOIC ACIDS WITH TAURIC FRAGMENT.....
222	222

Организация и экономика фармацевтического дела / Organization and Economy of Pharmacy

<i>В.С. Крысанова, А.Д. Ермолаева, Т.Н. Ермолаева, М.В. Давыдовская, К.А. Кокушкин</i>	<i>V.S. Krysanova, A.D. Ermolaeva, T.N. Ermolaeva, M.V. Davydovskaya, K.A. Kokushkin</i>
ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РОССИЙСКОГО БИОАНАЛОГА ОМАЛИЗУМАБА У ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ СРЕДНЕТЕЖЕЛОГО И ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ.....	ECONOMIC ASPECTS OF APPLICATION OF THE RUSSIAN BIOSIMILAR OMALIZUMAB IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA OF MODERATE TO SEVERE CLINICAL COURSES
235	235

УДК 615.036.8: 615.281.8



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАКОТЕРАПИИ COVID-19

И.Н. Шишиморов, О.В. Магницкая, Ю.В. Пономарева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

E-mail: ju.ponomareva@gmail.com

Получено 10.04.2021

Принята к печати 12.05.2021

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19 изменила многие аспекты нашей жизни и инициировала многочисленные исследования, направленные на поиск факторов, определяющих различное течение этого инфекционного заболевания. Особую социальную значимость приобретают исследования, направленные на поиск предикторов тяжелого течения новой коронавирусной инфекции, а также факторов, определяющих эффективность и безопасность фармакотерапии этого заболевания.

Цель. Целью настоящей работы является поиск и обобщение информации о генетических предикторах тяжелого течения COVID-19, а также фармакогенетических аспектах, определяющих вариабельность терапевтического ответа на рекомендованные лекарственные препараты для лечения COVID-19.

Материалы и методы. В статье представлен обзор результатов научных исследований по изучению полиморфизма генов, определяющих ответ организма на внедрение SARS-CoV-2 инфекции и эффектов фармакотерапии данного заболевания, полученных из открытых и доступных источников за период 2019– март 2021 гг. Поиск проводился в электронных базах данных: PubMed, Cochrane Library, ClinicalTrials.gov, Elibrary, Scopus. Основные поисковые запросы: «предикторы + тяжелое течение + COVID-19», «генетические вариации+COVID-19», «фармакогенетика+COVID-19», «полиморфизм генов + SARS-CoV-2», «фармакотерапия+полиморфизм генов + COVID-19». Поисковые запросы выполнялись на русском и английском языках.

Результаты и заключение. Поисковые научные исследования, детализирующие механизмы заражения SARS-CoV-2, вариабельность тяжести течения заболевания и индивидуальные особенности терапевтического ответа на применяемые препараты, активно проводятся учеными разных стран мира. Однако большинство их научных проектов являются разнонаправленными, а найденные в них возможные предикторы тяжелого течения COVID-19 не подтверждены или не изучены в последующих исследованиях. Генетически обусловленная гетерогенность иммунного ответа организма на SARS-CoV-2 инфекцию требует дальнейшего изучения, что во многом связано с отсутствием однозначного мнения о ведущем механизме, определяющем тяжесть этого заболевания. Обобщение результатов отдельных исследований генетических предикторов тяжести течения и эффективности фармакотерапии COVID-19 может стать основой для дальнейшего поиска и повышения достоверности полученных данных с целью разработки стратегии предупреждения распространения инфекции COVID-19, определения потенциальных мишеней таргетной терапии, а также разработки протоколов оптимизации фармакотерапии этого заболевания.

Ключевые слова: COVID-19; фармакотерапия; полиморфизм генов; фармакогенетика; SARS-CoV-2; предикторы

Список сокращений: COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года; SARS-CoV-2 – коронавирус, этиология COVID-19; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; GWAS – Genome-Wide Association Studies / полногеномный поиск ассоциаций; АПФ – ангиотензин-превращающий фермент; AGTR1/2 Angiotensin II receptor type 1 and type 2 / Рецептор ангиотензина II типа 1 и 2; ОШ – отношение шансов; TMPRSS2 – Transmembrane Serine Protease 2 / трансмембранная сериновая протеаза типа 2; NF-κB – Nuclear factor-κB / транскрипционный ядерный фактор κB; DPP4 – Dipeptidyl-peptidase 4 / дипептидилпептидаза 4; MERS-CoV – короновирус, этиология ближневосточного респираторного синдрома; TLR – Toll-подобные рецепторы; ПНК – рибонуклеиновая кислота; IRF – Interferon Regulatory Factor / регуляторный фактор интерферона; ИНФ – интерферон; IL – Interleukin / интерлейкин; HLA – Human Leukocyte Antigens / главный комплекс гистосовместимости; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; TNF – Tumor necrosis factor / фактор некроза опухоли; TGF – Transforming growth factor / трансформирующий фактор роста; CYP – cytochrome P450 / ферменты цитохрома; ГКС – глюкокортикостероиды; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром; АТФ – аденозинтрифосфат; ДИ – доверительный интервал; OR – относительный риск; Ig – иммуноглобулины

Для цитирования: И.Н. Шишиморов, О.В. Магницкая, Ю.В. Пономарева. Генетические предикторы тяжести течения и эффективности фармакотерапии COVID-19. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):174-184. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-174-184

© И.Н. Шишиморов, О.В. Магницкая, Ю.В. Пономарева, 2021

For citation: I.N. Shishimorov, O.V. Magnitskaya, Yu.V. Ponomareva. Genetic predictors of severity and efficacy of COVID-19 pharmacotherapy. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):174-184. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-174-184

GENETIC PREDICTORS OF SEVERITY AND EFFICACY OF COVID-19 PHARMACOTHERAPY

I.N. Shishimorov, O.V. Magnitskaya, Yu.V. Ponomareva

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

E-mail: ju.ponomareva@gmail.com

Received 10 April 2021

Accepted 12 May 2021

The pandemic of the novel coronavirus infection 2019 (COVID-19) has changed many aspects of our lives and initiated numerous studies aimed at finding the factors that determine different courses of this infectious disease. The studies aimed at finding predictors of the severe course of this novel coronavirus infection, as well as the factors that determine the efficacy and safety of this disease pharmacotherapy, are acquiring special social significance.

The aim of this work is to find and summarize information on genetic predictors of severe COVID-19, as well as pharmacogenetic aspects that determine the variability of the therapeutic response to the drugs recommended for COVID-19 treatment.

Materials and methods. The article provides a review of scientific results on the research of gene polymorphism that determine a body's response to the introduction of SARS-CoV-2 infection and the effects of pharmacotherapy for this disease, obtained from open and available sources within the period of 2019 – March 2021. The search was conducted in the following electronic databases: PubMed, Cochrane Library, ClinicalTrials.gov; Elibrary, Scopus. The main search inquiries were: “predictors + severe course + COVID-19”, “genetic variations + COVID-19”, “pharmacogenetics + COVID-19”, “gene polymorphism + SARS-CoV-2”, “pharmacotherapy + gene polymorphism + COVID-19” in both Russian and English.

Results and conclusion. The exploratory research detailing the mechanisms of infecting with SARS-CoV-2, the variability of the disease severity and the individual characteristics of therapeutic responses to the drugs used, are being actively carried out by scientists all over the world. However, most of their scientific projects are diverse, and the possible predictors of a severe course of COVID-19 found in them, have not been confirmed or investigated in subsequent studies. A generalization of the individual studies results of the genetic predictors concerning COVID-19 severity and effectiveness of its pharmacotherapy, can become the basis for further search and increase the reliability of the data obtained in order to develop a strategy for preventing the spread of COVID-19 infection, to identify potential targets of the treatment, and develop the protocols for optimizing this disease pharmacotherapy.

Keywords: COVID-19; pharmacotherapy; gene polymorphism; pharmacogenetics; SARS-CoV-2; predictors

Abbreviations: COVID-19 – coronavirus disease-2019; SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus disease, COVID-19 etiology; WHO – World Health Organization; GWAS – Genome-Wide Association Studies / полногеномный поиск ассоциаций; ACE – angiotension-converting enzyme; AGTR1/2 Angiotensin II receptor Type 1 and Type 2; OR – odd ratio; TMPRSS2 – Transmembrane protease, serine 2; T NF-κB – Transcriptional nuclear factor-κB; DPP4 – Dipeptidyl-peptidase 4; MERS-CoV – coronavirus, Middle East respiratory syndrome etiology; TLR – Toll-like receptor; RNA – ribonucleic acid; IRF – Interferon Regulatory Factor; INF – interferon; IL – Interleukin; HLA – Human Leukocyte Antigens; HIV – human immunodeficiency virus; TNF – Tumor necrosis factor; TGF – Transforming growth factor; CYP – Cytochrome P450; GCSs – glucocorticosteroids; ARDS – acute respiratory distress syndrome; ATP – adenosine triphosphate; CI – confidence interval; RR – relative risk; Ig – immunoglobulin

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19 изменила многие аспекты нашей жизни и инициировала многочисленные исследования, направленные на поиск факторов, определяющих различное течение этого инфекционного заболевания. Известно, что более 40% людей переносят SARS-CoV-2 инфекцию бессимптомно, кроме того, часть популяции обладает естественной невосприимчивостью к ней и даже при высокой вирусной нагрузке не манифестирует заболеванием [1]. Другим полюсом индивидуальной реактивности являются пациенты с тяжелым течением инфекции, которые госпитализируются в отделения реанимации и интенсивной терапии с симптомами острого респираторного дистресс-синдрома и полиорганной недостаточно-

сти. Смертность в этой группе составляет более 40% [2]. По данным ВОЗ на 31 марта 2021 в мире зарегистрировано 2 769 696 подтвержденных смертей от COVID-19 на 126 372 442 случаев заболевания¹. Многие современные исследования направлены на поиск предикторов тяжелого течения новой коронавирусной инфекции. Часть из них посвящена клиническим факторам: так мужской пол, пожилой возраст и коморбидный фон чаще ассоциируются с более тяжелым течением заболевания [3, 4]. Другие исследования направлены на поиск индивидуальных генетических вариаций, которые определяют различия в иммунном ответе на инфекцию SARS-CoV-2 и могут

¹ Доклад ВОЗ о текущей ситуации с COVID-19 в мире (по состоянию на 31.03.2021). URL: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---31-march-2021>

объяснить варианты клинического течения COVID-19, а также различия в показателях заболеваемости и смертности от SARS-CoV-2 инфекции у населения разных стран [5, 6].

Взаимосвязь тяжести течения COVID-19 с определенными аллельными вариантами генов, ответственных за иммунный ответ, имеет очень важное значение, так как может использоваться для выявления популяции с предрасположенностью к более тяжелому течению инфекции и определения стратегии вакцинопрофилактики. Эти данные могут быть использованы для разработки таргетных терапевтических подходов, а также для подбора специалистов для работы с больными COVID-19 в случае высокой вероятности легкого и бессимптомного течения.

ЦЕЛЬ. Поиск и обобщение информации о генетических предикторах тяжелого течения COVID-19, а также фармакогенетических аспектах, определяющих вариабельность терапевтического ответа на рекомендованные лекарственные препараты для лечения COVID-19.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В статье представлен обзор результатов научных исследований по изучению полиморфизма генов, определяющих ответ организма на внедрение SARS-CoV-2 инфекции и эффектов фармакотерапии данного заболевания, полученных из открытых и доступных источников за период 2019 – март 2021 гг. Поиск проводился в электронных базах данных: PubMed, Cochrane Library, ClinicalTrials.gov, Elibrary, Scopus. Основные поисковые запросы: «предикторы+тяжелое течение + COVID-19», «генетические вариации + COVID-19», «фармакогенетика + COVID-19», «полиморфизм генов + SARS-CoV-2», «фармакотерапия + полиморфизм генов + COVID-19». Поисковые запросы выполнялись на русском и английском языках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетические особенности ответа организма человека на внедрение SARS-CoV-2 инфекции

Широкую огласку получило исследование полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), где были проанализированы 8582968 однонуклеотидных полиморфизмов у 1980 пациентов с тяжелым течением COVID-19 жителей Италии и Испании [5]. В контрольную группу включили 2205 здоровых добровольцев. По результатам исследования не было обнаружено определенной взаимосвязи тяжелого течения заболевания с развитием дыхательной недостаточности и одиночного генного полиморфизма. Однако, были выявлены детерминанты тяжелого течения, связанные с несколькими генами, расположенными в фрагменте 3 хромосомы – локус 3p21.31, включающий гены SLC6A20, LZTFL1, CCR9, FYCO1, CXCR6 и XCR1. Среди этих генов выделяют наиболее значимые в патогенезе развития COVID-19: LZTFL1 (экспрессируется

в легких и определяет продукцию белка, регулируемую цилиарную функцию), SLC6A20 (ген, кодирующий синтез соответствующего белка-транспортера, участвующего в трансмембранном переносе ионов натрия и хлора; а также предположительно влияет на взаимодействие SARS-CoV-2 с АПФ2 рецепторами), CCR9 (ген, кодирующий синтез одноименного мембранного белка, входит в состав G-протеин-опосредованных рецепторов, является рецептором для хемокинов, контролирующей миграцию эффекторных клеток в очаг воспаления), CXCR6 (экспрессирован в лимфоидной ткани и на активированных Т-лимфоцитах, регулируя их активность; включая влияние на иммунный ответ при ингаляционном поступлении вирусных патогенов). Наличие аллели GA в однонуклеотидной последовательности rs11385942 ассоциировалось со снижением экспрессии CXCR6 и повышением экспрессии SLC6A20. По результатам проведенного мета-анализа частота встречаемости риск-аллели была примерно в 1,5 раза выше в группе госпитализированных с дыхательной недостаточностью, получавших респираторную поддержку, по сравнению с группой, получавшей только ингаляции кислорода (ОШ 1,77, 95% доверительный интервал 1,48–2,11; $P=3.30 \times 10^{-4}$). Другим результатом данного исследования было установление взаимосвязи тяжелого течения заболевания с локусом 9q34.2, определяющим группу крови по системе ABO, в данной когорте пациентов. Мета-анализ показал, что пациенты с группой А в 1,5 раза чаще имели тяжелое течение по сравнению с другими группами крови (ОШ 1.45; 95% CI, 1.20–1.75; $P=1.48 \times 10^{-4}$), а также был обнаружен протективный эффект у носителей 0 группы крови (ОШ 0.65; 95% CI, 0.53–0.79; $P=1.06 \times 10^{-5}$). Более достоверные данные могли бы быть получены, если бы в группу контроля попали люди с бессимптомной формой и легким течением SARS-CoV-2 инфекции, а не здоровые люди, которые не были инфицированы данным вирусом.

Ангиотензинпревращающий фермент и трансмембранная сериновая протеаза

Другим направлением поиска генетически обусловленных предикторов тяжелого течения COVID-19 является изучение взаимодействия SARS-CoV-2 с белками клеток-хозяина на этапе внедрения вируса в организм человека, что может объяснить различия в вирусной нагрузке. Проникновение SARS-CoV-2 в клетку реализуется с помощью поверхностных S-белков, которые взаимодействуют с ангиотензинпревращающим ферментом 2-го типа (АПФ 2) в области участка с протеазной активностью. Вирус инфицирует клетки эпителия дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и ряда других органов. Отмечается высокая экспрессия АПФ 2 альвеолярными пневмоцитами II типа, что определяет тропизм SARS-CoV-2 к легочной ткани. Для активации вирусного S-белка необходим

фермент TMPRSS2, что облегчает проникновение вируса в клетку хозяина [7]. TMPRSS2 может рассматриваться как потенциальная терапевтическая мишень в лечении COVID-19.

Применяемые в настоящее время в Японии ингибиторы TMPRSS2, одобренные для лечения ряда форм рака предстательной железы и панкреатита, являются возможными кандидатами для лечения SARS-CoV инфекции [8]. Ген TMPRSS2 локализован в 21 хромосоме 21q22.3, уровень его экспрессии подвержен генетическому полиморфизму, что может при SARS-CoV-2 инфекции определять восприимчивость, вирусную нагрузку и риски тяжелого поражения легких [9]. Однонуклеотидный полиморфизм TMPRSS2 rs383510 и rs464397 показал самую высокую экспрессию в легких пациентов с гомозиготным генотипом TT, rs2070788 – GG генотипом и rs469390 с генотипом AA. Соответственно, rs383510, rs464397 гетерозиготный генотип CT и rs469390 с генотипом AG показали промежуточный уровень экспрессии TMPRSS2, а гомозиготный генотип CC (rs383510, rs464397), GG (rs469390) и генотипы AG и AA (rs2070788) имели самое низкое выражение. Распространенность генетического полиморфизма TMPRSS2 различается в популяции. Например, население Восточной Азии имеет более низкую частоту генотипов с высокой экспрессией по сравнению с американским и европейским сообществом [10].

После высокоафинного соединения вируса с АПФ 2 происходит слияние с клеткой хозяина, проникновение в нее и размножение вируса. Синтез АПФ 2 связан с полиморфизмом гена, кодирующим этот белок. Точечная мутация в гене АПФ 2 (Leu584Ala) повышает проникающую способность SARSCoV-2. Интересно, что несколько аминокислотных последовательностей принципиально изменяют взаимодействие между вирусным белком S1 и АПФ 2 рецептором, изменяя вирусную нагрузку. Всего 13 полиморфизмов (rs1434130600, RS1395878099, RS142984500, RS756231991, RS1244687367, RS73635825, RS778500138, RS867318181, RS763395248, rs4646116, rs778030746, rs1199100713 и rs781255386) определяют быстрое и эффективное взаимодействие АПФ 2/S1, что способствует развитию инфекции. Напротив, другие 18 однонуклеотидных полиморфизмов (rs143936283, rs961360700, rs1569243690, RS751572714, RS1348114695, RS1263424292, RS766996587, RS760159085, RS1016409802, RS146676783, RS1352194082, rs755691167, rs1325542104, rs759579097, rs762890235, rs1192tnqh_9; 192618, rs370610075 и rs1256007252) затрудняют взаимодействия между АПФ 2 и S1, тем самым снижая уровень инфицирования [11]. Вместе с тем, высокая активность АПФ 2 имеет протективный эффект в отношении легочной функции. Инфекция SARS-CoV-2 вероятно снижает регуляторную функцию АПФ 2. Снижение активности АПФ 2, запущенное вирусом, и повышение вследствие этого уровня

ангиотензина II приводит к синтезу провоспалительных цитокинов и хемокинов через взаимодействие с рецепторами AGTR1 и AGTR2 с последующей активацией NF-κB. Это способствует повреждению альвеолоцитов и эндотелиоцитов, развитию интерстициального отека и инфильтрации легочной ткани [11].

Еще одним геном, который может потенциально влиять на тяжесть течения COVID-19, является ген AGTR2, который кодирует рецепторы ангиотензина II 2-го типа. Таким образом, можно допустить, что именно связывание SARSCoV-2 с AGTR2 напрямую и/или опосредовано через рецептор АПФ 2 приводит к дисбалансу ренин-ангиотензиновой системы, избыточному накоплению ангиотензина II и, как следствие, к более тяжелым формам заболевания [12].

Дипептидилпептидаза 4

Дипептидилпептидаза 4 является внутримембранным гликопротеином и сериновой экзопептидазой. Данный фермент участвует в расщеплении широкого спектра субстратов, включая хемокины, нейропептиды и инкретины (например, глюкагоноподобный пептид-1). DPP4 является поверхностным антигеном и известен также как CD26. DPP4 экспрессируется во многих органах и тканях, включая легкие, кишечник, плаценту, почки, а также в иммунных клетках. Ранее было обнаружено, что DPP4 играет роль в праймировании гликопротеина S в момент проникновения MERS-CoV в клетки хозяина [13], в настоящее время рассматривается его аналогичная роль в проникновении SARS-CoV-2 [14]. Был обнаружен однонуклеотидный полиморфизм гена DPP4 (rs13015258 – С аллель), который ассоциируется с очень высокой экспрессией и ростом летальности среди пациентов с COVID-19, страдающих сахарным диабетом типа 2 [9].

Toll-подобные рецепторы

Одна из важнейших функций врожденного иммунитета – распознавание клетками микробных компонентов, что определяет запуск первой линии защиты организма человека от вторжения болезнетворных организмов. TLR играют ключевую роль в процессе распознавания и активации иммунного ответа. У человека выявлено 10 подтипов этих рецепторов, каждый из которых ответственен за идентификацию различных структурных компонентов микробов. Вирус SARS-CoV-2, проникает в клетки, связывается с эндосомальными TLR 3-го и 7-го типов и цитоплазматическими РНК-рецепторами. Эти структуры играют важнейшую роль в распознавании вирусной РНК и инициации интерфероногенеза, как одного из основных компонентов врожденного иммунитета и противовирусной защиты. Каскад реакций происходит за счет активации NF-κB и IRF путей. В литературе встречаются ограниченные данные о низкой экспрессии гена X-хромосомы, кодирующего синтез TLR7, и со-

ответственно, сниженной активностью интерферонов I и II типов, которое сопровождалось развитием тяжелых форм COVID-19 у мужчин молодого возраста [15]. Помимо обнаружения генетической связи, которая может открыть новые возможности для изучения потенциальных методов лечения, это исследование, возможно, также дает объяснение наблюдаемой тенденции к более высокой смертности от COVID-19 у мужчин, чем у женщин. В X-хромосоме обнаружены ряд генов и регуляторных элементов, связанных с врожденным и адаптивным иммунным ответом [16].

Интерфероновый статус

Синтез эндогенного интерферона является универсальным эволюционно закрепленным механизмом защиты от вирусной инфекции. Отсроченная стимуляция экспрессии генов, ответственных за интерферогенез и противовирусный ответ, ассоциируется с тяжестью клинических проявлений инфекционных заболеваний. У умерших пациентов с инфекцией, вызванной MERS-CoV, уровень синтеза эндогенного интерферона был достоверно ниже, чем у выживших [17]. Активация этого пути связана с индукцией экспрессии нескольких сот генов, которые влияют на подавление вирусной репликации. Генные вариации, определяющие низкую функциональную активность интерфероновой системы 1 типа характеризуются развитием иммунодефицитных состояний и жизнеугрожающим течением вирусных инфекций.

Ряд работ продемонстрировали взаимосвязь тяжелого течения COVID-19 с низкой активностью этого пути. Zang [18] в своем исследовании, проанализировав геном 659 пациентов с тяжелым течением SARS-CoV-2 инфекции, выделил 13 генов-кандидатов, отвечающих за реализацию интерфероновой системы 1 типа. У 23 пациентов из 659 (3,5%) были обнаружены мутации, которые реализовывались сниженной активацией интерфероновой системы и характеризовались более тяжелым течением болезни. У этих пациентов была зафиксирована высокая вирусная нагрузка. Ранее было показано, что однонуклеотидный полиморфизм rs12252C/C в гене IFITM3 (кодирует интерферон-индуцированный трансмембранный белок 3) является фактором риска тяжелого течения гриппа [19]; данный полиморфизм – rs12252C/C, был также обнаружен у пациента с тяжелым течением COVID-19 [20].

Другой возможной причиной тяжелого течения SARS-CoV-2 инфекции может быть продукция нейтрализующих аутоантител [21]. Аутоантитела, направленные на блокирование регуляторных белков, в частности ИНФ- α и ИНФ- ω , были обнаружены у 101 из 987 пациентов (10,2%; из них 94% мужчины преимущественно старше 65 лет) с угрожающими для жизни состояниями в текущую пандемию. Продукция нейтрализующих аутоантител коррелировала с низкими плазменными концентрациями ИНФ- α .

Кроме того, аутоантитела к белкам ИНФ 1 типа не были обнаружены у 663 пациентов с бессимптомным или легким течением COVID-19, а в популяции здоровых индивидуумов, не инфицированных SARS-CoV-2 инфекцией, аутоантитела обнаружены в 0,33% случаев (4/1227 человек). Продукция аутоантител к ИНФ 2 типа, IL-6 и IL-17 были выявлены у здоровых людей, пациентов с аутоиммунными заболеваниями и оппортунистическими инфекциями, однако их роль в определении степени тяжести заболеваний еще до конца не ясна [22]. В данной литературе приводятся редкие случаи наследственно обусловленных состояний с аутоиммунным механизмом или иммунодефицитом, которые сопровождались гиперпродукцией или дефицитом белков интерфероновой системы 1 типа соответственно. Однако отмечены случаи, что у условно здоровых людей с низкой экспрессией генов, определяющих этот ответ, возможно клинически бессимптомное носительство этих геномных вариаций до момента контакта с определенными вирусами, что может объяснить причину тяжелого течения SARS-CoV-2 инфекции у пациентов без истории иммунодефицита в анамнезе [15]. Определение аутоантител к белкам интерфероновой системы 1 типа может быть полезно для определения терапевтической стратегии по ведению пациентов. При наличии аутоантител не будут эффективны препараты рекомбинантного ИНФ- β , а также этих пациентов нельзя рассматривать как доноров плазмы. Если это вариант с низкой экспрессией генов, ответственных за интерфероновый ответ 1 типа, у них наоборот, целесообразна терапия препаратами рекомбинантного интерферона.

Система HLA

Гены системы главного комплекса гистосовместимости HLA (Human Leukocyte Antigen) кодируют одноименные молекулы на поверхности клеток. Эти белковые структуры осуществляют презентацию различных антигенов, в том числе возбудителей вирусных инфекций, и определяют тяжесть течения многих заболеваний. Это самая полиморфная генетическая система человека (более 9000 аллелей) локализована на коротком плече хромосомы 6 [23]. Учитывая роль системы HLA в формировании иммунного ответа, полиморфизм генов главного комплекса гистосовместимости может определять предрасположенность и варианты течения инфекционных заболеваний. Так, известно, что более тяжелое течение гриппа H1N1 ассоциировано с генотипами HLA-A*11, HLA-B*35 и HLA-DRB1*10, а при ВИЧ-1 у носителей HLA-A*02:05 снижен риск сероконверсии [24]. Существует теория, что полиморфизм генов HLA формировался в периоды эпидемий инфекционных заболеваний, с селекцией аллелей с различной пептид-связывающей способностью. При этом гетерозиготы с различными молекулами HLA являются более приспособленными

к формированию иммунного ответа по сравнению с гомозиготами [25]. В 2003 году в эпидемию SARS-CoV была показана корреляция между полиморфизмом генов системы HLA и более тяжелым течением инфекции у носителей HLA-B*46:01. На основании этих данных был выполнен анализ *in silico* аффинности 145 генотипов HLA к белковым структурам SARS-CoV-2 [26]. Было показано, что генотип HLA-B*46:01 обладает самой низкой связывающей способностью с белками SARS-CoV-2, что может быть предиктором более тяжелого течения данного заболевания. Подобный ответ был спрогнозирован также для генотипов HLA-A*25:01 и HLA-C*01:02. В противоположность, генотипы HLA-B*15:03, HLA-A*02:02 и HLA-C*12:03 показали высокую активность к презентации антигенов SARS-CoV-2, что предполагает хороший протективный иммунитет.

В другом исследовании Tomita Y. и соавторы провели анализ *in silico*, основанный на распространенности полиморфизмов генов системы HLA и ассоциаций наиболее частых аллелей в странах с высокими показателями летальности от COVID-19 [27]. Авторы нашли возможные ассоциации между HLA-A*02:01 генотипом, определяющим сравнительно низкую связывающую способность с SARS-CoV-2 антигенами, по сравнению с индивидуумами с генотипом HLA-A*11:01 или HLA-A*24:01, развивающими более эффективный Т-клеточный опосредованный противовирусный ответ на инфекцию. Изучены самые частые HLA генотипы у людей во всем мире и было показано, что варианты HLA-A*02:01, HLA-C*07:01, HLA-DPB1*04:01, HLA-DQPB1*03:01 встречаются более чем у половины населения Земли. Затем выбрали 19 стран и разделили на две группы: первая – где эти аллельные варианты наиболее часто встречаются, вторая – с низкой частотой встречаемости данных генотипов. Затем был проведен корреляционный анализ между частотой распространенности данных генотипов и общим количеством подтвержденных случаев заболевания и смерти от COVID-19 на 1 млн населения. Носительство HLA-C, HLA-DPB1, HLA-DQPB1 генотипов не продемонстрировало принципиальных различий между странами по анализируемым показателям. Вместе с тем, в странах, где был более распространен генотип HLA-A*02:01 отмечалась статистически значимая более высокая заболеваемость COVID-19 (1842 случая/1 млн населения на 24 апреля 2020 и 5795/1 млн населения на 15 августа 2020) по сравнению со странами, где преобладал генотип HLA-A*24:02 и HLA-A*11:01 (97 случаев/1 млн населения на апрель 2020 и 419 случаев/1 млн населения август 2020), а также смертность – 98 против 2,5 случаев на апрель 2020 и 488 против 6,1 на август 2020 соответственно. Авторы двух представленных исследований предлагают одновременно проводить HLA-типирование и тестирование на COVID-19 для определения группы риска, а также вакцинировать

в первую очередь лиц с высоким риском в соответствии с данными генетического исследования.

Цитокиновый статус

Цитокины – это низкомолекулярные белки, которые являются сигнальными молекулами и через специфические рецепторы осуществляют кооперацию между различными клетками и системами в нормальных условиях, а также при возникновении патологических процессов. Цитокины являются ключевыми медиаторами воспалительной реакции и важны для защиты человека от широкого спектра вирусов, участвуя в регуляции как системы врожденного иммунитета, так и воспалительных процессов. Индивидуальный уровень цитокинов чрезвычайно вариабелен и генетический фактор оказывает значимый вклад в персональный профиль. В многочисленных исследованиях было показано, что полиморфизмы в генах, кодирующих цитокины, могут влиять на их транскрипционную активность, и, соответственно, уровень продукции [28]. В ряде случаев при воздействии инфекционных патогенов, аутоиммунных механизмах и неопластическом синдроме возможна гиперцитокинемия – неконтрольное высвобождение медиаторов воспаления, которое сопровождается иммунной дисфункцией, системным воспалительным процессом с повреждением собственных тканей и развитием полиорганной недостаточности [29]. Среди возможных стимулов для инициации цитокинового шторма установлена роль коронавирусов, и в частности SARS-CoV-2. У пациентов с COVID-19 и признаками цитокинового шторма установлены изменения продукции многих цитокинов: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α и TGF- β 1. Среди них наиболее типична гиперпродукция IL-6, IL-1 β , IL-10 и TNF α . Учитывая, что роль полиморфизма генов, кодирующих выработку цитокинов, была доказана для многих инфекционных заболеваний, включая малярию, грипп, менингококковую инфекцию и сепсис в ранее проведенных исследованиях [30, 31], варианты генов провоспалительных цитокинов являлись объектом изучения и при SARS-CoV-2 инфекции. Однако, ни один из ранее выявленных полиморфизмов генов провоспалительных цитокинов, связанных с более тяжелым течением заболеваний, не были воспроизведены в исследованиях при COVID-19. Так, в опубликованном исследовании случай-контроль у пациентов с SARS-CoV инфекцией не было выявлено взаимосвязи течения заболевания с полиморфизмом гена TNF- α [32], также не выявлено корреляции тяжести COVID-19 с генетическими вариантами этого гена в современном исследовании у 900 пациентов с инфекцией SARS-CoV-2 [33].

IL-6 является одним из провоспалительных цитокинов, уровень которого резко увеличивается у пациентов с COVID-19 [34]. Кроме того, его уровень рассматривается как прогностический фактор тяжести этого

заболевания. Более высокие уровни циркулирующего IL-6 наблюдаются у пациентов с респираторной дисфункцией, что позволяет предположить, что инфекция SARS-CoV-2 запускает цитокин-опосредованный механизм повреждения легких; эти пациенты достоверно чаще имели показания к проведению респираторной поддержки [35]. Генетические вариации, определяющие продукцию IL-6, рассматриваются как потенциальные детерминанты ответа клетки-хозяина на вторжение SARS-CoV-2 [36]. В исследованиях прошлых лет было показано, что мутации гена IL-6 (rs1800797 и rs1800795) ассоциируются с прогрессированием кардиоваскулярной патологии [37], а сочетанные полиморфизмы генов IL-6 (rs1800797), IL-10 (rs1800872) и С-реактивного белка (rs1205) коррелировали с тяжестью и прогнозом у пациентов с внебольничной пневмонией [38]. Однако, среди доступных для анализа данных по роли генетической предрасположенности к синтезу IL-6 при COVID-19 только одно исследование показало, что статус носителя аллеля IL-6 –174С связан с более высоким уровнем продукции IL-6 и более тяжелыми формами пневмонии в целом. Этот результат не отражает прямую зависимость тяжести заболевания с полиморфизмом генов, а подтверждает, что IL-6 играет ключевую роль в прогрессировании новой коронавирусной пневмонии [39]. Таким образом, более детальная информация о связи полиморфизма генов цитокинов, имеющих значение при SARS-CoV-2 инфекции, и тяжести течения COVID-19 требует дальнейших научных изысканий.

Фармакогенетические маркеры эффективности и безопасности терапии COVID-19

Генетические вариации пациентов с COVID-19 могут влиять не только на характер течения инфекции и тяжесть клинических проявлений, но и определять индивидуальный ответ на применяемые фармакологические препараты. В настоящем обзоре приводятся данные о лекарственных препаратах, рекомендованных для лечения COVID-19, и возможные изменения эффективности и безопасности терапии, связанные с полиморфизмами генов пациентов. Хотя в настоящее время нет данных фармакогенетических исследований у пациентов с COVID-19, существуют вероятные механизмы, с помощью которых можно предвидеть важные генетические детерминанты.

Гидроксихлорохин

Гидроксихлорохин – противомаларийное средство, производное 4-аминохинолина. Помимо лечения и профилактики малярии, за счет противовоспалительного и иммуносупрессивного действия включен в клинические рекомендации по фармакотерапии ревматоидного артрита и системной красной волчанки. Гидроксихлорохин один из первых препаратов этиотропной терапии, который был включен в протоколы лечения COVID-19. Механизм

противовирусного действия гидроксихлорохина при COVID-19 пока не ясен. Предположительно, препарат препятствует проникновению вируса внутрь клетки, нарушая процессы эндоцитоза. Кроме того, гидроксихлорохин может напрямую влиять на взаимодействие между SARS-CoV-2 и АПФ 2 за счет снижения гликозилирования АПФ 2 [40]. Иммуносупрессивный эффект проявляется снижением продукции провоспалительных цитокинов, что также может оказать благоприятное действие при гипериммунном ответе при COVID-19. Эффективность и безопасность гидроксихлорохина связана с фармакокинетикой препарата. Препарат метаболизируется в печени системой CYP P450 с участием ферментов CYP2D6, CYP2C8, CYP1A1 и CYP3A4. Генетические полиморфизмы ферментов влияют на скорость метаболизма и, соответственно, на фармакологический ответ. В ранее проведенных исследованиях, аллели CYP2C8*2, CYP2C8*3, CYP2C8*4 снижали активность и емкость ферментов *in vitro* по сравнению с аллелем дикого типа CYP2C8*1A, что приводило к отсроченному образованию активных метаболитов препарата и снижению терапевтического ответа [42]. Полиморфизм CYP2D6 (rs1135840 and rs1065852) индуцирует метаболизм гидроксихлорохина у пациента с системной красной волчанкой [41]. Однонуклеотидные полиморфизмы гена, кодирующего синтез глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (rs5030868, rs1050828 и rs1050829), связаны со снижением активности фермента и повышенным риском гемолиза [43].

Ремдесивир

Ремдесивир – противовирусный препарат, является аденозиновым нуклеотидным пролекарством, которое метаболизируется в клетках организма с образованием активного метаболита нуклеозидтрифосфата. Ремдесивира трифосфат выступает в качестве аналога АТФ и конкурирует с природным АТФ-субстратом за включение в формирующиеся РНК-цепи с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса SARS-CoV-2, что приводит к задержанному обрыву цепи во время репликации вирусной РНК [44]. Ремдесивир подвергается серийному метаболизму, опосредованному внутриклеточными эстеразами и фосфоамидазой, что приводит к образованию основного метаболита ремдесивира. Фармакогенетические исследования ремдесивира на сегодняшний день не опубликованы, но исследования *in vitro* показывают, что он является субстратом для ферментов CYP2C8, CYP2D6 и CYP3A4, а также субстратом для транспортеров OATP1B1 и P-гликопротеина [45]. Таким образом, известные полиморфизмы этих генов теоретически могут влиять на фармакокинетику ремдесивира [46].

Фавипиравир

Фавипиравир был разработан и одобрен в Японии в 2014 году для лечения и профилактики гриппа

и в настоящее время исследуется его эффективность при COVID-19. Опубликованных исследований, посвященных фармакогенетике фавипиравира, нет. Возможные пути изменения его эффективности могут быть связаны с конкурентным метаболизмом альдегидоксидазного пути, который является основным для его дезактивации [47].

Интерферон β -1b

Применение препаратов интерферонов, в частности ИФН- β 1b, продемонстрировало эффективность в лечении коронавирусной инфекции SARS и/или MERS и в настоящее время изучается при COVID-19 [48]. Изменение эффективности и повышение риска побочных эффектов препаратов ИФН- β -1b, связанных с фармакогенетическими факторами, не установлено. Однако в когорте шведских пациентов с рассеянным склерозом, получавших ИФН- β 1b, риск образования биологически значимых нейтрализующих антител был выше у пациентов с аллелем HLA-DRB1*04 (OR: 3,53, 95% ДИ: 1,64–7,61) и ниже с HLA-DRB1*15 (ОШ: 0,33, 95% ДИ: 0,16–0,71) [49].

Тоцилизумаб

Тоцилизумаб – ингибитор рецепторов к IL-6, активно используется в качестве биологической терапии ревматоидного артрита. Учитывая доказанную роль гиперпродукции IL-6 в патогенезе тяжелого течения COVID-19, применение препаратов, блокирующих эффекты IL-6, является обоснованным. Ранее сообщалось о генетических биомаркерах эффективности тоцилизумаба при ревматоидном артрите, включая вариации FCGR3A, IL6R, CD69, GALNT1845–47. У 87 пациентов с ревматоидным артритом, получавших тоцилизумаб, и генотипом FCGR3Ars396991TT показан лучший ответ через 12 месяцев (по сравнению с GT; OR: 5,1; 95% ДИ: 1,2–21,3; $p = 0,03$). Этот вариант может влиять на сродство Fc-фрагмента рецептора IgG к тоцилизумабу и изменять его системный клиренс [50].

На данный момент существует ограниченное доказательство того, что фармакогеномные биомаркеры могут помочь в определении ответа на терапию тоцилизумабом при COVID-19 и перевод этих данных на течение COVID-19 является некорректным. Также нет исследований, посвященных фармакогенетике тоцилизумаба у пациентов с синдромом гиперпродукции цитокинов, который был бы близок к патофизиологии COVID-19. Вместе с тем, идентификация маркеров ответа на тоцилизумаб при SARS-CoV-2 может позволить провести индивидуальную таргетную терапию и у ряда пациентов с предикторами неэффективности терапии не использовать иммунодепрессанты для лечения вирусного заболевания. Еще одним важным аспектом необходимости этих исследований, является экономический фактор.

Ингибиторы янус-киназ

Тофацитиниб и барицитиниб – другие биологически активные препараты, блокирующие гиперцитокиновый ответ и одобренные к применению при COVID-19. В настоящее время не опубликованы данные по фармакогенетике этих препаратов. Однако, их фармакокинетические параметры включают несколько потенциально важных генов-кандидатов. Оба препарата являются субстратами для CYP3A4. Тофацитиниб также частично метаболизируется CYP2C19. Оба гена ферментов метаболизма подвержены генетическим полиморфизмам, что может изменять активность препаратов [51].

Системные глюкокортикостероиды

Глюкокортикостероиды (ГКС) являются мощными неспецифическими противовоспалительными и иммуносупрессивными препаратами. В лечении пациентов, инфицированных COVID-19, они применяются в терапии острого респираторного дистресс-синдрома. Фармакогенетических предикторов эффективности системных ГКС при ОРДС не выявлено. Однако, возможные варианты фармакологического ответа могут быть связаны с рецепторной активностью, а также фармакокинетических путей через активность ферментов метаболизма и белков-транспортеров [52]. Метаболизм ГКС осуществляется в печени с участием изоферментов CYP3A4 и CYP3A7, а также в легочной ткани под действием CYP3A5 и CYP3A7 [53]. Полиморфизм CYP3A4*22 гена, кодирующего CYP3A4, может изменять активность изофермента и, соответственно, влиять на эффективность терапии. Так в ранее проводимых исследованиях было показано, что у гетерозигот с генотипом CYP3A4*22 T (C/T) эффективность терапии глюкокортикостероидами была выше по сравнению с генотипом C/C [54].

Еще один фармакокинетический фактор, который может изменить эффективность и безопасность терапии глюкокортикостероидами, это экспрессия Р-гликопротеина. Его уровень активности связан с генетическим полиморфизмом гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 (ABCB1), что может повлиять на терапевтический ответ [55]. Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов кодируется геном NR3C1. Целый ряд научных исследований посвящен изучению полиморфизма данного гена, известно около 40 генных вариантов, кодирующих синтез этих рецепторов [56]. Индивидуальная вариабельность может определять эффективность и безопасность терапии глюкокортикостероидами [57]. Кроме того, аффинность глюкокортикоидных рецепторов может изменяться под действием провоспалительных цитокинов, IL-1 и TNF- α [58], что возможно может являться фактором эффективности терапии этими препаратами при COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря объединенным усилиям и согласованным действиям в борьбе с новой коронавирусной инфекцией, обеспечивается глобальный доступ к вакцинам, современным средствам диагностики и эффективным лекарственным препаратам для всех нуждающихся в них людей. Однако борьба с COVID-19 продолжается. Научные изыскания, детализирующие механизмы заражения SARS-CoV-2, вариабельность тяжести течения заболевания и индивидуальные особенности терапевтического ответа на применяемые препараты, не теряют свою актуальность и имеют большую социальную значи-

мость. Генетически обусловленная гетерогенность иммунного ответа на SARS-CoV-2 инфекцию требует дальнейшего изучения, так как нет однозначного мнения о ведущем механизме, который определяет тяжесть заболевания. Результаты исследований по поиску генетических предикторов тяжести болезни и эффективности фармакотерапии COVID-19 могут стать основой для направлений дальнейшего поиска, а также использоваться для разработки стратегии предупреждения инфекции, анализу потенциальных мишеней таргетной терапии и разработки протоколов оптимизации фармакотерапии этого заболевания.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

И.Н. Шишиморов – планирование и редактирование обзора; О.В. Магницкая – поиск материала и редактирование обзора; Ю.В. Пономарева – поиск материала и написание обзора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Oran D.P., Topol E.J. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review // *Annals of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 173, No. 5. – P. 362–367. DOI: 10.7326/M20-3012.
2. Armstrong R.A., Kane A.D., Kursumovic E., Oglesby F.C., Cook T.M. Mortality in patients admitted to intensive care with COVID-19: an updated systematic review and meta-analysis of observational studies // *Anaesthesia*. – 2021. – Vol. 76, No. 4. – P. 537–548. DOI: 10.1111/anae.15425.
3. Gebhard C., Regitz-Zagrosek V., Neuhauser, H.K., Morgan R., Sabra L. Klein Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe // *Biology of Sex Differences*. – 2020. – Vol. 11, No.1. – P. 29. DOI: 10.1186/s13293-020-00304-9.
4. Izquierdo J.L., Ancochea J., Soriano J.B. Clinical Characteristics and Prognostic Factors for Intensive Care Unit Admission of Patients With COVID-19: Retrospective Study Using Machine Learning and Natural Language Processing // *Journal of Medical Internet Research*. – 2020. – Vol. 22, No. 10. – e21801. DOI: 10.2196/21801.
5. Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L., Invernizzi P., Fernández J., Prati D. et al. Genomewide association study of severe with respiratory failure // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, No.16. – P. 1522–1534. DOI: 10.1056/NEJMoa2020283.
6. The COVID-19 Host Genetics Initiative. The COVID-19 Host Genetics Initiative, a global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-CoV-2 virus pandemic. // *European Journal of Human Genetics*. – 2020. – No.28. – P. 715–718. DOI: 0.1038/s41431-020-0636-6.
7. Shulla A., Heald-Sargent T., Subramanya G., Zhao J., Perlman S., Gallagher T. A. Transmembrane Serine Protease Is Linked to the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor and Activates Virus Entry // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85, No. 2. – P. 873–882. DOI: 10.1128/JVI.02062-10.
8. Zhou Y., Vedantham P., Lu K., Agudelo J., Carrion R. Jr., Nunneley J.W., Barnard D., Pöhlmann S., McKerrow J.H., Renslo A.R., Simmons G. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry // *Antiviral Research*. – 2015. – Vol. 116. – P. 76–84. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.01.011.
9. Senapati S., Kumar S., Singh A.K., Banerjee P., Bhagavatula S. Assessment of risk conferred by coding and regulatory variations of TMPRSS2 and CD26 in susceptibility to SARS-CoV-2 infection in human // *Journal of genetics*. – 2020. – Vol. 99, No.1. – P. 53. DOI: 10.1007/s12041-020-01217-7.
10. Irham L.M., Chou W.H., Calkins M.J., Adikusuma W., Hsieh S.L., Chang W.C. Genetic variants that influence SARS-CoV-2 receptor TMPRSS2 expression among population cohorts from multiple continents // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – Vol. 529, No. 2. – P. 263–269. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.05.179.
11. Devaux C.A., Pinault L., Osman I.O., Raoult D. Can ACE2 Receptor Polymorphism Predict Species Susceptibility to SARS-CoV-2? // *Frontiers in Public Health*. – 2020. – Vol. 8. – P. 608765. DOI: 10.21203/rs.3.rs-25753/v1.
12. Cui C., Huang C., Zhou W., Ji X., Zhang F., Wang L., Zhou Y., Cui Q. AGTR2, one possible novel key gene for the entry of SARS-CoV-2 into human cells // *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. – 2020. – P. 1–1. DOI: 10.1109/TCBB.2020.3009099.
13. Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Müller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A., Zaki A., Fouchier R.A., Thiel V., Drosten C., Rottier P.J., Osterhaus A.D., Bosch B.J., Haagmans B.L. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC // *Nature*. – 2013. – Vol. 495, No. 7440. – P. 251–254. DOI: 10.1038/nature12005.
14. Ibrahim I.M., Abdelmalek D.H., Elshahat M.E., Elfiky A.A. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction // *Journal of Infection*. – 2020. – Vol. 80, No. 5. – P. 554–562. DOI: 10.21203/rs.2.24599/v1.
15. Van der Made C.I., Simons A., Schuurs-Hoeijmakers J., van den Heuvel G., Mantere T., Kersten S., et al. Presence of

- genetic variants among young men with severe COVID-19 // *JAMA*. – 2020. – Vol. 324, No. 7. – P. 1–11. DOI: 10.1001/jama.2020.13719.
16. Schurz H., Salie M., Tromp G., Hoal E.G., Kinnear C.J., Möller M. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility // *Human Genomics*. – 2019. – Vol. 13, No. 1. – P. 2. DOI: 10.1186/s40246-018-0185-z.
 17. Hadjadj J., Yatim N., Barnabei L., Corneau A., Boussier J., Smith N., et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients // *Science*. – 2020. – Vol. 369, No. 6504. – P. 718–724. DOI: 10.1126/science.abc6027.
 18. Zhang Q., Bastard P., Liu Z., Le Pen J., Moncada-Velez M., Chen J., et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19 // *Science*. – 2020. – Vol. 370, No. 6515. – P. 4570. DOI: 10.1126/science.abd4570.
 19. Prabhu S.S., Chakraborty T.T., Kumar N., Banerjee I. Association between IFITM3 rs12252 polymorphism and influenza susceptibility and severity: A meta-analysis // *Gene*. – 2018. – Vol. 674. – P. 70–79. DOI: 10.1016/j.gene.2018.06.070.
 20. Zhang Y., Qin L., Zhao Y., Zhang P., Xu B., Li K., Liang L., Zhang C., Dai Y., Feng Y., Sun J., Hu Z., Xiang H., Knight J.C., Dong T., Jin R. Interferon-Induced Transmembrane Protein 3 Genetic Variant rs12252-C Associated With Disease Severity in Coronavirus Disease 2019 // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 222, No. 1. – P. 34–37. DOI: 10.1093/infdis/jiaa2433.
 21. Bastard P., Rosen L.B., Zhang Q., Michailidis E., Hoffmann H.H., Zhang Y., et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19 // *Science*. – 2020. – Vol. 370, No. 6515. – P. 4585. DOI: 10.1126/science.abd4585.
 22. Ku C.L., Chi C.Y., von Bernuth H., Doffinger R. Autoantibodies against cytokines: phenocopies of primary immunodeficiencies? // *Human Genetics*. – 2020. – Vol. 139, No. 6–7. – P. 783–794. DOI: 10.1007/s00439-020-02180-0.
 23. Choo S.Y. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications // *Yonsei medical journal*. – 2007. – Vol. 48, No.1. – P. 11–23. DOI: 10.3349/ymj.2007.48.1.11.
 24. Shi Y., Wang Y., Shao C., et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses // *Cell Death Differ.* – 2020. – Vol. 27, No.5. – P. 1451–1454. DOI: 10.1038/s41418-020-0530-3.
 25. Трошина Е.А., Юкина М.Ю., Нуралиева Н.Ф., Мокрышева Н.Г. Роль генов системы HLA: от аутоиммунных заболеваний до COVID-19 // *Проблемы эндокринологии*. – 2020. – Т. 66, № 4. – С. 9–15. DOI: 10.14341/probl12.
 26. Nguyen A., David J.K., Maden S.K., Wood M.A., Weeder B.R., Nellore A., Thompson R.F. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 // *Journal of Virology*. – 2020. – Vol. 94, No.13. – e00510-20. DOI: 10.1128/JVI.00510-20.
 27. Tomita Y., Ikeda T., Sato R., Sakagami T. Association between HLA gene polymorphisms and mortality of COVID-19: An in silico analysis // *Immunity, Inflammation and Disease*. – 2020. – Vol. 8, No.4. – P. 684–694. DOI: 10.1002/iid3.358.
 28. Vandembroek K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2012. – Vol. 32, No. 4. – P. 139–151. DOI: 10.1089/jir.2011.0103.
 29. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine storm. // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, No.23. – P. 2255–2273. DOI: 10.1056/NEJMra2026131.
 30. Vollmer-Conna U., Piraino B.F., Cameron B., Davenport T., Hickie I., Wakefield D., Lloyd A.R. Cytokine polymorphisms have a synergistic effect on severity of the acute sickness response to infection // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 47, No.11. – P. 1418–1425. DOI: 10.1086/592967.
 31. Chiche, J.D., Siami, S., Dhainaut, J.F., Mira J.P. Cytokine Polymorphisms and Susceptibility to Severe Infectious Diseases // *Sepsis*. – 2011. – Vol. 4, No.3. – P. 209–215. DOI: 10.1023/A:1013222407924.
 32. Wang S., Wei M., Han Y., Zhang K., He L., Yang Z., Su B., Zhang Z., Hu Y., Hui W. Roles of TNF- α gene polymorphisms in the occurrence and progress of SARS-Cov infection: A case-control study // *BMC Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 8, No.1. – P. 27. DOI: 10.1186/1471-2334-8-27.
 33. Saleh A., Sultan A., Elashry M.A., Farag A., Mortada M.I., Ghannam M.A., Saed A.M., Ghoneem S. Association of TNF- α G-308 A Promoter Polymorphism with the Course and Outcome of COVID-19 Patients // *Immunological Investigations*. – 2020. – P. 1–12. DOI: 10.1080/08820139.2020.1851709.
 34. Grifoni E., Valoriani A., Cei F., Lamanna R., Gelli A., Ciambotti B., Vannucchi V., Moroni F., Pelagatti L., Tarquini R., Landini G., Vanni S., Masotti L. Interleukin-6 as prognosticator in patients with COVID-19 // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 81, No. 3. – P. 452–482. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.06.008.
 35. Herold T., Jurinovic V., Arnreich C., Lipworth B.J., Hellmuth J.C., von Bergwelt-Baildon M., Klein M., Weinberger T. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19 // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2020. – Vol. 146, No. 1. – P. 128–136. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.05.008.
 36. Kirtipal N., Bharadwaj S. Interleukin 6 polymorphisms as an indicator of COVID-19 severity in humans // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2020. – Vol. 39, No.12. – P. 4563–4565. DOI: 10.1080/07391102.2020.1776640.
 37. González-Castro T.B., Hernández-Díaz Y., Pérez-Hernández N., Tovilla-Zárate C.A., Juárez-Rojop I.E., López-Narvaez M.L., Blachman-Braun R., Posadas-Sánchez R., Vargas-Alarcón G., García-Flores E., Cazarín-Santos B.G., Borgonio-Cuadra V.M., Reyes-López P.A., Rodríguez-Pérez J.M. Interleukin 6 (rs1800795) gene polymorphism is associated with cardiovascular diseases: a meta-analysis of 74 studies with 86,229 subjects // *EXCLI Journal*. – 2019. – Vol. 18. – P. 331–355. DOI: 10.17179/excli2019-1248.
 38. Chou S.C., Ko H.W., Lin Y.C. CRP/IL-6/IL-10 Single-Nucleotide Polymorphisms Correlate with the Susceptibility and Severity of Community-Acquired Pneumonia // *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. – 2016. – Vol. 20, No.12. – P. 732–740. DOI: 10.1089/gtmb.2016.0156.
 39. Ulhaq Z.S., Soraya G.V. Anti-IL-6 Receptor Antibody Treatment for Severe COVID-19 and the Potential Implication of IL-6 Gene Polymorphisms in Novel Coronavirus Pneumonia // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 155, No. 12. – P. 548–556. DOI: 10.1016/j.medcli.2020.07.002.
 40. Liu J., Cao R., Xu M. Wang X., Zhang H., Hu H., Li Y., Hu Z., Zhong W., Wang M. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro // *Cell Discovery*. – 2020. – Vol. 6. – 16p. DOI: 10.1038/s41421-020-0156-0.
 41. Lee J.Y., Vinayagamoorthy N., Han K., Kwok S.K., Ju J.H., Park K.S., Jung S.H., Park S.W., Chung Y.J., Park S.H. Association of Polymorphisms of Cytochrome P450 2D6 With Blood Hydroxychloroquine Levels in Patients With Systemic Lupus Erythematosus // *Arthritis & Rheumatology*. – 2016. – Vol. 68, No.1. – P. 184–190. DOI: 10.1002/art.39402.

42. Elewa H., Wilby K.J. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implications // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2017. – Vol. 42, No. 5. – P. 745–756. DOI: 10.1007/s13318-016-0399-1.
43. Sortica V.A., Lindenau J.D., Cunha M.G., Ohnishi M.D., Ventura A., Ribeiro-Dos-Santos Â.K., Santos S.E., Guimarães L.S., Hutz M.H. The effect of SNPs in CYP450 in chloroquine/primaquine Plasmodium vivax malaria treatment // *Pharmacogenomics*. – 2016. – Vol. 17, No.17. – P. 1903–1911. DOI: 10.2217/pgs-2016-0131.
44. Beigel J.H., Tomashek K.M., Dodd L.E., Mehta A.K., Zingman B.S., Kalil A.C., et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 – Final Report // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, No. 19. – P. 1813–1826. DOI: 10.1056/NEJMoa2007764.
45. Singh A.K., Singh A., Singh R., Misra A. Remdesivir in COVID-19: A critical review of pharmacology, pre-clinical and clinical studies // *Diabetology & Metabolic Syndrome*. – 2020. – Vol. 14, No.4. – P. 641–648. DOI: 10.1016/j.dsx.2020.05.018.
46. Takahashi T., Luzum J.A., Nicol M.R., Jacobson P.A. Pharmacogenomics of COVID-19 therapies // *npj Genomic Medicine*. – 2020. – Vol. 5, No.35. DOI: 10.1038/s41525-020-00143-y.
47. Du Y.-X., Chen X.-P. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2020. – Vol. 108, No.2. – P. 242–247. DOI: 10.1002/cpt.1844.
48. Bhimraj A., Morgan R.L., Shumaker A.H., Lavergne V., Baden L., Cheng V.C., Edwards K.M., Gandhi R., Muller W.J., O'Horo J.C., Shoham S., Murad M.H., Mustafa R.A., Sultan S., Falck-Ytter Y. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19 // *Clin Infect Dis*. – 2020. – c1aa478. DOI: 10.1093/cid/ciaa478.
49. Link J., Lundkvist Ryner M., Fink K., Hermanrud C., Lima I., Brynedal B., et al. Human Leukocyte Antigen Genes and Interferon Beta Preparations Influence Risk of Developing Neutralizing Anti-Drug Antibodies in Multiple Sclerosis // *PLOS One* – 2014. – Vol. 9, No. 3. – e90479. DOI: 10.1371/journal.pone.0090479.
50. Jiménez Morales A., Maldonado-Montoro M., Martínez de la Plata J.E., Pérez Ramírez C., Daddaoua A., Alarcón Payer C., Expósito Ruiz M., García Collado C. FCGR2A/FCGR3A Gene Polymorphisms and Clinical Variables as Predictors of Response to Tocilizumab and Rituximab in Patients With Rheumatoid Arthritis // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2019. – Vol. 59, No. 4. – P. 517–531. DOI: 10.1002/jcph.1341.
51. Gaedigk A., Ingelman-Sundberg M., Miller N.A., Leeder J.S., Whirl-Carrillo M., Klein T.E. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2018. – Vol. 103, No. 3. – P. 399–401. DOI: 10.1002/cpt.910.
52. Song Q.Q., Xie W.Y., Tang Y.J., Zhang J., Liu J. Genetic variation in the glucocorticoid pathway involved in interindividual differences in the glucocorticoid treatment // *Pharmacogenomics*. – 2017. – Vol. 18, No. 3. – P. 293–316. DOI: 10.2217/pgs-2016-0151.
53. Koch I., Weil R., Wolbold R., Brockmöller J., Hustert E., Burk O., Nuessler A., Neuhaus P., Eichelbaum M., Zanger U., Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2002. – Vol. 30, No. 10. – P. 1108–1114. DOI: 10.1124/dmd.30.10.1108.
54. Stockmann C., Fassl B., Gaedigk R., Nkoy F., Uchida D.A., Monson S., Reilly C.A., Leeder J.S., Yost G.S., Ward R.M. Fluticasone propionate pharmacogenetics: CYP3A4*22 polymorphism and pediatric asthma control. // *The Journal of Pediatrics*. – 2013. – Vol. 162, No. 6. – P. 1222–1227. DOI: 10.1016/j.jpeds.2012.11.031.
55. Cuppen B.V., Pardali K., Kraan M.C., Marijnissen A.C., Yrlid L., Olsson M., Bijlsma J.W., Lafeber F.P., Fritsch-Stork R.D. Polymorphisms in the multidrug-resistance 1 gene related to glucocorticoid response in rheumatoid arthritis treatment. // *Rheumatology International*. – 2017. – Vol. 37, No. 4. – P. 531–536. DOI: 10.1007/s00296-017-3653-1.
56. Bray P.J., Cotton R.G. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms // *Human Mutation*. – 2003. – Vol. 21, No. 6. – P. 557–68. DOI: 10.1002/humu.10213.
57. Kaymak C.M., Karabulut H.G., Yurur Kutlay N., Ruhi I.H., Tükün A., Olcay L. Association between N363S and Bcl polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and glucocorticoid side effects during childhood acute lymphoblastic leukemia treatment // *Turkish Journal of Hematology*. – 2017. – Vol. 34, No. 2. – P. 151–158. DOI: 10.4274/tjh.2016.0253.
58. Lu N.Z., Cidlowski J.A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 1024. – P. 102–123. DOI: 10.1196/annals.1321.008.

АВТОРЫ

Шишиморов Иван Николаевич – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой педиатрии и неонатологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6098-7028. E-mail: drshishimorov@gmail.com

Магницкая Ольга Валерьевна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры педиатрии и неонатологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ

ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6670-9029. E-mail: magol73@yandex.ru

Пономарева Юлия Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры педиатрии и неонатологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8348-2329. E-mail: ju.ponomareva@gmail.com

УДК 615.32:547.9+543.544



ВОПРОСЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ

В.А. Куркин, Т.К. Рязанова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Получено 15.02.2021

Принята к печати 16.05.2021

Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.), фармакопейным сырьем которой являются корневища и корни, применяется в официальной медицине для получения лекарственных препаратов с адаптогенной активностью. Одной из распространенных проблем при производстве лекарственных препаратов из корневищ и корней родиолы розовой является использование недоброкачественного лекарственного растительного сырья, что приводит к отсутствию значимых биологически активных соединений в препаратах. Одной из возможных причин являются недостатки в существующих подходах к стандартизации сырья и препаратов родиолы розовой.

Цель. Совершенствование существующих подходов к стандартизации лекарственных препаратов корневищ и корней родиолы розовой.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали экспериментальные и промышленные образцы экстракта жидкого корневищ и корней родиолы розовой, а также стандартные образцы розавина и салидрозида. ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: метод – обращенно-фазовая хроматография в изократическом режиме (стальная колонка «КАХ-6-80-4», размер 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм); подвижная фаза – ацетонитрил : 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 14:86; скорость элюирования – 100 мкл/мин; объем элюента – 2000 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 252 нм (розавин) и 278 нм (салидрозид).

Результаты. С использованием метода ВЭЖХ разработана методика количественного определения розавина и салидрозида в жидком экстракте родиолы розовой. Определено, что содержание розавина в образцах жидких экстрактов, полученных из корневищ и корней родиолы розовой фармакопейного качества, варьирует от 0,21%±0,03% до 0,32%±0,04%; салидрозида – от 1,13%±0,05% до 2,71%±0,12% соответственно. Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата определения розавина и салидрозида в препаратах родиолы розовой с доверительной вероятностью 95% не превышает ±6,0%.

Заключение. Таким образом, в работе обосновываются методологические подходы к анализу лекарственных препаратов корневищ и корней родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), заключающиеся в количественном определении доминирующих и диагностически значимых биологически активных соединений – розавина и салидрозида.

Ключевые слова: родиола розовая; *Rhodiola rosea* L.; корневища и корни; жидкий экстракт; розавин; салидрозид; высокоэффективная жидкостная хроматография

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ТСХ – тонкослойная хроматография; УФ – ультрафиолетовая область; ФС – фармакопейная статья; ОФС – общая фармакопейная статья; ЯМР – ядерный магнитный резонанс

STANDARDIZATION PROBLEMS OF MEDICINAL PREPARATIONS FROM *RHODIOLA ROSEA* L.

V.A. Kurkin, T.K. Ryazanova

Samara State Medical University,
89, Chapayevskaya Str., Samara, Russia, 443099

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Received 15 Feb 2021

Accepted 16 May 2021

Для цитирования: В.А. Куркин, Т.К. Рязанова. Вопросы стандартизации лекарственных препаратов родиолы розовой. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):185-194. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-185-194

© В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, 2021

For citation: V.A. Kurkin, T.K. Ryazanova. Standardization problems of medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):185-194. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-185-194

Rhodiola rosea L. rhizomes and roots are pharmacopoeial raw materials, which are used in official medicine for obtaining medicines with adaptogenic activity. One of the most common problems in the production of medicines from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots is the use of poor quality medicinal plant materials, which leads to the absence of biologically significant compounds in the preparations. One of the possible reasons is the shortcomings in the existing approaches to the standardization of *Rhodiola rosea* L. raw materials and preparations.

The aim of the study is the improvement of approaches to the standardization of medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots.

Materials and methods. Experimental and industrial samples of liquid extract from *Rhodiola rosea* L. roots, as well as reference samples of rosavin and salidroside, were used as materials of the research. The HPLC analysis was carried out using a Milichrom-6 chromatograph (NPAO Nauchpribor) under the following conditions of reversed-phase chromatography in an isocratic mode: a steel column KAKH-6-80-4 (2 mm x 80 mm; Separon-C18 7 μ m), a mobile phase – acetonitrile: 1% solution of acetic acid in water in the ratio of 14:86, the elution rate was 100 μ L/min, the eluent volume was 2000 μ L. The constituents were detected at the wavelength of 252 nm (rosavin) and 278 nm (salidroside).

Results. An assay of rosavin and salidroside in the liquid extract of *Rhodiola rosea* L. was developed using the HPLC method. It was determined that the content of rosavin in the samples of the liquid extracts obtained from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots of the pharmacopoeial quality, varied from 0.21% \pm 0.03% to 0.32% \pm 0.04%, salidroside – from 1.13% \pm 0.05% to 2.71% \pm 0.12%, respectively. The results of statistical processing indicate that the relative error of the average result for the determination of rosavin and salidroside in the preparations of *Rhodiola rosea* L. with a confidence level of 95% does not exceed \pm 6.0%.

Conclusion. Thus, methodological approaches to the analysis of medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots have been substantiated. These methodological approaches consist of the quantitative determination of the dominant and diagnostically significant biologically active compounds – rosavin and salidroside.

Keywords: *Rhodiola rosea* L.; rhizomes and roots; liquid extract; rosavin; salidroside; high performance liquid chromatography

Abbreviations: HPLC – high performance liquid chromatography; TLC – thin-layer chromatography; UV – ultraviolet; PM – pharmacopoeial monograph; GPM – general pharmacopoeial monograph; NMR – nuclear magnetic resonance

ВВЕДЕНИЕ

Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.), фармакопейным сырьем которой являются корневища и корни, применяется в официальной медицине для получения лекарственных препаратов с адаптогенной активностью. [1–6]. Виды рода *Rhodiola* sp. уже длительное время используются в качестве адаптогенов в России и странах Северной Европы. В последнее время для препаратов родиолы розовой также выявлен целый ряд новых фармакологических свойств, а именно: антиоксидантная, анксиолитическая, ноотропная, антидепрессантная, иммуномодулирующая активность [7–13]. Имеются сообщения, что препараты родиолы розовой повышают физическую выносливость, снижают утомляемость и оказывают терапевтическое действие при нарушениях желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы и центральной нервной системы. В отдельных исследованиях показано, что препараты родиолы розовой подавляют рост злокачественных новообразований. В то же время ассортимент лекарственных препаратов на основе корневищ и корней родиолы розовой, разрешенных к применению в Российской Федерации, представлен только экстрактом родиолы жидким разных производителей¹. Экстракт родиолы жидкий разрешен к применению с 1975 г. и рекомендуется в качестве адаптогенного и тонизирующего средства, не уступающего по своей активности препаратам женьшеня [14].

Фитохимические исследования показали, что биологическая активность сырья и препаратов родиолы розовой обусловлена шестью классами соедине-

ний: фенилпропаноиды, флавоноиды, фенолоспирты, фенольные кислоты, монотерпены и стерины. Основными биологически активными соединениями, обуславливающими фармакологическую активность сырья и препаратов родиолы розовой, являются фенилпропаноиды (розавин, розин, розарин) и фенолоспирты (тирозол, салидрозид) [15–20]. Для фенилпропаноидов известна антиоксидантная, нейростимулирующая, адаптогенная активность. С наличием фенолоспиртов также связывают адаптогенную активность сырья и препаратов родиолы розовой.

Стандартизация сырья и препаратов родиолы розовой в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни» и ФС.3.4.0008.18 «Родиолы розовой корневищ и корней экстракт жидкий») предусматривает количественное определение содержания салидрозида и суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин^{2,3} [21]. Анализ проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием (219 нм – определение салидрозида, 250 нм – определение суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин) с применением колонки 250 x 4,0 мм, эндкепированный октадецилсилил (С18) силикагель для хроматографии, 5 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил : фосфатный буфер (рН 7,0), элюирование в градиентном режиме с увеличением концентрации ацетонитрила от 11% до 60%, скорость элюирования – 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы – 10 мкл. Время хроматографирования – 35 мин.

² ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни».

³ ФС.3.4.0008.18 «Родиолы розовой корневищ и корней экстракт жидкий».

¹ Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.

В то же время вызывает сомнение целесообразность определения суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин. Розавин является наиболее лабильным соединением, который по сравнению с другими гликозидами коричневого спирта более чувствителен к условиям получения и хранения сырья в связи с возможностью ферментативного разрушения под воздействием фермента вицианоцидазы [1, 2]. Вицианоцидаза способствует отщеплению вицианозы – углеводного фрагмента молекулы розавина – и проявляет максимальную активность в температурном интервале 40–60°C, который ранее рекомендовался для сушки сырья родиолы. Хранение недосушенных корневищ, экстракция свежего сырья этанолом при комнатной температуре также способствует разрушающему действию ферментов на состав биологических активных компонентов. Разрушение розавина приводит к образованию биологически неактивного коричневого спирта, соответственно снижается фармакологическая активность сырья и препаратов родиолы розовой [1, 2].

В связи с этим в целях стандартизации сырья более концептуально верным подходом, на наш взгляд, является количественное определение содержания не суммы гликозидов коричневого спирта, а наиболее уязвимого компонента – розавина. Уровень его содержания надежно отражает правильность условий хранения и сушки корневищ и корней родиолы розовой [1, 2].

Эти предположения подтверждаются результатами выборочного контроля качества сырья и препаратов (экстракты, гранулированные порошки) родиолы розовой [22–26]. Booker A. и соавт. в результате анализа 40 коммерческих продуктов родиолы розовой разных поставщиков, представленных на рынке Европейского Союза, выявили, что примерно одна пятая часть этих продуктов не содержит розавин, один из основных компонентов родиолы розовой. Более того, некоторые продукты не содержали салидрозид, компонент, характерный для представителей рода *Rhodiola*. Содержание розавина примерно в 80% остальных коммерческих продуктов было ниже заявленного, и, предполагается, что они были получены из других видов рода Родиола [23].

Следовательно, розавин является именно тем маркером, который позволяет достоверно оценивать качество сырья и препаратов родиолы розовой, и проблема надлежащего контроля качества сырья и препаратов родиолы розовой носит общемировой характер.

Следует также отметить, что включенные в фармакопейные статьи методики количественного определения предусматривают проведение анализа методом ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования^{2,3} [21]. Известно, что при градиентном режиме корректировка условий является более критичной, может привести к некорректной идентификации пиков, их наложению или сдвигам, при которых анализируемые вещества могут выйти до или после указанного времени реги-

страции хроматограммы. На наш взгляд, подбор условий для проведения анализа в изократическом режиме позволит повысить воспроизводимость методики⁴ [21]. Кроме того, используемая в фармакопейной методике для детекции салидрозидов длина волны 219 нм менее специфична по отношению к сопутствующим компонентам по сравнению с другим максимумом поглощения этого соединения – 278 нм [2].

ЦЕЛЬ. Совершенствование существующих подходов к стандартизации лекарственных препаратов корневищ и корней родиолы розовой, принятых в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовали экспериментальные и промышленные образцы экстракта жидкого корневищ и корней родиолы розовой.

Экспериментальные образцы получали методом модифицированной мацерации из лекарственного растительного сырья, заготовленного в 2016–2018 гг. (Алтайский край). Стандартный образец розавина, соответствующий требованиям ФС 42-0071-01, получен авторами статьи из корневищ и корней родиолы розовой с использованием колоночной хроматографии на силикагеле и последующей перекристаллизации из этанола 95%. Стандартный образец салидрозидов, имеющий, по данным ТСХ, УФ-, ЯМР-спектроскопии и т.п. (162–164°C), степень чистоты не менее 98,0%, получен авторами статьи из корневищ и корней родиолы розовой с использованием колоночной хроматографии на силикагеле, рехроматографии на полиамиде и последующей перекристаллизации из смеси хлороформа и этанола 95%.

В работе использовали ацетонитрил (ООО «Компонент-реактив», «Для высокоэффективной жидкостной хроматографии»); воду, полученную с использованием системы для получения воды очищенной многоступенчатой системой очистки (адсорбция, обратный осмос, мембранное фильтрование) и проверенную на чистоту в условиях хроматографического анализа. Остальные реактивы имели степень чистоты ч.д.а. или х.ч.

Приготовление растворов

Приготовление раствора стандартного образца салидрозидов. Около 0,025 г (точная навеска) государственного стандартного образца салидрозидов (содержание основного вещества 98%) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в небольшом количестве этанола 95%, доводят этанолом 95% до метки, перемешивают.

Приготовление стандартного раствора розавина. Около 0,025 г (точная навеска) государственного стандартного образца розавина (содержание основного

⁴ ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография.

вещества 98%) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в небольшом количестве этанола 95% при нагревании на кипящей водяной бане, доводят этанолом 95% до метки, перемешивают.

Условия хроматографического разделения

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: метод обращенно-фазовой хроматографии, изократический режим, колонка «КАХ-6-80-4» (2 мм × 80 мм; Сепарон-С18, 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил: 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 14:86, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2000 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 252 нм (розавин) и 278 нм (салидрозид). Объемы инжектируемых проб: 3 мкл (стандартные растворы розавина и салидрозид) и 5 мкл (экспериментальные образцы жидких экстрактов родиолы розовой).

Оценка пригодности системы

Пригодность хроматографической системы оценивали в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография». Показатели пригодности хроматографической системы (эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии) рассчитывали по результатам 5-кратного анализа 5 мкл раствора экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой.

Результаты оценки пригодности системы подтверждают пригодность хроматографической системы для количественного определения салидрозид и розавина в сырье и препаратах родиолы розовой (таблица 1).

Методика одновременного количественного определения розавина и салидрозид в родиолы розовой корневищ и корней экстракте жидком

Около 1 мл родиолы розовой корневищ и корней экстракта жидкого помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят водой очищенной до метки. Перед анализом аликвоту образца дополнительно фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,45 мкм) (испытываемый раствор).

5 мкл испытуемого раствора вводят в жидкостной хроматограф «Милихром-6» с УФ-детектором и хроматографируют, как описано в разделе «Условия хроматографического разделения».

Параллельно по 3 мкл растворов стандартных образцов салидрозид и розавина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение высоты пика салидрозид на хроматограмме при длине волны 278 нм и площади пика розавина на хроматограмме при длине волны 252 нм. Рассчитывают средние значения по результатам трех параллельных определений.

Содержание салидрозид (X, в %) рассчитывают по формуле:

$$X, \% = \frac{H_i \times m_{st} \times V_1 \times V \times 100}{H_{st} \times V_{st} \times V_2 \times V_{аликвоты}}$$

где: H_i – высота пика салидрозид на хроматограмме испытуемого раствора, е.о.п.; H_{st} – высота пика салидрозид на хроматограмме стандартного раствора, е.о.п.; m_{st} – точная навеска стандарта салидрозид, г; V_{st} – объем приготовленного раствора стандартного образца салидрозид, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора стандартного образца, мкл; V_2 – объем вводимой пробы испытуемого раствора, мкл; V – объем мерной колбы, в которой разводили аликвоту родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл; $V_{аликвоты}$ – объем аликвоты родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл.

Содержание розавина (X в процентах) рассчитывают по формуле:

$$X, \% = \frac{S_i \times m_{st} \times V_1 \times V \times 100}{S_{st} \times V_{st} \times V_2 \times V_{аликвоты}}$$

где: S_i – площадь пика розавина на хроматограмме испытуемого раствора; S_{st} – площадь пика розавина на хроматограмме стандартного раствора; m_{st} – точная навеска стандарта розавина, г; V_{st} – объем приготовленного раствора стандартного образца салидрозид, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора стандартного образца, мкл; V_2 – объем вводимой пробы испытуемого раствора, мкл; V – объем мерной колбы, в которой разводили аликвоту родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл; $V_{аликвоты}$ – объем аликвоты родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл.

Валидация методики

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность (открываемость), прецизионность. Специфичность методики определялась по соответствию времен удерживания стандартных образцов салидрозид и розавина и пиков, соответствующих этим стандартам на ВЭЖХ-хроматограмме испытуемого раствора, а также по разрешению между наиболее близкими пиками и фактору асимметрии пиков салидрозид и розавина.

Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов стандартных образцов (с концентрациями в диапазоне от 0,1467 до 1,4667 мг/мл для салидрозид и от 0,1200 до 0,9600 мг/мл для розавина). На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» или «концентрация, мг/мл – площадь пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = ax + b$), значение коэффициента детерминации (r^2), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013.

Правильность методики тестировали путем введения в аликвоту препарата родиолы розовой навески стандартных образцов розавина и салидрозид в количестве от 80% до 120% от исходного содержания. Испытания проводили в трех повторностях.

Таблица 1 – Определение пригодности хроматографической колонки

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки (салидрозид)	5100	Не менее 5000
Эффективность колонки (розавин)	5201	теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками (салидрозид)	1,6	Не менее 1,5
Разрешение между наиболее близкими пиками (розавин)	2,3	
Фактор асимметрии (салидрозид)	1,47	Не более 1,5
Фактор асимметрии (розавин)	1,21	

Таблица 2 – Метрологические характеристики методики количественного определения салидрозид и розавина в жидких экстрактах родиолы розовой

Анализируемое вещество	<i>f</i>	$\bar{X},\%$	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>	$\Delta\bar{X}$	$\bar{\varepsilon},\%$
Салидрозид	10	2,02	0,160114	95	2,23	$\pm 0,11$	$\pm 5,33$
Розавин	10	0,22	0,014460	95	2,23	$\pm 0,04$	$\pm 4,43$

Примечание: *f* – число степеней свободы; \bar{X} – среднее значение; *S* – стандартное отклонение; *P* – доверительная вероятность, *t* – *t*-критерий Стьюдента, $\Delta\bar{X}$ – полуширина доверительного интервала среднего результата; $\bar{\varepsilon}$ – относительная ошибка среднего результата

Таблица 3 – Результаты определения правильности методики (салидрозид)

Исходное содержание салидрозид, мг/мл водно-спиртового извлечения	Добавлено салидрозид, мг/мл	Содержание салидрозид, мг/мл		Погрешность	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
20,18	16,00	36,18	37,00	0,82	2,27
20,18	20,00	40,18	39,50	-0,68	-1,69
20,18	25,00	45,18	45,00	-0,18	-0,40

Таблица 4 – Результаты определения правильности методики (розавин)

Исходное содержание розавина, мг/мл водно-спиртового извлечения	Добавлено розавина, мг/мл	Содержание розавина, мг/мл		Погрешность	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
2,19	1,75	3,94	4,00	0,06	1,52
2,19	2,20	4,39	4,25	-0,14	-3,19
2,19	2,60	4,79	4,61	-0,18	-3,76

Таблица 5 – Содержание розавина и салидрозид в экспериментально полученных и промышленных образцах жидких экстрактов родиолы розовой корневищ и корней

№ п/п	Наименование образца	Содержание салидрозид, %	Содержание розавина, %
1.	Экспериментальный образец № 1 (получен из сырья, заготовленного в 2016 г.)	2,13% \pm 0,05%	0,21% \pm 0,03%
2.	Экспериментальный образец № 2 (получен из сырья, заготовленного в 2018 г.)	2,71% \pm 0,12%	0,32% \pm 0,04%
3.	Промышленный образец № 1	1,62% \pm 0,05%	Не обнаруживался
4.	Промышленный образец № 2	2,75% \pm 0,08%	Не обнаруживался
5.	Промышленный образец № 3	2,55% \pm 0,07%	Не обнаруживался
6.	Промышленный образец № 4	1,20% \pm 0,04%	Не обнаруживался
7.	Промышленный образец № 5	1,12% \pm 0,06%	Не обнаруживался
8.	Промышленный образец № 6	0,96% \pm 0,04%	Не обнаруживался

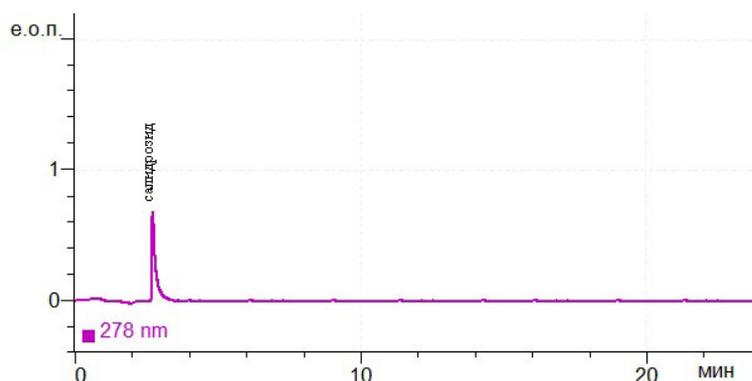


Рисунок 1 – ВЭЖХ-хроматограмма раствора стандартного образца салидрозида, 0,88 мг/мл
Примечание: детекция при длине волны 278 нм

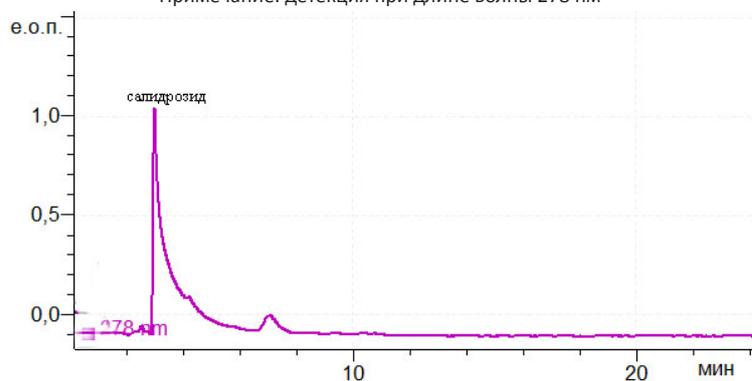


Рисунок 2 – ВЭЖХ-хроматограмма экспериментального образца экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой
Примечание: детекция при длине волны 278 нм

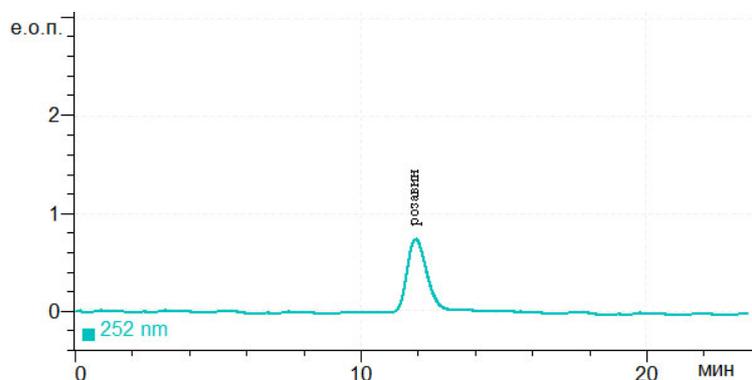


Рисунок 3 – ВЭЖХ-хроматограмма раствора стандартного образца розавина, 0,60 мг/мл
Примечание: детекция при длине волны 252 нм

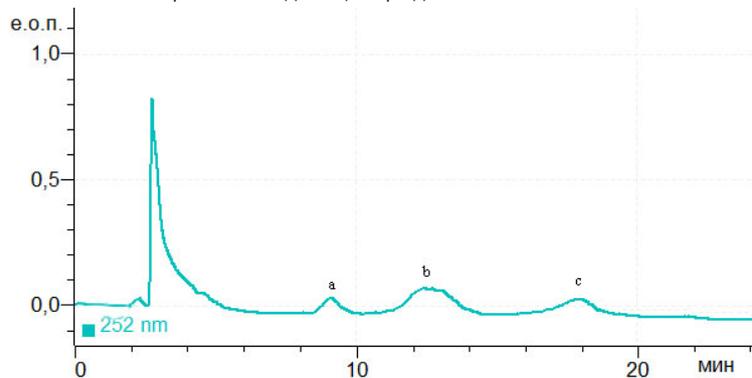


Рисунок 4 – ВЭЖХ-хроматограмма экспериментального образца экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой
Примечание: a – розарин; b – розавин; c – розин; детекция при длине волны 252 нм

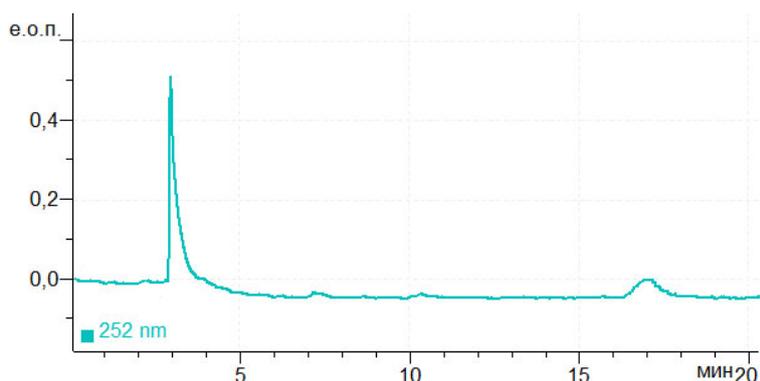


Рисунок 5 – Репрезентативная ВЭЖХ-хроматограмма промышленных образцов экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой
Примечание: детекция при длине волны 252 нм

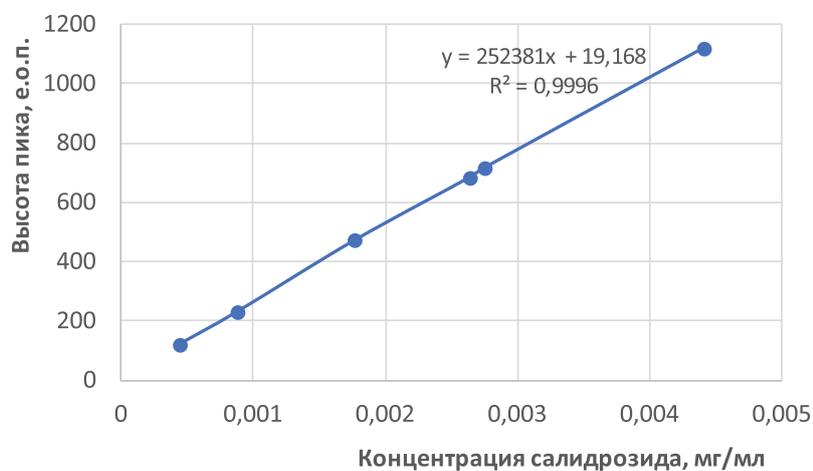


Рисунок 6 – График зависимости высоты пика от концентрации салидрозида в пробе и уравнение линейной регрессии

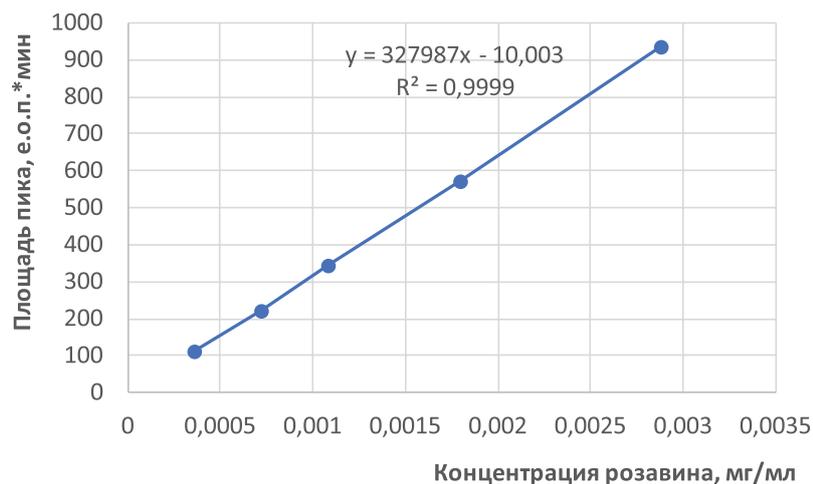


Рисунок 7 – График зависимости площади пика от концентрации розавина в пробе и уравнение линейной регрессии

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе в описанных выше условиях хроматографического разделения было проанализировано содержание розавина и салидрозида в корневищах и корнях родиолы розовой,

используемых для получения экспериментальных образцов жидкого экстракта. Определено, что содержание розавина в корневищах и корнях родиолы розовой варьировало от 1,17% ±0,04% до 1,41% ±0,06% и салидрозида – от 1,63% ±0,05% до 2,88% ±0,12%

соответственно. В образце, заготовленном в 2020 г., розавин не обнаруживался, хотя другие гликозиды коричневого спирта присутствовали, что свидетельствует о неправильных условиях хранения сырья.

В предлагаемых условиях ВЭЖХ-анализа времени удерживания пиков салидрозида на хроматограммах стандартного образца салидрозида, водно-спиртового извлечения из сырья родиолы розовой и растворов, полученных в результате разведения экспериментальных образцов экстрактов жидких родиолы розовой, составили $2,780 \pm 0,077$; $2,979 \pm 0,070$ и $(2,790 \pm 0,087$ мин соответственно (рис. 1 и 2). Для розавина соответствующие значения составили $12,424 \pm 0,080$; $12,824 \pm 0,070$ и $12,429 \pm 0,070$ мин (рис. 3 и 4). Ни в одном из 6 проанализированных промышленных образцов розавин не обнаруживался.

Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации салидрозида описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,1467 до 1,4667 мг/мл (рис. 6), однако коэффициент корреляции для зависимости высоты пика от концентрации салидрозида составил 0,9996, для зависимости площади пика от концентрации – 0,9888. В связи с этим расчет содержания салидрозида в испытуемых образцах проводили с использованием высоты пика.

Для зависимости высоты и площади пика от концентрации розавина в диапазоне концентраций от 0,1200 до 0,9600 мг/мл коэффициенты корреляции составили 0,9973 и 0,9999 (рис. 7). Поэтому определение содержания розавина проводили с использованием площади пика.

Указанные диапазоны концентраций салидрозида и розавина можно рассматривать как аналитические области методики.

Метрологические характеристики предлагаемой ВЭЖХ-методики свидетельствуют о том, что ошибка определения среднего результата содержания салидрозида в жидком экстракте корневищ и корней родиолы розовой с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,33\%$, розавина $\pm 4,43\%$ (таблица 2). Правильность методики определяли методом добавок путем добавления растворов салидрозида и розавина с известной концентрацией (80%, 100% и 120%) к аликвоте экспериментального препарата. При этом средний процент восстановления составил 100,06% и 98,19% соответственно (таблицы 3 и 4). Ошибки определения салидрозида и розавина в пробах с добавками стандартных образцов находились в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

Исследование повторяемости методики указывает на сходимость полученных концентраций салидрозида и розавина: относительная ошибка среднего результата определения содержания салидрозида в корневищах и корнях родиолы розовой с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,61\%$

и $\pm 4,70\%$ соответственно, единичного определения $\pm 17,7\%$ и $\pm 14,7\%$ соответственно. При оценке внутрिलाбораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность определения розавина и салидрозида в первый и второй дни анализа находится в диапазоне от 0,90 до 1,09.

Определено, что содержание розавина в экспериментальных образцах жидких экстрактов, полученных из корневищ и корней родиолы розовой фармакопейного качества, варьирует от $0,21\% \pm 0,03\%$ до $0,32\% \pm 0,04\%$ и салидрозида от $2,13\% \pm 0,05\%$ до $2,71\% \pm 0,12\%$ соответственно (таблица 5). В проанализированных промышленных образцах двух российских производителей содержание салидрозида варьировало от $0,96\% \pm 0,04\%$ до $2,75\% \pm 0,08\%$. Розавин ни в одном из проверенных образцов не обнаруживался.

Следовательно, отсутствие розавина в препаратах родиолы розовой, согласно полученным нами данным и другим опубликованным результатам [22–26], является распространенной проблемой. Возможными причинами является использование для получения препаратов других видов рода *Rhodiola* L. или неправильные условия заготовки, сушки и хранения лекарственного растительного сырья, а также его переработки.

Известно, что салидрозид присутствует практически во всех видах родиолы, он не подвержен ферментативному или термическому расщеплению, и его содержание в корневищах и корнях не зависит от места произрастания [27]. Розавин, в отличие от салидрозида и других фенилпропаноидов, обнаруживается только в корневищах родиолы розовой и является наиболее уязвимым её компонентов, так как подвержен избирательному ферментативному расщеплению. Сушка корневищ данного растения при температуре 50–60°C приводит к наибольшему избирательному ферментативному расщеплению розавина до агликона – коричневого спирта. В качестве оптимальных условий сушки корневищ родиолы розовой рекомендуется температурный интервал 70–80°C [1].

Выявлена вариабельность содержания розавина в зависимости от места произрастания растения. Максимальное содержание розавина и салидрозида отмечено в образцах корневищ родиолы розовой алтайского происхождения [27]. Для корневищ монгольской популяции *Rhodiola rosea* L. особенностью химического состава является высокое содержание флавоноидов (больше примерно в 200 раз по сравнению с другим образцами сырья), в особенности производных гербацептина [28].

Определено также, что розавин появляется в корневищах растения только на второй год жизни и достигает максимального значения в корневищах четырехлетних растений. Салидрозид начинает накапливаться в растениях первого года жизни, достигая

максимума, как и в случае розавина, на четвертом году жизни растения [2]. Принимая во внимание обстоятельство, что фитомасса корневищ родиолы розовой активно прирастает на 5-м и 6-м годах жизни растения на фоне сохранения высокого содержания розавина, обоснованы рекомендации по заготовке сырья именно 5–6-летних растений [2].

Следовательно, наличие розавина является надежным показателем доброкачественности сырья и препаратов родиолы розовой.

С учетом полученных данных можно рекомендовать нижний предел содержания розавина в жидких экстрактах родиолы розовой – 0,1%, салидрозида – 0,8%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в статье предложена ВЭЖХ-методика одновременного определения содержания двух наиболее значимых биологически активных соединений корневищ и корней родиолы розовой в

полученных на их основе лекарственных препаратах в условиях изократического режима элюирования. Ошибка определения среднего результата содержания розавина и салидрозида в сырье родиолы не превышала 6,0%.

Рассмотрены методологические подходы к разработке методик фармакопейного анализа препаратов родиолы розовой. Качество лекарственных препаратов из корневищ и корней родиолы розовой напрямую связано с качеством лекарственного растительного сырья, при этом наиболее уязвимым биологически активным компонентом, который в наибольшей степени подвержен ферментативному расщеплению при нарушении условий сушки, хранения сырья и его переработки, является розавин. В связи с этим именно этот фенилпропаноид является тем маркером качества сырья и препаратов родиолы розовой, на который в первую очередь следует обращать внимание.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование было выполнено в рамках проекта «Разработка национальных подходов к стандартизации лекарственных растительных препаратов, лекарственного растительного сырья и фитобиотехнологических продуктов» при финансовой государственной поддержке в виде Стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

В.А. Куркин – концепция и дизайн исследования, редактирование; Т.К. Рязанова – сбор и обработка материала, написание текста и составление списка литературы, статистическая обработка данных

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Кирьянов А.А. и др. О качестве сырья родиолы розовой // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – Т. 23, №11. – С. 1364–1367.
2. Кирьянов А.А., Бондаренко Л.Т., Куркин В.А., Запесочная Г.Г. Динамика накопления розавидина и салидрозида в корневищах родиолы розовой // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – Т. 23, №4. – С. 449–452.
3. Marchev A.S., Dinkova-Kostova A.T., György Z., Mirmazloum I. *Rhodiola rosea* L.: from golden root to green cell factories // Phytochem. Rev. – 2016. – Vol. 15, No.4. – P. 515–536. DOI: 10.1007/S11101-016-9453-5.
4. Ma G.P., Zheng Q., Xu M.B., Zhou X.L., Lu L., Li Z.X., Zheng G.Q. *Rhodiola rosea* L. Improves Learning and Memory Function: Preclinical Evidence and Possible Mechanisms // Front. Pharmacol. – 2018. – Vol. 4, No.9. – P. 1415. DOI: 10.3389/fphar.2018.01415.
5. Jawaid T., Tewari N., Verma L. Adaptogenic agents: a review // International Journal of Biomedical Research. – 2011. – Vol. 2, No.5. – P. 285–304. DOI: 10.7439/ijbr.v2i5.104.
6. Tao H., Wu X., Cao J., Peng Y., Wang A., Pei J., Xiao J., Wang S., Wang Y. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study // Med. Res. Rev. – 2019. – Vol. 39, No.5. – P. 1779–1850. DOI: 10.1002/med.21564.
7. Li Y., Pham V., Bui M., Song L., Wu C., Walia A., Uchio E., Smith-Liu F., Zi X. *Rhodiola rosea* L.: an herb with anti-stress, anti-aging, and immunostimulating properties for cancer chemoprevention // Curr. Pharmacol. Rep. – 2017. – Vol. 3, No.6. – P. 384–395. DOI:10.1007/s40495-017-0106-1.
8. Pu W.L., Zhang M.Y., Bai R.Y., Sun L.K., Li W.H., Yu Y.L., Zhang Y., Song L., Wang Z.X., Peng Y.F., Shi H., Zhou K., Li T.X. Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review // Biomed. Pharmacother. – 2020. – Vol. 121. – 109552. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109552.
9. Recio M.C., Giner R.M., Mañez S. Immunomodulatory and antiproliferative properties of *Rhodiola* species // Planta Medica. – 2016. – Vol. 82, No.11–12. – P. 952–960. DOI: 10.1055/s-0042-107254.
10. Nabavi S.F., Braidy N., Orhan I.E., Badiee A., Daglia M., Nabavi S.M. *Rhodiola rosea* L. and Alzheimer's Disease: From Farm to Pharmacy // Phytother. Res. – 2016. – Vol. 30, No.4. – P. 532–539. DOI: 10.1002/ptr.5569.
11. Khanna K., Mishra K.P., Ganju L., Singh S.B. Golden root: A wholesome treat of immunity // Biomed. Pharmacother. – 2017. – Vol. 87. – P. 496–502. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.132.
12. Kurkin V.A., Dubishchev A.V., Ezhkov V.N., Titova I.N., Avdeeva E.V. Antidepressant activity of some phytopharmaceuticals and phenylpropanoids //

- Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2006. – Vol. 42, No.10. – P. 614–619. DOI: 10.1007/s11094-006-0205-5.
13. Khanum F., Bawa A.S., Singh B. *Rhodiola rosea*: A Versatile Adaptogen // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. – 2005. – Vol. 4, No.3. – P. 55–62. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00073.x.
 14. Куркин В.А., Петрухина И.К., Акушская А.С. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 8–4. – С. 898–902.
 15. Li Q., Wang J., Li Y., Xu X. Neuroprotective effects of salidroside administration in a mouse model of Alzheimer's disease // Mol. Med. Rep. – 2018. – Vol. 17, No.5. – P. 7287–7292. DOI: 10.3892/mmr.2018.8757.
 16. Perfumi M., Mattioli L. Adaptogenic and central nervous system effects of single doses of 3% rosavin and 1% salidroside *Rhodiola rosea* L. extract in mice // Phytother. Res. – 2007. – Vol. 21, No.1. – P. 37–43. DOI: 10.1002/ptr.2013.
 17. Tolonen A., Pakonen M., Hohtola A., Jalonen J. Phenylpropanoid glycosides from *Rhodiola rosea* // J. Jalonen, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2003. – Vol. 51, No.4. – P. 467–470. DOI: 10.1248/cpb.51.467.
 18. Kurkin V.A., Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // Chemistry of Natural Compounds. – 2003. – Vol. 39, No.2. – P. 123–153. DOI: 10.1023/A:1024876810579.
 19. Kurkin V.A., Dubishchev A.V., Titova I.N., Avdeeva E.V., Braslavsky V.B., Kurkina A.V., Ezhkov V.N. Phenylpropanoids of medicinal plants are perspective sources of neurotropic phytopreparations // XXIII International Conference on Polyphenols, Canada. – 2006. – P. 53–54.
 20. Kurkin V.A. Phenylpropanoids as the biologically active compounds of the medicinal plants and phytopharmaceuticals // Advances in Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 3, No.1. – P. 26–28. DOI: 10.4236/abc.2013.31004.
 21. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд., в 4-х томах. Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
 22. Wang Z., Hu H., Chen F., Zou L., Yang M., Wang A., Foulsham J.E., Lan K. Metabolic profiling assisted quality assessment of *Rhodiola rosea* extracts by high-performance liquid chromatography // Planta Medica. – 2012. – Vol. 78, No.7. – P. 740–746. DOI: 10.1055/s-0031-1298373.
 23. Booker A., Jalil B., Frommenwiler D., Reich E., Zhai L., Kulic Z., Heinrich M. The authenticity and quality of *Rhodiola rosea* products // Phytomedicine. – 2016. – Vol. 23, No.7. – P. 754–762. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.10.006.
 24. Khokhlova K., Zdoryk O. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles // Nat. Prod. Res. – 2020. – Vol. 34, No.19. – P. 2842–2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
 25. Kucinskaite A., Poblacka-Olech L., Krauze-Baranowska M., Sznitowska M., Savickas A., Briedis V. Evaluation of biologically active compounds in roots and rhizomes of *Rhodiola rosea* L. cultivated in Lithuania // Medicina (Kaunas). – 2007. – Vol. 43, No.6. – P. 487–494.
 26. Ganzera M., Yayla Y., Khan I.A. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2001. – Vol. 49, No.4. – P. 465–467. DOI: 10.1248/cpb.49.465.
 27. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Горбунов Ю.Н., Нухимовский Е.Л., Шретер А.И. Химическое исследование некоторых видов рода *Rhodiola* L. и *Sedum* L. и вопросы их хемосистематики // Растительные ресурсы. – 1986. – Т. 22, №3. – С. 310–319.
 28. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Нухимовский Е.Л., Климахин Г.И. Химический состав корневищ монгольской популяции *Rhodiola rosea* L., интродуцированной в Подмоскowie // Химико-фармацевтический журнал. – 1988. – Т. 22, №3. – С. 324–326.

АВТОРЫ

Владимир Александрович Куркин – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7513-9352. E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Рязанова Татьяна Константиновна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры управления и экономики фармации ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4581-8610. E-mail: t.k.ryazanova@samsmu.ru

УДК 615.2



ВЛИЯНИЕ ТВЁРДЫХ ДИСПЕРСИЙ НА РАСТВОРИМОСТЬ МЕТРОНИДАЗОЛА

И.И. Краснюк (мл.)¹, С.Р. Нарышкин¹, И.И. Краснюк¹, А.В. Беляцкая¹, О.И. Степанова¹,
И.С. Бобров¹, В.Г. Янкова¹, Д.В.Рау^{1,2}, А.Н. Воробьев³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Институт структуры вещества Национального исследовательского совета (ISM-CNR) Виа дель Фоссо дель Кавальере, 100-00133, Рим, Италия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

E-mail: krasnyuk.79@mail.ru

Получено 05.03.2021

Принята к печати 15.06.2021

Цель. В работе изучено влияние твёрдых дисперсий с применением полиэтиленгликолей различных молекулярных масс на растворимость метронидазола в воде. Метронидазол – противомикробное и противопротозойное лекарственное средство. Малая растворимость в воде ограничивает применение метронидазола, обуславливая технологические трудности и снижая биодоступность. Повысить растворимость и высвобождение действующего вещества из лекарственных форм можно с помощью метода твёрдых дисперсий. Твёрдые дисперсии – это би- или многокомпонентные системы, состоящие из действующего вещества и носителя (высокодиспергированная твёрдая фаза действующего вещества или молекулярно-дисперсные твёрдые растворы) с частичным образованием комплексов переменного состава с материалом носителя.

Материалы и методы. В работе использовали субстанцию метронидазола производства. Для получения твёрдых дисперсий применяли полиэтиленгликоли различных молярных масс: 1500, 2000 и 3000 г/моль. Твёрдые дисперсии готовили методом «удаления растворителя»: метронидазол и полимер растворяли в минимальном объёме спирта этилового 96% (ч.д.а.) при 65±2°C, затем растворитель выпаривали под вакуумом до постоянной массы. Использовали вакуумный насос и водяную баню, температура 40±2°C. Растворение образцов изучали, используя магнитную мешалку с подогревом и устройством термостатирования. Концентрацию метронидазола определяли на спектрофотометре, используя кварцевые кюветы, при длине волны 318±2 нм. Для фильтрации растворов использовали шприцевые насадки, поры – 0,45 мкм, фильтр – нейлон. Микрорентгенографию проводили на микроскопе с цифровой камерой. Оптические свойства растворов исследовали, используя кварцевую кювету и зеркальную камеру (экспозиция снимка 20 сек.).

Результаты. Получение твёрдых дисперсий увеличивает полноту и скорость растворения метронидазола. Растворимость метронидазола из твёрдых дисперсий повышается на 14–17% в сравнении с исходной субстанцией. Комплекс физико-химических методов анализа, включающий: УФ-спектрофотометрию, микрорентгенографию и изучение оптические свойства полученных растворов, позволяет утверждать, что повышение растворимости метронидазола из твёрдых дисперсий объясняется потерей кристалличности и образованием твёрдого раствора действующего вещества и солюбилизирующим действием полимера с образованием коллоидных растворов метронидазола при последующем растворении твёрдой дисперсии в воде.

Заключение. Получение твёрдых дисперсий с полиэтиленгликолями улучшает растворение метронидазола в воде. Полученные результаты планируется использовать при разработке быстрорастворимых твёрдых лекарственных форм метронидазола с ускоренным высвобождением и повышенной биодоступностью.

Ключевые слова: твёрдая дисперсия; растворимость; метронидазол; полиэтиленгликоль

Список сокращений: ТД – твёрдая дисперсия; ПЭГ – полиэтиленгликоль; НИР – научно-исследовательская работа

Для цитирования: И.И. Краснюк (мл.), С.Р. Нарышкин, И.И. Краснюк, А.В. Беляцкая, О.И. Степанова, И.С. Бобров, В.Г. Янкова, Д.В.Рау, А.Н. Воробьев. Влияние твёрдых дисперсий на растворимость метронидазола. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):195-204. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-195-204

© И.И. Краснюк (мл.), С.Р. Нарышкин, И.И. Краснюк, А.В. Беляцкая, О.И. Степанова, И.С. Бобров, В.Г. Янкова, Д.В.Рау, А.Н. Воробьев, 2021

For citation: I.I. Krasnyuk (Jr.), S.R. Naryshkin, I.I. Krasnyuk, A.V. Belyatskaya, O.I. Stepanova, I.S. Bobrov, V.G. Yankova, J.V. Rau, A.N. Vorobiev. Effect of solid dispersions on the solubility of metronidazole. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):195-204. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-195-204

EFFECT OF SOLID DISPERSIONS ON THE SOLUBILITY OF METRONIDAZOLE

I.I. Krasnyuk (Jr.)¹, S.R. Naryshkin¹, I.I. Krasnyuk¹, A.V. Belyatskaya¹, O.I. Stepanova¹,
I.S. Bobrov¹, V.G. Yankova¹, J.V. Rau^{1,2}, A.N. Vorobiev³

¹ Sechenov First Moscow State Medical University
Bldg. 2, 8, Trubetskaya St., Moscow, Russia, 119991

² Istituto di Struttura della Materia, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISM-CNR)
Via del Fosso del Cavaliere, 100-00133 Rome, Italy.

³ Peoples' Friendship University of Russia
6, Miklukho-Maclay St., Moscow, Russia, 117198

E-mail: krasnyuk.79@mail.ru

Received 5 March 2021

Accepted 15 June 2021

The aim of the work is to study the effect of solid dispersions using polyethylene glycols of various molecular weights on the solubility of metronidazole in water. Metronidazole is an antimicrobial and antiprotozoal drug. Its low solubility in water limits the use of metronidazole, causing technological difficulties and reducing its bioavailability. The solubility and release of the active substance from dosage forms can be increased using the solid dispersion methods. Solid dispersions are bi- or multi-component systems consisting of an active substance and a carrier (a highly dispersed solid phase of the active substance or molecular-dispersed solid solutions) with a partial formation of complexes of variable compositions with the carrier material.

Materials and methods. The substance of metronidazole used in the experiment, was manufactured by Hubei Hongyuan Pharmaceutical Technology Co., Ltd. (China). To obtain solid dispersions, polyethylene glycols of various molar masses – 1500, 2000 and 3000 g/mol – were used. The solid dispersions were prepared by “the solvent removal method”: metronidazole and the polymer were dissolved in a minimum volume of 96% ethyl alcohol (puriss. p.a./analytical grade) at 65±2°C, and then the solvent was evaporated under vacuum to the constant weight. A vacuum pump and a water bath were used at the temperature of 40±2°C. The dissolution of the samples was studied using a magnetic stirrer with heating, and a thermostating device. The concentration of metronidazole was determined on a spectrophotometer using quartz cuvettes at the wavelength of 318±2 nm. To filter the solutions, syringe nozzles were used, the pores were 0.45 µm, the filter was nylon. Microcrystalloscopy was performed using a microscope with a digital camera. The optical properties of the solutions were investigated using a quartz cuvette and a mirror camera (the image exposure – 20 sec).

Results. Obtaining solid dispersions increases the completeness and rate of the metronidazole dissolution. The solubility of metronidazole from solid dispersions increases by 14–17% in comparison with the original substance. The complex of physical-chemical methods of the analysis, including UV spectrophotometry, microcrystalloscopy and the study of the optical properties of the obtained solutions, makes it possible to suggest the following. The increase in the solubility of metronidazole from solid dispersions is explained by the loss of crystallinity and the formation of a solid solution of the active substance and the solubilizing effect of the polymer with the formation of colloidal solutions of metronidazole at subsequent dissolution of the solid dispersion in water.

Conclusion. The preparation of solid dispersions with polyethylene glycols improves the dissolution of metronidazole in water. The results obtained are planned to be used in the development of rapidly dissolving solid dosage forms of metronidazole with an accelerated release and an increased bioavailability.

Keywords: solid dispersion; solubility; metronidazole; polyethylene glycol

Abbreviations: SD – solid dispersion; PEG – polyethylene glycol; R&D – research & development

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа продолжает перспективное научное направление «твердые дисперсии в медицине и фармации».

На данный момент исследование твердых дисперсий (ТД) проводится в ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) на базе кафедр Института фармации им. А.П. Нелюбина: «фармацевтической технологии» и «аналитической, физической и коллоидной химии». Работа выполняется в рамках на-

учно-исследовательской работы (НИР): «Повышение биодоступности лекарственных средств с помощью твердых дисперсий». Ожидаемый социально-экономический эффект НИР – получение инновационных лекарственных препаратов с повышенной биодоступностью при минимальных экономических затратах, а также активное импортозамещение.

В рамках данного научного направления за прошедшие 20 лет на базе Первого МГМУ им. И.М. Сеченова получены и изучены твердые дисперсии более 30 малорастворимых лекарственных субстанций из разных фармакологических групп: альбендазол,

амоксциллина тригидрат, ампициллина тригидрат, анестезин, ацетомепрегенол, ацикловир, бензонал, диклофенак (кислотная форма), индометацин, кверцетин, кетопрофен, левомецетин, липоевая кислота, мезапам, метилурацил, нафтифина гидрохлорид, нифидепин, нозепам, пармидин, протионамид, рибофлавин, рифампицин, рутин, синтомицин, стрептоцид, сульфадиметоксин, феназепам, фуразолидон, фурацилин, эритромицин, и т.д. [1–10].

Метронидазол – противомикробное и противопаразитарное лекарственное средство, успешно применяемое в терапии уже более 60-ти лет для лечения инфекционных заболеваний, вызванных анаэробными бактериями, а также для лечения протозойных инфекций (амёбиаз, лямблиоз, трихомониаз) [11]. Особый интерес для изучения метронидазол представляет, как типичный представитель группы производных имидазола (1,3-диазола). В качестве антибактериального средства метронидазол проявляет активность по отношению к грамотрицательным анаэробам *Bacteroides spp.*: (*B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*); *Fusobacterium spp.* и ряда грамположительных анаэробов (*Eubacterium spp.*; *Peptococcusniger*; *Clostridium spp.*; *Peptostreptococcus spp.*). Минимальная подавляющая концентрация для указанных штаммов – 6,250–0,125 мкг/мл.

Отдельное направление использования метронидазола это применение его для эрадикации *Helicobacter pylori* при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и/или желудка. Метронидазол используют при тройной терапии: препаратами на основе висмута; с использованием препаратов, блокирующих H₂-рецепторы; с использованием препаратов, ингибирующих протонный насос. В тех случаях, когда у пациента непереносимость кларитромицина или амоксициллина, терапию против хеликобактерий проводят, используя в качестве замены указанных антибиотиков метронидазолом (7 дней, 3–2 раза 0,5 г/сут) [11, 12].

В стоматологии метронидазол используют при различно локализованных инфекциях, вызванных анаэробами при заболевании пародонта и челюстно-лицевых воспалениях. Применяют в стоматологии гель, в состав которого входит комбинация хлоргексидина и метронидазола. Его показания: инфекционно-воспалительные заболевания слизистой оболочки рта и пародонта (острые и хронические: гингивит, пародонтит, язвенно-некротический гингивит Винченца, постэкстракционный альвеолит, афтозный стоматит). Метронидазол используют в стоматологии при системной фармакотерапии.

В дерматологии метронидазол используют для лечения розацеа [11–13]. Широкое применение метронидазола в гастроэнтерологии, стоматологии, дерматологии, гинекологии и др. обусловило появление различных лекарственных форм. Так, на российском

фармацевтическом рынке метронидазол представлен в виде таблеток, растворов, кремов; входит наряду с другими действующими компонентами в состав гелей и свечей. Субстанция метронидазола (рис. 1) представляет собой кристаллический порошок светло-жёлтого или белого цвета; малорастворим в воде, ацетоне и этаноле (1:100), что в некоторых случаях может ограничивать его применение, и обуславливает трудности технологического характера при создании новых лекарственных препаратов, а также снижает биодоступность.

Повысить растворимость и ускорить высвобождение веществ из лекарственной формы возможно «методом твёрдых дисперсий» (ТД) [1–10; 14–17]. ТД – это или многокомпонентные системы, включающие действующее вещество и носитель (твёрдая фаза лекарственного вещества, диспергированная в полимере), или твёрдые растворы лекарства в носителе. В некоторых случаях может наблюдаться образование комплексов различной природы действующего вещества с материалом носителя [1, 2, 13]. В роле носителя ТД используют различные вещества полимерной природы [17–19].

ЦЕЛЬ. Изучить влияние твёрдых дисперсий с полиэтиленгликолями (ПЭГ) различных молекулярных масс на растворимость метронидазола в воде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали субстанцию метронидазола производства «Hubei Hongyuan Pharmaceutical Technology Co., Ltd.» (Китай), соответствующую нормативной документации (ГФ РФ XIV изд., ФС.2.1.0136.18). Для получения ТД в качестве носителей применяли ПЭГ различных молярных масс: 1500, 2000 и 3000 г/моль (Merck, Германия).

Технология приготовления твёрдых дисперсий с ПЭГ

Анализ литературы и накопленный собственный опыт позволяют утверждать, что из множества способов получения ТД, в случае ПЭГ, оптимальной технологией получения ТД является «удаление растворителя» [3, 5–7, 10, 20, 21–23]. Рассчитанные количества метронидазола и полимера растворяли в минимальном объёме спирта этилового 96% (ч.д.а.) при нагревании до 65±2°C, затем растворитель выпаривали под вакуумом до постоянной массы. Использовали вакуумный насос UED-Lab 115, (Китай) и водяную баню UT-4301E (Ulab, Китай), температура 40±2°C [1, 2, 16, 18, 22].

Изучение растворения метронидазола

Проводили согласно методике, описанной в работах Krasnyuk I.I. и соавт. [1] и Beliatskaya A.V. и соавт. [2]. Основную проблему составляла невозможность использования методики по ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм». Это связано с получением насыщенных растворов изучаемого метронидазола. Полученные в

работе ТД очень липкие, густые массы белого цвета или порошки мягкой консистенции склонные к слипанию. Условия, описанные в ОФС 1.4.2.0014.15 для изучения растворения данных объектов, не всегда приемлемы. В связи с этим в ходе работы использовали модифицированную методику. Предварительные исследования [6–8] доказывают, что тест на растворение на приборе «вращающаяся корзинка», представляет результаты аналогичные, полученным по модифицированной методике.

Таким образом растворение образцов изучали, используя магнитную мешалку с подогревом, оснащённую устройством термостатирования RCT BASIC (IKA, Германия). Навески образцов для растворения отбирали таким образом, чтобы добиться насыщенного раствора метронидазола. Температура среды для растворения $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Образцы погружали в 150 мл воды очищенной и непрерывно перемешивали (200 оборотов в мин.).

Для изучения динамики растворения метронидазола через промежутки времени 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 мин. отбирали пробы по 5 мл. Среду восполняли до 150 мл водой очищенной. Пробы фильтровали.

Измерение концентрации метронидазола

В работе использовали спектрофотометр UNICO2800 (Unitedproducts & instruments, США) и кюветы кварцевые (поглощающий слой 10 мм). При необходимости пробы разводили водой очищенной, измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 318 ± 2 нм (максимум поглощения метронидазола). Результаты представлены в табл. 1, на рис. 2, 3.

Фильтрация

Фильтрация проводили шприцевыми насадками с фильтрами Minisart® (Sartorius, Германия) с диаметром пор 0,45 мкм, фильтр – нейлон.

Микрорентгенография

Использовали микроскоп Levenhuk D50LNG (КНР для Levenhuk, Inc., США), с цифровой камерой. Исследование проводили согласно методике [1, 2, 6, 7, 9]. В случае субстанции метронидазола на предметное стекло помещали порошок, смешивали с каплей вазелинового масла, накрывали покровным стеклом, микроскопировали. В случае ТД – на предметное стекло наносили каплю раствора метронидазола и ПЭГ (в пропорциях, соответствующих ТД) в спирте этиловом 96%, дожидались полного удаления растворителя, микроскопировали. Отдельно, аналогично изучены ПЭГ. На предметное стекло наносили каплю раствора ПЭГ, дожидались полного удаления растворителя и затвердевания ПЭГ, микроскопировали.

Дополнительно исследовали рекристаллизованную субстанцию метронидазол после удаления

спирта. На предметное стекло помещали каплю раствора метронидазола в спирте этиловом 96%, микроскопировали после полного удаления растворителя. Микрофотографии изученных образцов с условием микроскопирования указаны на рис. 4.

Исследование оптических свойств растворов

Использовали кварцевую кювету (слой 50,0 мм) Заполняли кювету фильтрованным раствором изучаемого образца. Между стенкой кюветы и источником света помещали светонепроницаемую перегородку с отверстием (диаметр 1 мм). Сквозь отверстие на кювету направляли тонкий луч белого света. В затемнённом помещении снимали цифровые изображения явления Фарадея-Тиндаля. Использовали зеркальную камеру Canon 5D MarkII (экспозиция снимка 20 сек). Результаты на рис. 5.

Статистическая обработка

Статистическую обработку значений концентраций метронидазола в растворах проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 (ГФ РФ XIV): $n = 5$, $p = 95\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перспективными носителями твёрдых дисперсий являются полиэтиленгликоли (ПЭГ) [10]. ПЭГ не имеют вкуса и запаха, легко растворяются в воде и спирте. Химически стабильны. Биологически безвредны. Устойчивы к действию высоких температур при стерилизации. Нечувствительны к колебаниям pH и наличию электролитов. Устойчивы к действию микроорганизмов благодаря наличию в молекуле первичных гидроксильных групп [3, 21]. Консистенция ПЭГ зависит от молекулярной массы. До 400 г/моль – вязкие бесцветные жидкости; с массой более 400 до 1000 г/моль – субстанции с консистенцией мягкого воска; с массой 1500 г/моль и более – твердые. В виду того, что полученные данные позднее планируется использовать при разработке твёрдых быстрорастворимых лекарственных форм метронидазола, в качестве актуальных объектов исследования были выбраны именно ПЭГ твёрдой консистенции с массами 1500, 2000 и 3000 г/моль. Выбранные полимеры часто используются, как вспомогательные вещества при производстве таблеток и гранул [5].

Применение препаратов на основе ТД с ПЭГ, перспективно из-за биоадгезивных качеств ПЭГ (как высокомолекулярных соединений). При контакте со слизистыми оболочками или кожей макромолекулы ПЭГ адсорбируются и, как правило, повышают проницаемость клеточных мембран, способствуя активному трансмембранному переносу действующего вещества. Анализ патентной и научной литературы не выявил информации о применении ПЭГ в технологии твердых лекарственных форм в качестве полимер-носителей для получения ТД с метронидазолом с целью повышения его растворимости в воде.

Таблица 1 – Изменение концентрации растворов метронидазола и твёрдых дисперсий во времени

№	Состав образца	Масса образца (г)	Среднее значение концентрации метронидазола (мг/мл) в растворе образца от начала растворения; n=5							
			Время отбора проб (мин)							
			5	10	15	20	30	40	50	60
1	метронидазол – субстанция	3,0	7,767	7,944	8,221	8,400	8,734	8,846	8,950	9,003
2	ТД метронидазол:ПЭГ-1500 (1:1)	2,0:2,0	8,342	10,473	12,885	11,773	10,661	9,789	9,444	9,402
3	ТД метронидазол:ПЭГ-1500 (1:3)	2,0:6,0	8,156	9,267	9,590	10,083	10,343	10,602	10,423	10,244
4	ТД метронидазол:ПЭГ-1500 (1:5)	2,0:10,0	2,971	4,180	5,408	6,383	7,875	9,112	10,303	10,534
5	ТД метронидазол:ПЭГ-2000 (1:1)	2,0:2,0	8,165	9,272	10,114	9,415	9,721	10,026	10,214	10,402
6	ТД метронидазол:ПЭГ-2000 (1:5)	2,0:10,0	5,969	6,980	7,711	8,667	9,144	9,499	9,683	9,686
7	ТД метронидазол:ПЭГ-3000 (1:1)	2,0:2,0	4,757	6,984	8,156	8,601	8,717	8,973	9,457	9,639
8	ТД метронидазол:ПЭГ-3000 (1:5)	4,0:20,0	4,460	7,698	9,127	8,950	9,190	9,370	9,549	9,751

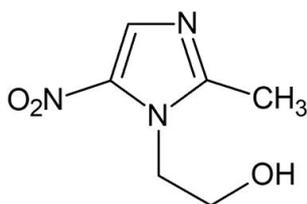
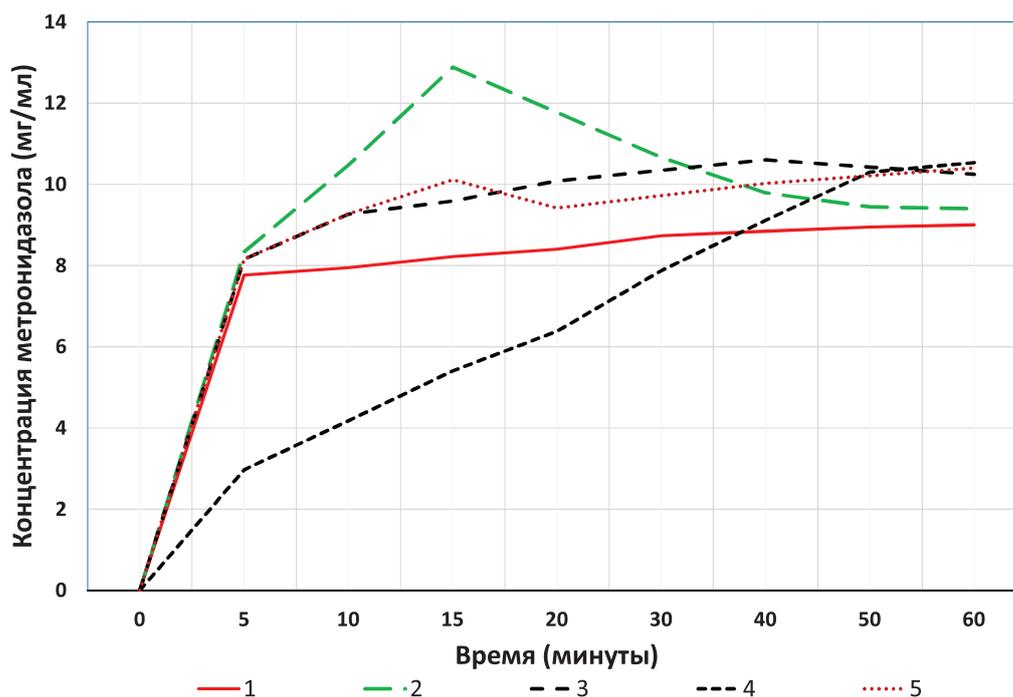
Рисунок 1 – Структурная формула метронидазола $C_6H_9N_3O_3$, 2-(2-Метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)этанол, (171,15 г/моль)

Рисунок 2 – Изменение концентрации растворов метронидазола и ТД с ПЭГ-1500 и с ПЭГ-2000 во времени

Примечание: 1 – метронидазол (субстанция); 2 – ТД метронидазол : ПЭГ-1500 (1:1); 3 – ТД метронидазол : ПЭГ-1500 (1:3); 4 – ТД метронидазол : ПЭГ-1500 (1:5); 5 – ТД метронидазол : ПЭГ-2000 (1:1)

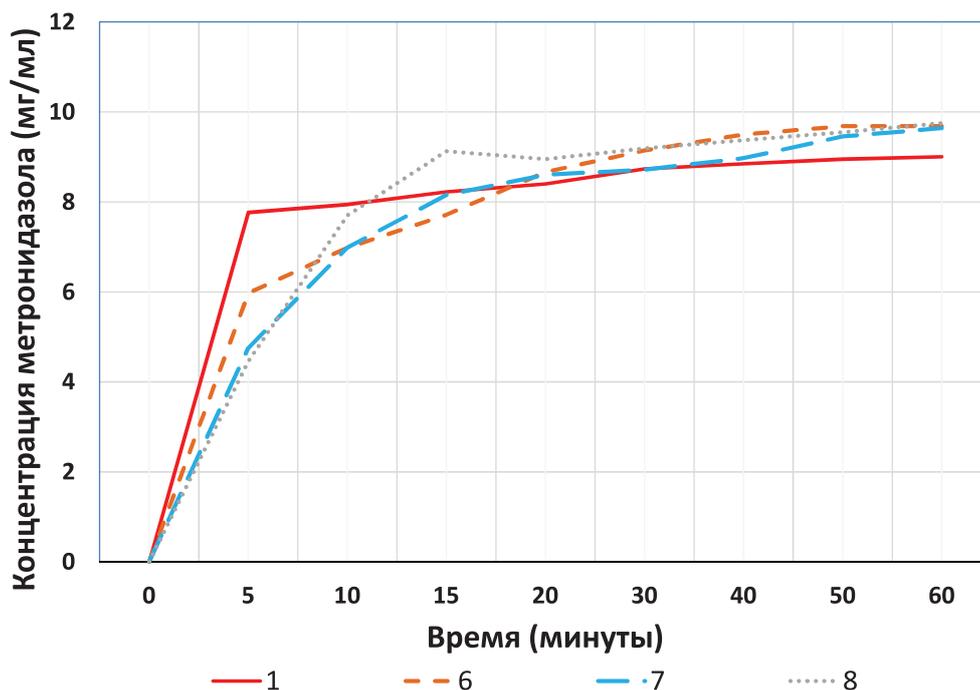


Рисунок 3 – Изменение концентрации растворов метронидазола и ТД с ПЭГ-2000 и с ПЭГ-3000 во времени

Примечание: 1 – метронидазол (субстанция); 6 – ТД метронидазол : ПЭГ-2000 (1:5); 7 – ТД метронидазол : ПЭГ-3000 (1:1); 8 – ТД метронидазол : ПЭГ-3000 (1:5)

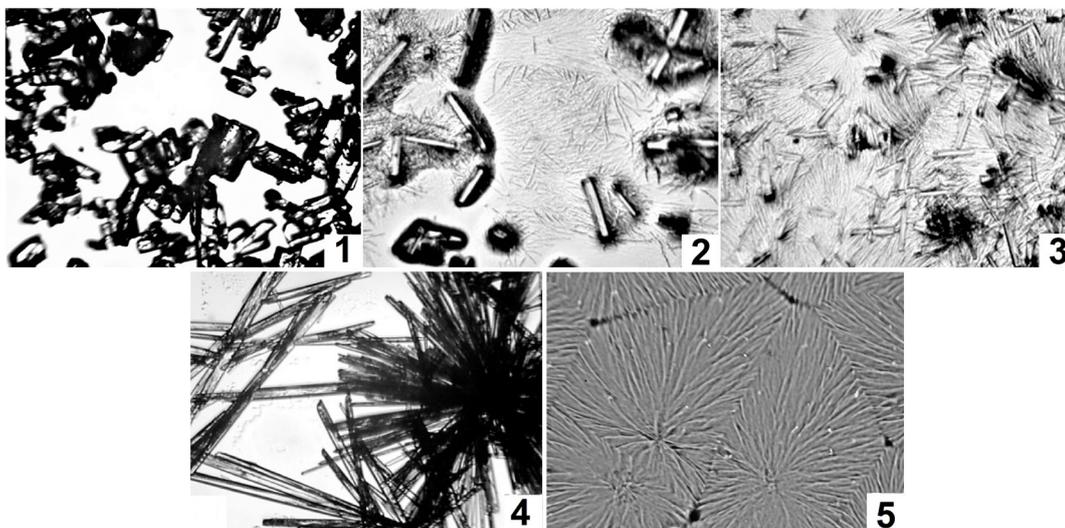


Рисунок 4 – Микрорентгенографический анализ (ув. × 64)

Примечание: 1 – метронидазол (субстанция); 2 – ТД метронидазол : ПЭГ-1500 (1 : 1); 3 – ТД метронидазол : ПЭГ-1500 (1 : 3); 4 – перекристаллизованная субстанция метронидазола; 5 – ПЭГ-1500 после удаления растворителя

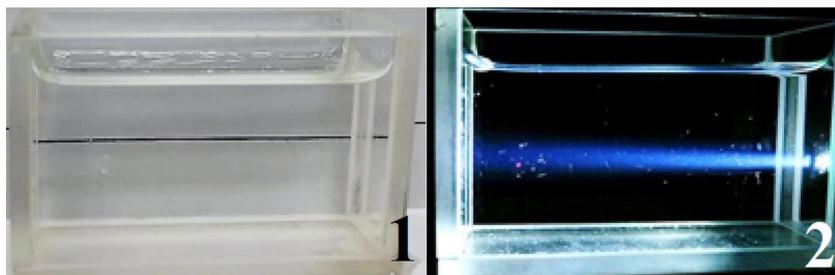


Рисунок 5 – Оптические свойства растворов ТД метронидазол

Примечание: ПЭГ-1500 (1 : 1): 1 – внешний вид раствора при дневном освещении; 2 – тот же раствор, наблюдение конуса Фарадея-Тиндала

Из анализа научной литературы и предварительных собственных исследований, определен диапазон оптимальных соотношений метронидазол: ПЭГ – от 1:1 до не более 1:5 (по массе) [1–9]. С учётом физико-химических свойств ПЭГ (как вспомогательного вещества) и его влияния на технологические характеристики твёрдых лекарственных форм (например, на их прочность), указанный диапазон соотношений является оптимальным для будущего включения ТД метронидазола с ПЭГ в состав твёрдых лекарственных форм.

Для изучения растворения навески исследуемых образцов ТД брали в избытке по отношению к растворителю (воде очищенной). Относительная погрешность для средних значений концентрации $\approx 4,79\%$. Изменение растворимости рассчитывали, как отношение концентрации насыщенного раствора изучаемого образца к концентрации насыщенного раствора субстанции метронидазола спустя 60 мин от начала процесса растворения. К концу эксперимента растворы всех изучаемых образцов были мутные, насыщенные. Исходная субстанция метронидазола растворяется достаточно медленно (рис. 2). Через 5 мин от начала эксперимента концентрация метронидазола достигает 7,767 мг/мл и далее незначительно увеличивается, достигая к 30-ти минутам почти постоянное значение ≈ 9 мг/мл.

Исходя из полученных данных (таблица 1; рис. 2, 3), видно, что метронидазол в некоторых случаях лучше растворяется из ТД, а растворимость его зависит от выбранного полимера и от массового отношения метронидазол: ПЭГ в ТД.

При использовании ПЭГ-1500 наибольшее увеличение растворимости метронидазола наблюдается в случае ТД метронидазол: ПЭГ-1500, полученных в массовом соотношении 1:3 и 1:5 – на 14–17%. Концентрация метронидазола в растворах данных ТД к концу эксперимента достигает 10,244 и 10,534 мг/мл, соответственно. При использовании ПЭГ-2000 наибольшее влияние на растворение метронидазола наблюдается в случае ТД метронидазол: ПЭГ-2000, полученной в массовом соотношении 1:1. Концентрация метронидазола в растворе данной ТД к моменту времени 60-ти минут достигает 10,402 мг/мл, что выше на 16%, чем у раствора субстанции в аналогичный момент времени. Повышение содержания ПЭГ-2000 в ТД не приводит к какому-либо выраженному повышению растворимости метронидазола.

Таким образом, для ТД метронидазол ПЭГ-2000 (1:5) растворимость метронидазола составляет 9,686 мг/мл, при этом превышая растворимость субстанции на 7,6% (рис. 3). Использование ПЭГ-3000 для получения ТД как в соотношении 1:1, так и 1:5, аналогично увеличивает, растворимость метронидазола незначительно – до 9,639 и 9,751 мг/мл, соответственно (на 7,1 и 8,3%). Использование ТД не во всех случаях повышает скорость растворения метронида-

зола. Скорость растворения метронидазола при этом может, как повышаться, так и понижаться, в первые 20–30 мин.

Для растворов некоторых ТД наблюдается явление пересыщения. При растворении ТД метронидазол: ПЭГ-1500 (1:1) и ТД метронидазол: ПЭГ-2000 (1:1) в течение первых 15 мин концентрация метронидазола резко повышается до максимального значения. Затем, вероятно, в результате рекристаллизации, концентрация снижается, с выходом значений «на плато» (50–60 мин.). Таким образом, наибольшее повышение скорости растворения метронидазола наблюдается из ТД с ПЭГ-1500 (1:1). В момент времени 15-ти мин. от начала растворения концентрация метронидазола в растворе данной ТД достигает своего наивысшего значения – 12,885 мг/мл, что на 57% превышает значение концентрации в растворе субстанции в аналогичный момент времени. Однако далее к 40 мин. уровень концентрации метронидазола в растворе ТД снижается до значения $\approx 9,8$ г/мл. Вышеописанные колебания концентрации метронидазола в растворах ТД, на наш взгляд, связаны с рядом взаимно противоположных процессов. С одной стороны, это процессы высвобождения метронидазола и матрицы ПЭГ при растворении ТД, и переход его в водную среду в молекулярно-коллоидном виде. В этом случае ПЭГ играет функции солилизатора (при невысоком содержании в ТД) и/или коллоидной защиты, стабилизируя ранее достигнутый высокий уровень концентрации метронидазола. С другой стороны, протекают процессы рекристаллизации метронидазола, коагуляция его коллоидных частиц, и может сказываться высаливающее действие ПЭГ. Особенно это заметно в случае ТД с большим содержанием полимера. Баланс этих процессов и их результат в достижении, какого-либо уровня концентрации метронидазола в растворе его ТД, носит сложно описываемый характер и является темой для отдельного исследования.

Исходя из результатов микроскопии (рис. 4), исходная субстанция метронидазола – частицы вещества с чётко выраженным кристаллическим строением. Обломки кристаллов, а именно бесцветные, прозрачные, продолговатой формы, слоистые, в большинстве случаев достаточно однотипные. Прослеживаются ровные параллельные грани, в форме прямоугольного параллелепипеда. Предположительно, порошок субстанции ранее не подвергался интенсивной микронизации. Рекристаллизованный метронидазол отличается от начальной субстанции. Выраженные игольчатые, прозрачные кристаллы. Грани ровные, иногда собранные в звёздчатые скопления. Полимерный носитель (ПЭГ) – бесцветная, прозрачная, масса, располагающаяся по поверхности предметного стекла плёнкой без внутренней структуры. Поверхность складчатая. С большой долей вероятности можно утверждать, что это некристалличе-

ская, аморфная структура. ТД с ПЭГ – представляют собой гетерогенные системы, состоящие минимум из 3-4 фаз. Некоторые структуры имеют частично игольчатое строение – вероятно рекристаллизованная субстанция. Отмечены очень мелкие (предположительно аморфные), трудно идентифицируемые объекты, представляющие собой, или остановившийся начальный этап рекристаллизации субстанции в вязком полимере, или (возможно) её полиморфную модификацию, или продукт комплексообразования с ПЭГ. Учитывая, что содержание метронидазола в ТД от 30 до 50% по массе, прозрачный фон, скорее всего, твёрдый раствор метронидазола в ПЭГ.

Таким образом, ТД метронидазол : ПЭГ – сложная микрокристаллическая картина, сочетающая признаки исходной субстанции метронидазола (кристаллической и аморфной природы), ПЭГ, их твёрдого раствора, и, возможно, продукты комплексообразования. При изучении ТД весьма распространены термо-методы. Применительно к ТД они основаны на том, что плавление или термическая деструкция включенной в полимерный матрикс молекулы действующего вещества происходит во время термической деструкции полимера носителя или после него. Основным критерий формирования комплекса – это исчезновение термических эффектов, типичных для действующего вещества, как индивидуальной фазы. В данном случае при исследовании ТД метронидазола использование, например, дифференциальной сканирующей калориметрии может носить вспомогательный характер. Однако информации полученной методом микроскопии, на наш взгляд вполне достаточно, чтобы сделать предположение о влиянии кристалличности метронидазола в ТД на повышение растворимости действующего вещества из полимерной матрицы ПЭГ.

Часто в ряде работ, посвящённых получению и исследованию ТД, используется метод ИК-спектроскопии, который на основании анализа сдвига характеристических полос действующего вещества в ТД позволяет предположить возникновение водородных связей в комплексе между молекулами носителя и лекарства. Наши предыдущие исследования позволяют утверждать, что данный метод исследования не всегда возможно использовать при изучении таких многокомпонентных систем, как ТД [1–10]. В первую очередь, это связано с выраженным экранирующим эффектом полимеров (в данном случае – ПЭГ), из-за которого часто невозможно получить настоящую картину взаимодействия компонентов ТД. ИК-спектр ТД с ПЭГ почти полностью идентичен ИК-спектру изучаемого полимера и почти не содержит характеристических полос самого действующего вещества. Однако, в абсолютном большинстве случаев даже, если взаимодействие с ПЭГ и наблюдалось, то носило оно не ковалентный характер и представляло собой слабое взаимодействие на уровне возникновения во-

дородных связей. Косвенно отсутствие какого-либо взаимодействия между компонентами изучаемой ТД подтверждает УФ-спектроскопия изучаемых образцов.

УФ-спектр метронидазола в составе ТД с ПЭГ полностью идентичен УФ-спектру исходной субстанции метронидазола. Микроскопия позволяет сделать вывод, что одной из причин повышения растворимости метронидазола из ТД с ПЭГ, является потеря его кристаллического строения ещё до растворения ТД в воде. На стадии получения ТД при удалении общего растворителя под вакуумом метронидазол частично растворяется в матрице ТД в среде носителя ПЭГ с образованием твёрдого раствора. Затем при растворении в воде ТД по мере растворения полимера высвобождает действующее вещество в молекулярно-коллоидном виде. При этом ПЭГ, возможно, дополнительно оказывает солюбилизирующее действие, стабилизируя концентрацию метронидазола. Кроме того, по ряду источников [17, 19, 20, 23 – 25], важным фактором, способствующим повышению растворения действующих веществ из ТД, является образование их коллоидных растворов.

В связи с этим были изучены оптические свойства полученных в работе растворов. Для фильтрованных растворов всех исследуемых в работе ТД с ПЭГ наблюдается конус Фарадея-Тиндаля – рассеивание света синеватого оттенка, обусловленное коллоидно-дисперсным состоянием растворённого метронидазола (рис. 5).

При этом, аналогично подготовленные к исследованию растворы вспомогательных веществ (ПЭГ) и насыщенные растворы субстанции метронидазола или его смесей с исследуемыми полимерами, эффекта Фарадея-Тиндаля не демонстрировали. Полученные результаты подчёркивают принципиальную значимость получения ТД описанным в работе методом «удаления растворителя» для повышения растворимости метронидазола в воде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что улучшение процесса растворения метронидазола из ТД, полученных методом «удаления растворителя» с использованием в качестве общего растворителя спирта этилового 96%, связано со снижением кристалличности метронидазола при получении его ТД и солюбилизации, а также с образованием коллоидных растворов метронидазола, стабилизированных ПЭГ при растворении ТД. Оптимальным ПЭГ для получения ТД является ПЭГ с молекулярной массой не более, чем 1500 г/моль, а наилучшим соотношением компонентов ТД (метронидазол : ПЭГ) является соотношение 1:1 по массе. Полученные результаты будут использованы при разработке технологии «шипучих» таблеток и гранулятов метронидазола, содержащих его ТД с ПЭГ.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.И. Краснюк (мл.) – общее руководство и планирование эксперимента; С.Р. Нарышкин и И.С. Бобров – изучение растворения метронидазола; И.И. Краснюк – измерение концентрации метронидазола в растворах; А.В. Беляцкая – приготовления твердых дисперсий; О.И. Степанова – сбор и обработка данных литературы; А.Н. Воробьев – исследование оптических свойств растворов; В.Г. Янкова – анализ, обработка и подготовка графического материала; Д.В. Рау – микрокристаллоскопические исследования.

Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Krasnyuk I.I., Beliatskaya A.V., Krasnyuk I.I. et al. Influence of Polymers on the Physicochemical Properties of Benzonal in Solid Dispersions // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2020. – Vol. 75, No.6. – P. 388–390. DOI: 10.3103/S0027131420060127.
2. Beliatskaya A.V., Krasnyuk I.I., Elagina A.O., et al. Study of the Solubility of Furazolidone from Solid Dispersions with Polyvinylpyrrolidone // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2020. – Vol. 75. – P. 43–46. DOI: 10.3103/S0027131420010046
3. Kosenkova S.I., Krasnyuk I.I., Krasnyuk Jr. I.I., et al. Antimycotic Activity of Naftifine Hydrochloride Solution in Combination with Poly(Ethylene Glycols) // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2020. – Vol. 54, No.3. – P. 310–311. DOI: 10.1007/s11094-020-02196-w.
4. Belyatskaya A.V., Kashlikova I.M., Krasnyuk I.I. Krasnyuk I.I.(Jr.), Stepanova O.I., Vorob'ev A.N. Development of compositions and production technology for gels with a solid dispersal of nitrofurazone // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2020. – Vol. 53, No.10. – P. 981–985. DOI: 10.1007/s11094-020-02109-x.
5. Krasnyuk I.I. (Jr.), Ovsyannikova L.V., Stepanova O.I., Belyatskaya A.V., Krasnyuk I.I., Grikh V.V., Kosheleva T.M., Kozin D.A., Skovpen Y.V. Development of dosage forms containing solid dispersion of diclofenac // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2018. – Vol. 52, No.4. – P. 357–360. DOI: 10.1007/s11094-018-1821-6.
6. Krasnyuk I.I. (Jr.), Beliatskaya A.V., Krasnyuk I.I., Stepanova O.I., Korol L.A., Valeeva A.M., Grikh V.V., Ovsyannikova L.V., Kosheleva T.M. Effect of solid dispersions on the dissolution of ampicillin // *BioNanoScience*. – 2017. – Vol. 7. – No.2. – P. 340–344. DOI: 10.1007/s12668-016-0342-6.
7. Krasnyuk I.I. (Jr.), Kosheleva T.M., Belyatskaya A.V., Krasnyuk I.I., Stepanova O.I., Skovpen Y.V., Grikh V.V., Ovsyannikova L.V. Effect of solid dispersions with polyethylene glycol 1500 on the solubility of indomethacin // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2018. – Vol. 52, No.3. – P. 241–244. DOI: 10.1007/s11094-018-1799-0.
8. Belyatskaya A.V., Krasnyuk I.I. (Jr.), Krasnyuk I.I., Stepanova O.I., Kosheleva T.M., Kudinova T.P., Vorob'ev A.N., Maryanyan M.M. Dissolution of ketoprofen from poly(ethylene glycol) solid dispersions // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – Vol. 52, No.12. – P. 1001–1006. DOI: 10.1007/s11094-019-01941-0.
9. Belyatskaya A.V., Krasnyuk I.I. (Jr.), Krasnyuk I.I., Stepanova O.I., Abgaryan Z.A., Kudinova T.P., Vorob'yov A.N., Nesterenko I.S. Study on the solubility of ketoprofen from solid dispersions with polyvinylpyrrolidone // *Moscow university chemistry bulletin*. – 2019. – Vol. 74, No.2. – P. 93–99. DOI: 10.3103/S0027131419020056.
10. Silaeva S.Yu., Belenova A.S., Slivkin A.I., Chupandina E.E., Naryshkin S.R., Krasnyuk I.I. (Jr.), Krasnyuk I.I. Use of solid dispersion systems in pharmacy // *Condensed Matter and Interphases*. – 2020. – Vol. 22, No.2. – P. 173–181. DOI: 10.17308/kcmf.2020.22/2820.
11. Троянова С.Ю., Корсунская И.М., Соркина И.Л., Соболев В.В. Обоснование эффективности метронидазола в терапии розацеа // *Клиническая дерматология и венерология*. – 2017. – Vol. 16, No.5. – P. 45–48. DOI: 10.17116/klinderma201716545-48.
12. Feres M., Retamal-Valdes B., Mestnik M.J., de Figueiredo L.C., Faveri M., Duarte P.M., Fritoli A., Faustino E., Souto M.L.S., de Franco Rodrigues M., Giudicissi M., Nogueira B.C.L., Saraiva L., Romito G.A., Pannuti C.M. The ideal time of systemic metronidazole and amoxicillin administration in the treatment of severe periodontitis: study protocol for a randomized controlled trial // *Trials*. – 2018. – Vol. 19, No.1. – P. 201. DOI: 10.1186/s13063-018-2540-8.
13. Buddenkotte J, Steinhoff M. Recent advances in understanding and managing rosacea // *F1000Res*. – 2018. – Vol. 7. – F1000 Faculty Rev-1885. DOI: 10.12688/f1000research.16537.1.
14. Singh N., Sarangi M.K., Solid Dispersion – a Novel Approach for Enhancement of Bioavailability of Poorly Soluble Drugs in Oral Drug Delivery System // *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 3, No.2. – P. 30–37. DOI: 10.19080/GJPPS.2017.03.555608.
15. Huang S., Mao C., Williams R.O. 3rd, Yang C.Y. Solubility Advantage (and Disadvantage) of Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions // *J Pharm Sci*. – 2016. – Vol. 105, No.12. – P. 3549–3561. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.08.017.
16. Huang Y., Dai W.G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2013. – Vol. 4. – No.1. – P. 18–25. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.11.001.
17. Chen X., Partheniadis I., Nikolakakis I., Al-Obaidi H. Solubility Improvement of Progesterone from Solid Dispersions Prepared by Solvent Evaporation and Co-milling // *Polymers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, No.4. – P. 854. DOI: 10.3390/polym12040854.
18. Teodorescu M., Bercea M., Morariu S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges // *Biotechnol Adv*. – 2019. – Vol. 37, No.1. – P. 109–131. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.008.

19. Hou H.H., Rajesh A., Pandya K.M., Lubach J.W., Muliadi A., Yost E., Jia W., Nagapudi K. Impact of Method of Preparation of Amorphous Solid Dispersions on Mechanical Properties: Comparison of Coprecipitation and Spray Drying // *J Pharm Sci.* – 2019. – Vol. 108, No.2. – P. 870–879. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.09.008.
20. Parker A.S., Gilpin C.J., Stewart A.A., Beaudoin S.P., Taylor L.S. Dissolution of indomethacin crystals into a polymer melt: role of diffusion and fragmentation // *Crystal growth and design.* – 2019. – Vol. 19, No.6. – P. 3315–3328. DOI: 0000-0001-6986-8252.
21. Siepman J., Faham A., Clas S.D., Boyd B.J., Jannin V., Bernkop-Schnürch A., Zhao H., Lecommandoux S., Evans J.C., Allen C., Merkel O.M., Costabile G., Alexander M.R., Wildman R.D., Roberts C.J., Leroux J.C. Lipids and polymers in pharmaceutical technology: Lifelong companions // *Int J Pharm.* – 2019. – Vol. 558. – P. 128–142. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.080.
22. Younis M.A. Solid dispersion technology, a contemporary overview on a well-established technique // *Universal Journal of Pharmaceutical Research.* – 2017. – Vol. 2, No.3. – P. 15–19. DOI: 10.22270/ujpr.v2i3.RW1.
23. Luebbert C., Klanke C., Sadowski G. Investigating phase separation in amorphous solid dispersions via Raman mapping // *Int J Pharm.* – 2018. – Vol. 535, No.1–2. – P. 245–252. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.014.
24. Okada K., Hirai D., Hayashi Y., Kumada S., Kosugi A., Onuki Y. A Novel Approach to Evaluate Amorphous-to-Crystalline Transformation of Active Pharmaceutical Ingredients in Solid Dispersion Using Time-Domain NMR // *Chem Pharm Bull (Tokyo).* – 2019. – Vol. 67, No.3. – P. 265–270. DOI: 10.1248/cpb.c18-00887.
25. Singh A., Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2016. – Vol. 100. – P. 27–50. DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.010.

АВТОРЫ

Краснюк Иван Иванович (мл.) – доктор фармацевтических наук, профессор, Институт фармации им. А.П. Нелюбина, кафедра аналитической, физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0001-8557-8829. E-mail: krasnyuk.79@mail.ru

Нарышкин Савва Русланович – аспирант, Институт фармации им. А.П. Нелюбина, кафедра аналитической, физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0003-1775-4805. E-mail: savva.naryshkin@gmail.com

Краснюк Иван Иванович – доктор фармацевтических наук, профессор, Институт фармации им. А.П. Нелюбина кафедра фармацевтической технологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0002-7242-2988. E-mail: krasnyuki@mail.ru

Беляцкая Анастасия Владимировна – кандидат фармацевтических наук, доцент, Институт фармации им. А.П. Нелюбина, кафедра фармацевтической технологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0002-8214-4483. E-mail: av.beliatskaya@mail.ru

Степанова Ольга Ивановна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакологии, Институт фармации им. А.П. Нелюбина, кафедра фармакологии ФГАОУ ВО «Первый

Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0002-9885-3727. E-mail: o.i.nikulina@mail.ru

Бобров Иван Сергеевич – студент, Институт фармации им. А.П. Нелюбина, кафедра аналитической, физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0001-8263-5541. E-mail: bobrov2602@yandex.ru

Янкowa Виктория Германовна – кандидат фармацевтических наук, доцент, Институт фармации им. А.П. Нелюбина, кафедра аналитической, физической и коллоидной химии, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0002-8233-5087. E-mail: yankowa@rambler.ru

Джyльетта В. Рау – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии, Институт фармации им. А.П. Нелюбина, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Dr, PhD, Институт структуры вещества Национального исследовательского совета (ISM-CNR), Италия. ORCID ID: 0000-0002-7953-1853. E-mail: giulietta.rau@ism.cnr.it

Воробьев Александр Николаевич – кандидат фармацевтических наук, заведующий лабораторией промышленной фармацевтической технологии ЦКП (НОЦ) ФГАОУ «Российский университет дружбы народов». ORCID ID: 0000-0002-7182-9911. E-mail: alek_san2007@mail.ru

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 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.alta.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 группы 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, мочевого пузыря, 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 мышах при однократном введении

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

На начало эксперимента масса тела самок мышей 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 клинико-лабораторных исследований

Результаты анализа физико-химических свойств мочи показали, что в группе самок кроликов, получавшей тестируемый препарат в максимальной исследованной дозе, наблюдалось снижение уровня pH мочи (до 5,5) по сравнению с внутрилабораторными нормами (pH от 7 до 9)⁹. После периода отсроченного наблюдения снижение уровня pH 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±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±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
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)

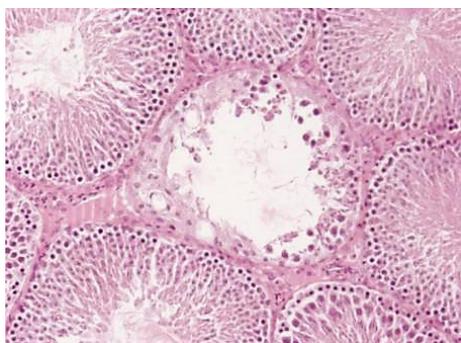


Рисунок 1 – Срез семенника самца крысы группы, получавшей препарат в дозе 45 мг/кг, 91-й день эксперимента

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

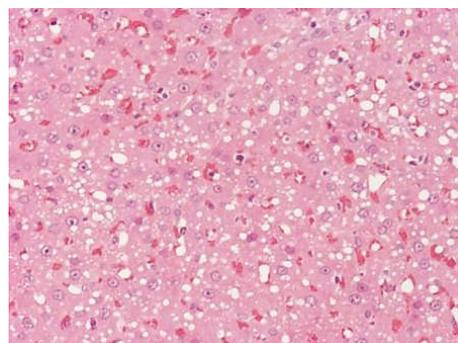


Рисунок 2 – Срез печени самца крысы группы, получавшей препарат в дозе 90 мг/кг, 91-й день эксперимента

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

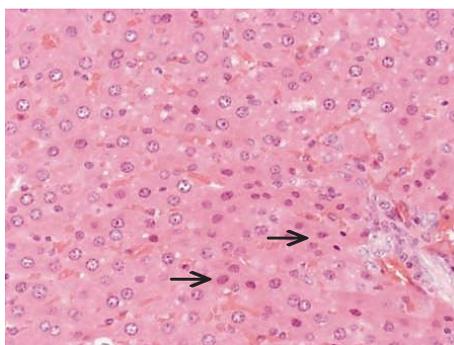


Рисунок 3 – Срез печени самки крысы группы, получавшей препарат в дозе 90 мг/кг, отсроченное наблюдение, 121-й день эксперимента

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 гиалиноцитоз 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. Некропсия 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 pH 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 – ННИОТ 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 невирапина, 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 ННИОТ невирапина¹⁵. В доклинических исследованиях рилпивирин также установлено токсическое действие на гемопозитическую систему у мышей, крыс и собак¹⁶. В клинической практике среди побочных эффектов невирапина (по данным пострегистрационных исследований) отмечается лекарственная реакция с эозинофилией и системными симптомами, такими как сыпь, лихорадка, артралгия, миалгия и др.¹⁷ В результате приема этравирин 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 ННИОТ 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-EFVIRENZ.

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

1. Kemnec 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/>
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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 Bryostatins-1 // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7, No.1. – P. 2385. DOI: 10.1038/s41598-017-02634-y.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Eggleton J.S., Nagalli S. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
11. 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.
12. 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
13. 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
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Chawla A., Wang C., Patton C., Murray M., Punekar 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., Лугаченко 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

УДК 615.225.4:547.581.2



СИНТЕЗ, АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ С ТАУРИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ

А.К. Брель, Н.В. Атапина, Ю.Н. Будаева, С.В. Лисина, С.С. Царук, Д.В. Куркин, И.Н. Тюренков

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов 1

E-mail: rodina.natasha@inbox.ru

Получено 30.09.2020

Принята к печати 20.03.2021

Высокая распространенность тромботических нарушений, недостаточная эффективность или безопасность антитромботической терапии является актуальной проблемой современного здравоохранения. Основным средством профилактики тромбоза является ацетилсалициловая кислота. Несмотря на многолетнюю историю аспирина привлекает исследователей в области медицинской химии, биологии и медицины. Разработка новых антиагрегантов, в том числе и химической модификацией молекулы ацетилсалициловой кислоты остается актуальной. Модификация молекулы ацетилсалициловой кислот с использованием аминокислот и получением их солевых форм, позволяет сохранять антиагрегантные или антитромботические свойства, а также сообщить дополнительные фармакодинамические эффекты. В современной науке уделяется немало внимания серосодержащей аминокислоте таурин. При анализе современной научной литературы обнаружено протективное действие таурина при сахарном диабете и сердечно-сосудистых заболеваниях, дисфункции печени, желудочно-кишечного тракта, заболеваниях почек.

Цель. Синтез новых соединений, определение их физических характеристик и оценка антиагрегантной и антитромботической активности *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Для подтверждения структуры, синтезированных новых производных гидроксibenзойных кислот с тауриновым фрагментом методом ацелирования, использовали тонкослойную хроматографию, ЯМР спектры. Исследования *in vitro* проводили на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по методике Born G. в модификации Габбасова В.А. Исследования *in vivo* проводили на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлоридом железа на следующих группах животных: интактные, с экспериментальным сахарным диабетом и трех годовалые, так же была проведена оценена скорость кровотока из хвостовой вены.

Результаты. Были синтезированы новые соединения, представляющие собой производные орто-, мета- и пара-гидроксibenзойных кислот с остатком таурина. Описана методика получения соединений N-гидроксibenзоил таурина и их солевых форм, определены спектральные характеристики и температура плавления. Синтезированные соединения по растворимости превосходят ацетилсалициловую кислоту, не уступают ей в антиагрегантной и антитромботической активности. Представлены результаты оценки антиагрегантной активности *in vitro* в широком диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-8} М. Выявлено, что дикалиевая соль N-(2-гидроксibenзоил)таурина проявляет меньшую антиагрегантную активность, чем дикалиевая соль N-(3-гидроксibenзоил)таурина. Наиболее выраженную антиагрегантную активность проявляет соединение N-(4-гидроксibenзоил)таурин. В экспериментах *in vivo* на модели артериального тромбоза у 3-летних или животных с экспериментальным сахарным диабетом, тромбоз сонной артерии происходил быстрее, чем у молодых или интактных. Однократное предварительное пероральное введение исследуемых соединений пролонгировало время образования тромба, что позволяет сделать заключение о наличии у них антитромботического действия. Дикалиевая соль N-(3-гидроксibenзоил)таурина в проведенном исследовании проявляет более выраженную чем у ацетилсалициловой кислоты активность.

Заключение. На фоне моделируемых патологий, исследуемые препараты проявили ожидаемую антитромботическую активность, по выраженности не уступающую выявленной у ацетилсалициловой кислоты.

Ключевые слова: антиагреганты; антиагрегантная активность; антитромботическая активность; ацетилсалициловая кислота; агрегация тромбоцитов; таурин

Список сокращений: ESC – европейская ассоциация кардиологии; DMSO-d₆ – диметилсульфоксид-d₆; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; HUVECs – эндотелиальные клетки человека; АДФ – аденозинди дифосфорная кислота; АСК – ацетилсалициловая кислота; АФК – активные формы кислорода; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; СД – сахарный диабет; ЭСД – экспериментальный сахарный диабет; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ЦОГ – циклооксигеназа; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

Для цитирования: А.К. Брель, Н.В. Атапина, Ю.Н. Будаева, С.В. Лисина, С.С. Царук, Д.В. Куркин, И.Н. Тюренков. Синтез, антиагрегационная и антитромботическая активности новых производных гидроксibenзойных кислот с тауриновым фрагментом. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):222-234. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-222-234

© А.К. Брель, Н.В. Атапина, Ю.Н. Будаева, С.В. Лисина, С.С. Царук, Д.В. Куркин, И.Н. Тюренков, 2021

For citation: A.K. Brel, N.V. Atapina, Y.N. Budaeva, S.V. Lisina, S.S. Tsaruk, D.V. Kurkin, I.N. Tyurenkov. Synthesis, antiaggregation and antithrombotic activities of new derivatives of hydroxybenzoic acids with tauric fragment. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):222-234. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-222-234

SYNTHESIS, ANTIAGGREGATION AND ANTITROMBOTIC ACTIVITIES OF NEW DERIVATIVES OF HYDROXYBENZOIC ACIDS WITH TAURIC FRAGMENT

A.K. Brel, N.V. Atapina, Y.N. Budaeva, S.V. Lisina, S.S. Tsaruk, D.V. Kurkin, I.N. Tyurenkov

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

E-mail: rodina.natasha@inbox.ru

Received 30 Sep 2020

Accepted 20 March 2021

A high prevalence of thrombotic disorders, insufficient effectiveness or safety of antithrombotic therapy is an urgent problem of modern healthcare. The main means of preventing thrombosis is acetylsalicylic acid. Despite its long history, aspirin attracts researchers in the fields of medicinal chemistry, biology, and medicine. The development of new antiplatelet agents, including chemical modification of the acetylsalicylic acid molecule, remains relevant. Modification of the acetylsalicylic acid molecule using amino acids and obtaining their salt forms makes it possible to maintain antiplatelet or antithrombotic properties, as well as to impart additional pharmacodynamic effects. In modern science, a lot of attention is paid to the sulfur-containing amino acid taurine. An analysis of modern scientific literature revealed the protective effect of taurine in diabetes mellitus and cardiovascular diseases, liver dysfunction, gastrointestinal tract, and kidney diseases.

The aim of the article is to study synthesis of new compounds, determination of their physical characteristics and assessment of their antiplatelet and antithrombotic activities *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods. To confirm the structure of the synthesized new derivatives of hydroxybenzoic acids with a taurine fragment by the acylation method, thin layer chromatography and NMR spectra were used. *In vitro* studies were carried out on the model of ADP-induced platelet aggregation according to the Born G. methods modified by V.A. Gabbasov. *In vivo*, the studies were carried out on the model of arterial thrombosis induced by the application of iron chloride in the following groups of animals: intact, with experimental diabetes mellitus and three-year-olds; the rate of bleeding from the tail vein was also evaluated.

Results. New compounds – derivatives of ortho-, meta- and para-hydroxybenzoic acids with a taurine residue – were synthesized. A procedure for the preparation of N-hydroxybenzoyl taurine compounds and their salt forms have been described; their spectral characteristics and melting points have been determined. The synthesized compounds are superior to acetylsalicylic acid in solubility and are not inferior to it in antiplatelet and antithrombotic activities. The results of the *in vitro* antiplatelet activity assessment in a wide concentration range from 10^{-4} M to 10^{-8} M, are presented. It has been revealed that the dipotassium salt of N-(2-hydroxybenzoyl)taurine exhibits a less antiplatelet activity than the dipotassium salt of N-(3-hydroxybenzoyl)taurine. The most pronounced antiplatelet activity is exhibited by the compound N-(4-hydroxybenzoyl)taurine. In *in vivo* experiments on the model of arterial thrombosis in 3-year-olds or animals with experimental diabetes mellitus, carotid artery thrombosis occurred faster than in young or intact animals. A single preliminary oral administration of the test compounds prolonged the time of the thrombus formation, which makes it possible to conclude that they have an antithrombotic effect. In this study, the dipotassium salt of N-(3-hydroxybenzoyl)taurine exhibits a more pronounced activity than that of acetylsalicylic acid.

Conclusion. Against the background of the modeled pathologies, the studied drugs showed the expected antithrombotic activity, in terms of the severity not inferior to that found in acetylsalicylic acid.

Keywords: antiplatelet agents; antiplatelet activity; antithrombotic activity; acetylsalicylic acid; platelet aggregation; taurine
Abbreviations: ESC – European Society of Cardiology; DMSO- d_6 – dimethyl sulfoxide- d_6 ; GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); HUVECs – Human Umbilical Vein Endothelial Cells (human endothelial cells); ADP – adenosine diphosphoric acid; ASA – acetylsalicylic acid; ROS – reactive oxygen species; NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs; DM – diabetes mellitus; CVD – cardiovascular disease; COX – cyclooxygenase; GI tract – gastrointestinal tract

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующие позиции в статистике смертности населения в большинстве развитых стран [1-4] и являются основной причиной смертности в большинстве Европейских стран [5]. Главной целью Европейской ассоциации кардиологов (ESC, European Society of Cardiology) на протяжении 70-ти лет является совершенствование стандартов диагностики и лечения

сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), в том числе и оптимизация проведения антиагрегантной и антиромботической терапии [6]. В первую очередь, это уменьшение числа, возникающих из-за нарушения баланса в системе гемостаза, тромбозов – основной причины инсультов, инфарктов миокарда и ампутаций конечностей [7, 8].

Кардиоваскулярные заболевания являются причиной смерти более 50% людей в странах со средним

уровнем дохода и <30% людей в странах с высоким [9]. Наблюдаемая разница возникла из-за результативного внедрения профилактических мероприятий и высокотехнологичной медицинской помощи, оптимизации применения и повышения качества лекарственных средств, что в совокупности и привело к снижению гибели от ССЗ [10].

Ключевым фактором, определяющим прогноз большинства заболеваний сердечно-сосудистой системы, является проблема низкой эффективности предупреждения артериальных тромбозов. Своевременное проведение профилактических мероприятий увеличивает продолжительность жизни, улучшает ее качество, снижает траты на лечение и реабилитацию пациентов.

Антиагреганты, подавляя функциональную активность тромбоцитов, препятствуют внутрисосудистой гемокоагуляции, их применение доказано снижает риск тромбозов при многих социально-значимых заболеваниях [11].

Попытки улучшить фармакодинамические или фармакокинетические свойства известных препаратов является распространенным подходом к разработке новых лекарственных средств.

Инновационные фармацевтические препараты должны угнетать функциональную активность тромбоцитов более эффективно и безопасно, чем известные антиагрегантные средства и при этом оказывать плейотропные эффекты. Ацетилсалициловая кислота, блокаторы рецепторов АДФ – P2Y₁₂ (тиклопидин, клопидогрел, прасугрел, тикангрелор, кангрелор), антагонисты гликопротеинов IIb/IIIa имеют высокие показатели эффективности и безопасности [12], но в тоже время проблема тромботических осложнений в полной мере не решена.

Ацетилсалициловая кислота продолжает оставаться самым назначаемым антиагрегантом. Ряд распространённых заболеваний, таких как сахарный диабет, метаболический синдром, ожирение рассматриваются, как независимый фактор высокого риска развития сердечно-сосудистых осложнений. В последних рекомендациях [13] по первичной профилактике атеросклеротических осложнений сахарного диабета (СД) в качестве средства базисной терапии указываются низкие дозы ацетилсалициловой кислоты. Это свидетельствует о несомненном признании достоинств этого препарата, его терапевтической широте и доступности. Химическая модификация молекул, обладающих выраженной фармакологической активностью, продолжает оставаться одним из методов разработки лекарственных средств. Дериватизация молекулы АСК и добавление в её структуру аминокислоты таурин, в совокупности с получением солевых форм даёт возможность усилить антиагрегантное действие или уменьшить тяжесть побочных эффектов, сообщить дополнительное фармакологическое дей-

ствие, повысить эффективность синтеза и/или облегчить производство [14–16]. На протяжении всей истории применения ацетилсалициловой кислоты и особенно интенсивно в последние два десятилетия, химики пытаются модифицировать её молекулу, чтобы сообщить ей новые, в основном, фармакодинамические эффекты, такие как вазодилатирующий или способность генерировать активные формы кислорода (АФК) в опухолевых клетках, проявлять антибактериальную и антипролиферативную и/или противоопухолевую активности. Так ангидридные конъюгаты аспирина с жирными кислотами легче проходят через клеточные мембраны, и вызывают более выраженную дозозависимую агрегацию тромбоцитов. Аспирин-липидные конъюгаты действуют посредством ингибирования пути циклооксигеназы (ЦОГ) – тромбоксан-синтазы (TXAS). Все конъюгаты гидролизуются до исходных молекул аспирина и жирной кислоты контролируемым образом. Ангидриды аспирина-жирных кислот обладают большей биодоступностью (свободная карбоксильная группа в аспирине остается ионизированной разновидностью при физиологическом pH и плохо абсорбируется через клеточные мембраны) и антиагрегантной активностью (одним из оснований для создания гибридного «codrug» является то, что пролекарство аспирина-жирная кислота-ангидрид гидролизуются с выделением не одного, а двух активных молекул, которые независимо друг от друга ингибируют ЦОГ), меньшей ulcerогенностью [17].

Ацетилсалициловая кислота и аналоги короткоцепочечных жирных кислот, таких как бутирил-салициловая кислота, проявляют выраженное антимикробное действие в отношении *Salmonella Typhimurium*. [18].

Число работ обнаруживающих противоопухолевую активность нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) и, в частности АСК, в последние несколько лет продолжает увеличиваться [19, 20]. Так производные аспирина на основе циннамальдегида изучаются в качестве потенциального средства для лечения колоректального рака [21–23].

Включение иона металла в молекулу ацетилсалициловой кислоты может сообщить ей дополнительные фармакодинамические свойства, что позволяет сохранять способность к ингибированию ЦОГ. Однако появляется способность к генерации АФК металлической частью конъюгата, что может помочь преодолеть устойчивость опухолевых клеток или микроорганизмов. Развитие металлоорганических производных АСК является одним из направлений биоорганической химии и превратилось в мощную альтернативу традиционным подходам в разработке биоактивных соединений [24]. К примеру, новые производные аспирина, включающие в свою молекулу оксид азота (NO-аспирины) более безопасны в отношении слизистой оболочки желудочно-кишеч-

ного тракта (ЖКТ), и оказывают выраженные цитотоксические эффекты в отношении рака легкого [25]. IPA / NO-аспирин являются пролекарствами, которые более безопасны и оказывают более выраженные фармакодинамические эффекты вероятно, из-за улучшенного клеточного поглощения и доставки. Содержащие оксид азота соединения аспирина были не токсичными для нормальных эндотелиальных клеток (HUVECs; не влияет на жизнеспособность до 100 мкМ), но оказывали токсическое действие на некоторые клеточные линии рака, что указывает на специфическую для рака чувствительность, которая является перспективной для химиотерапии или химиопрофилактики. Избирательная цитотоксичность пролекарств на основе NO-аспирина может быть связана с их влиянием на активность гликолитического белка GAPDH (тиоловая группа GAPDH подавляется донорами HNO, которые образуются при гидролизе IPA / NO-аспирина в организме) от активности которого зависит скорость гликолиза в опухолевых клетках. Применение содержащих оксид азота соединений аспирина (IPA / NO-аспирин) приводило к усилению функцию мышечных кардиомиоцитов *in vivo*. Это подтверждает, что доноры HNO являются положительными инотропными / лизитропными агентами и увеличивают переходные процессы в Ca²⁺ каналах кардиомиоцитов. Таким образом, пролонгированные формы препаратов, содержащих аспирин и HNO или NO, могут иметь широкое терапевтическое применение в качестве противовоспалительных, противоопухолевых и кардиопротективных агентов [26].

Таурин – органический осмолит, участвующий в регуляции метаболизма клеток, обеспечивает субстрат для образования солей желчных кислот. Играет важную роль в модуляции концентрации внутриклеточного свободного кальция, и, хотя при этом является одной из аминокислот, не включенных в белки, таурин один из наиболее распространенных аминокислот в мозге, сетчатке, мышечной ткани и органах [27]. Производное таурина стимулирует образование менее токсичных фибрилл амилоид-β, что приводит к предотвращению когнитивного дефицита при острой экспериментальной модели болезни Альцгеймера у мышей [28]. Таурин улучшает секрецию инсулина и снижает резистентность к инсулину. Лечение таурином снижало выраженность окислительного стресса в головном мозге, диабетической гепатотоксичности, тяжесть сосудистых заболеваний и травм сердца при диабете [29, 30]. В литературе описано влияние добавок таурина на резистентность к инсулину; баланс железа, цинка и меди; параметры окислительного стресса у контрольных животных и крыс с высокожировой диетой [31].

Таким образом синтез и доклиническое изучение новых производных гидроксибензойных кислот является перспективной и актуальной задачей для современной фармакологии.

ЦЕЛЬ. Синтезировать новые соединения, определить их физические характеристики и оценить антиагрегантную и антитромботическую активности *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и определение физических характеристик

Общая методика синтеза дикалиевых солей N-(гидроксибензоил)тауринов была подробно описана авторами ранее [32, 33]. В реактор, снабженный мешалкой, помещали раствор 2-аминоэтансульфоновой кислоты (таурина) в 25.00 мл воды и приливали 6 н. раствор гидроксида натрия. По каплям, в раствор вносили хлорангидрид гидроксибензойной кислоты в течение 1,5 ч при охлаждении. Затем реакционную смесь перемешивали еще 1,5 ч (при охлаждении), контролируя pH среды (pH>7). Полученную смесь выливали в лед и подкисляли хлороводородной кислотой до pH=5, выпавшие кристаллы перекристаллизовывали из изопропанола, отфильтровывали и сушили. Характеристики представленных соединений в таблице 1. Затем в 3-горлый реактор, снабженный мешалкой, обратным холодильником и термометром, загружали 100 ммоль этилата калия, 100,00 мл бензола и 50 ммоль N-(гидроксибензоил)таурина и перемешивали при температуре 100°C в течение 30 мин. После охлаждения продукт отделяли фильтрованием, промывали небольшим количеством спиртового раствора щелочи и сушили.

Температуры плавления определяли капиллярным методом на приборе Stuart SMP-30 (Великобритания) при скорости нагрева 10°C/мин. Чистоту и индивидуальность соединений подтверждали методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Silufol UV-254», подвижная фаза н-бутанол – этанол – вода в соотношении 5:2:1, проявление – в парах йода и УФ-светом. Спектры ¹H- ЯМР производных в DMSO-d₆ регистрировали на спектрометре Bruker DRX500 (Bruker, Германия), внутренний стандарт гексаметилдисулоксан 500 МГц. Для интерпретации спектров использовали лицензионный программный продукт фирмы «Advanced Chemistry Development Inc.» под коммерческим названием ACD/HNMR Predictor Pro v. 3.

Исследуемые N-производные таурина синтезированы реакцией ацилирования таурина эквивалентным количеством хлорангидрида 2-, 3- или 4-гидроксибензойной кислоты. Затем гидроксибензоилтаурины переводились в водорастворимую форму путем получения дикалиевых солей (рис. 1).

Исследования *in vitro*

Изучение влияния веществ на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* проводилось

по методике Vorn G. в модификации Габбасова В.А. (1989) [34] на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «Биола» 220LA (Россия). Исследования проводились на богатой тромбоцитами плазме крыс по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971) [35]. Кровь получали от наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, в/б Органика, Россия) животных из брюшной аорты [36], стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия (Реахим, Россия) в соотношении 9:1, затем центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин на центрифуге СМ-6м (ELMI, Латвия). Калибровку прибора проводили по дистиллированной воде, согласно инструкции, светопропускание дистиллированной воды принимали за 100%.

Для получения контрольной пробы в стеклянную кювету агрегометра вносили 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы, после включения записи агрегатограммы, на 10 секунде регистрации процесса, в кювету добавляется АДФ («Sigma Aldrich», США), в конечной концентрации 5 мкМ [37].

Для изучения антиагрегантной активности исследуемых соединений в кювету с 270 мкл богатой тромбоцитами плазмы добавляется 30 мкл раствора тестируемого образца в определенной концентрации. Проба инкубировалась в термостатируемых ячейках агрегометра (37°C в течение 3 минут), после чего пробу переносили в регистрирующую ячейку и производили запись агрегатограммы продолжительностью 5 минут.

Производные гидроксibenзойных кислот и ацетилсалициловую кислоту (референтный препарат) изучали в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-8} М.

Исследования *in vivo*

Соединения вводили однократно внутривенно через гастральный зонд. Через 60 минут после введения животных наркотизировали (хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг, внутривенно), выделяли левую общую сонную артерию и воспроизводили модель внутрисосудистого тромбоза [38]. Под сонную артерию подкладывали пленку Parafilm. Скорость кровотока по сонной артерии регистрировали методом ультразвуковой доплерографии до его полного прекращения в результате тромбоза, который инициировали наложением на сосуд ватного тампона, смоченного 50% раствором хлорида железа (III).

Для определения времени кровотечения животному отсекали 5 мм с кончика хвоста, который затем помещали в колбу с физиологическим раствором ($t=37^\circ\text{C}$) и регистрировали время до момента прекращения истечения крови [37, 39].

Дизайн исследования

Фармакологическое исследование соединений на моделях *in vitro* и *in vivo* были проведены согласно дизайну исследования (рис. 2).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ «Microsoft Excel» и программы «Prism 6.0» (Graph Pad Software Inc., США). Данные представляли в виде среднего арифметического значения и его средней ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариантов в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи *t*-критерия Стьюдента. При распределении вариантов в выборке, отличном от нормального, применяли *U*-критерий Манна-Уитни (при сравнении двух групп) и критерий Краскела-Уоллиса (при сравнении более двух групп). Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p<0,05$).

Соблюдение этических стандартов

Эксперименты выполнялись согласно методическим руководствам и нормативным документам ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 33044-2014, 2015) и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.), с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

О соблюдении этических норм получено заключение эксперта из Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900(OHRP)).

Эвтаназию животных проводили с соблюдением требований, изложенных в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). В течение 24 часов до начала экспериментов все животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление к плазме крови лабораторных животных соединения С-60 (дикалиевая соль N-(3-гидроксibenзоил)таурина) в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} М достоверно уменьшает степень агрегации тромбоцитов на 38% и 37% в сравнении с контрольной группой животных и на 19% и 26% по сравнению с референтным препаратом. Внесение в богатую тромбоцитами плазму крови лабораторных животных соединения С-61 (дикалиевая соль N-(4-гидроксibenзоил)таурина) во всех изученных

концентрациях снижает степень агрегации тромбоцитов. В концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} М степень агрегации снижалась на 46% и 44% в сравнение с контрольной группой. При добавлении к богатой тромбоцитами плазме исследуемого соединения в концентрациях 10^{-6} и 10^{-7} М степень агрегации снижалась примерно в 10 раз. В концентрации 10^{-8} М статистически достоверного снижения агрегации не наблюдалось.

Более выраженное антиагрегантное действие исследуемых соединений по сравнению с АСК может быть связано с образованием ковалентной связи таурина с тиольными и тиоэфирными группами атомов или дисульфидными мостиками в молекулярных мишенях, что было показано для хлораминовых и хлориминовых производных таурина [40]. Соединение под лабораторным шифром С-59 (дикалиевая соль N-(2-гидроксibenzoил)таурина) проявило антиагрегантную активность на уровне референтного препарата.

Добавление соединений С-60 и С-61 в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} М к плазме крови здоровых лабораторных животных в максимальной степени и более выражено чем референтный препарат АСК, ограничивало развитие агрегации тромбоцитов. Добавление АСК оказывало антиагрегантное действие только в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М, что подтверждают результаты многочисленных исследований данного препарата.

Соединения С-59, С-60 и С-61 являются, как и АСК производными гидроксibenзойных кислот, поэтому есть основания предполагать, что основной механизм антиагрегантного действия реализуется за счет необратимой инактивации циклооксигеназы-1 после ацетилирования остатка серина в районе активного центра. В результате блокируется синтез тромбоксана A_2 , и тем самым предотвращается вторичная активация тромбоцитов [40].

Исследуемые соединения являются солевой формой производных гидроксibenзойных кислот и содержат в своем составе калий, который не только улучшает их растворимость в воде, но и проявляет собственные антиагрегантные свойства, что согласуется с данными литературы [41].

При анализе полученных данных (рис. 3) из проведенных экспериментов, можно сделать вывод, что наиболее выраженное антиагрегантное действие в исследованиях *in vitro* проявляет соединение С-61, значительно превосходя аналогичное действие ацетилсалициловой кислоты.

Одним из важных факторов, определяющих исход заболеваний сердечно-сосудистой системы, является проблема артериальных тромбозов [42], которая неразрывно связана с состоянием системы гемостаза. Тромбозы часто выступают причиной внезапной смерти, инфаркта миокарда, сосудистых осложнений сахарного диабета, ампутации конеч-

ностей. Поэтому поиск и исследования атромбогенного действия потенциальных антитромботических средств актуальны. Доклинические исследования антитромботического действия новых потенциальных молекул должно оцениваться не только на здоровых и молодых животных, но и на тех, которым моделировалось состояние максимально близкое к клиническим условиям назначения антиагрегантов. J.P. Garner в своей работе сделал вывод: о том, что, если мы хотим, чтобы животные модели, отвечали патофизиологии болезней человека и были бы одинаково с ними восприимчивы к действию тестируемых лекарств, тогда мы должны начать выполнять эксперименты на животных, как если бы они проводились на людях [43]. В нашей работе, исследования антитромботического действия новых производных гидроксibenзойных кислот, проводились на молодых и здоровых животных, не молодых и здоровых, не молодых и с сахарным диабетом, что соответствует частой клинической ситуации в которой проводится терапия подобными препаратами.

Исследование антитромботической активности новых производных гидроксibenзойных кислот производилось на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствором хлоридом железа (III) на сонную артерию здоровых животных, трехлетних (старых) крыс и животных с экспериментальной патологией (сахарный диабет, исследование времени кровотечения из хвостовой вены).

Исследование антитромботической активности новых производных гидроксibenзойных кислот на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III), здоровых животных.

В контрольной группе животных, которым вводился растворитель (физиологический раствор), среднее время полной окклюзии сонной артерии составило $14,8 \pm 0,77$ минут.

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 36 мг/кг увеличивал время окклюзии на 69% ($p < 0,05$).

Исследуемые соединения с тауриновым остатком под лабораторным шифром С-59 в эквивалентной концентрации с референтным препаратом пролонгировало время образования тромба на 61% в сравнение с контрольной группой. На данной экспериментальной модели тромбоза, соединение С-60 продемонстрировало антитромбогенную активность и по времени полной окклюзии превысило референтный препарат на 3%, а в соотношении с контрольной группой на 73% ($p < 0,05$). Исследуемое соединение С-61 увеличивало время окклюзии сосуда в 2 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), данные с препаратом сравнения АСК различий не наблюдалось. Результаты представлены (рис. 4).

Таблица 1 – Характеристики полученных N-(гидроксibenзоил)-замещенных тауринов

Соединение	X	Выход, %	Т. пл., °C	Rf*	Спектры ¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆), δ, м.д.
N-(2-гидроксibenзоил)таурин	2-OH	63,5	158–160	0,664	6.88–7.78 (4H, м, C ₆ H ₄), 8.0–8.05 (1H, м, NH), 10.70 (1H, с, OH и SO ₂ OH), 2.78–3.60 (4 H, м, C ₂ H ₄)
N-(3-гидроксibenзоил)таурин	3-OH	63,8	199–201	0,636	6.95–7.33 (4H, м, C ₆ H ₄), 7.50–7.83 (1H, м, NH), 9.81 (1H, с, OH и SO ₂ OH), 2.67–3.02 (4 H, м, C ₂ H ₄)
N-(4-гидроксibenзоил)таурин	4-OH	64,2	204–206	0,753	6.76–7.75 (4H, м, C ₆ H ₄), 7.96–8.23 (1H, м, NH), 10.19 (1H, с, OH и SO ₂ OH), 2.23–3.34 (4 H, м, C ₂ H ₄)

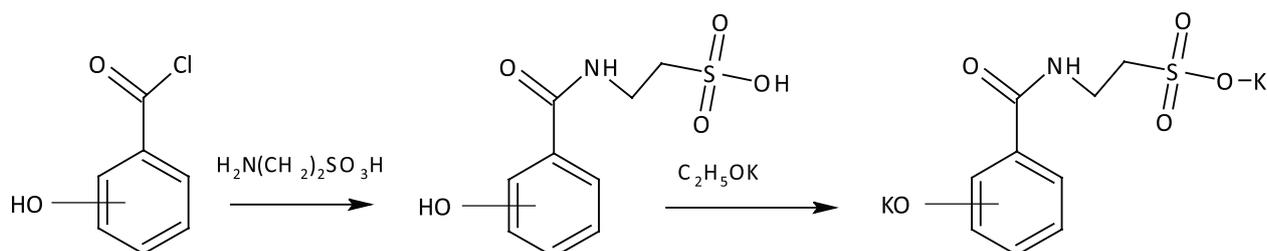


Рисунок 1 – Реакция ацилирования таурина

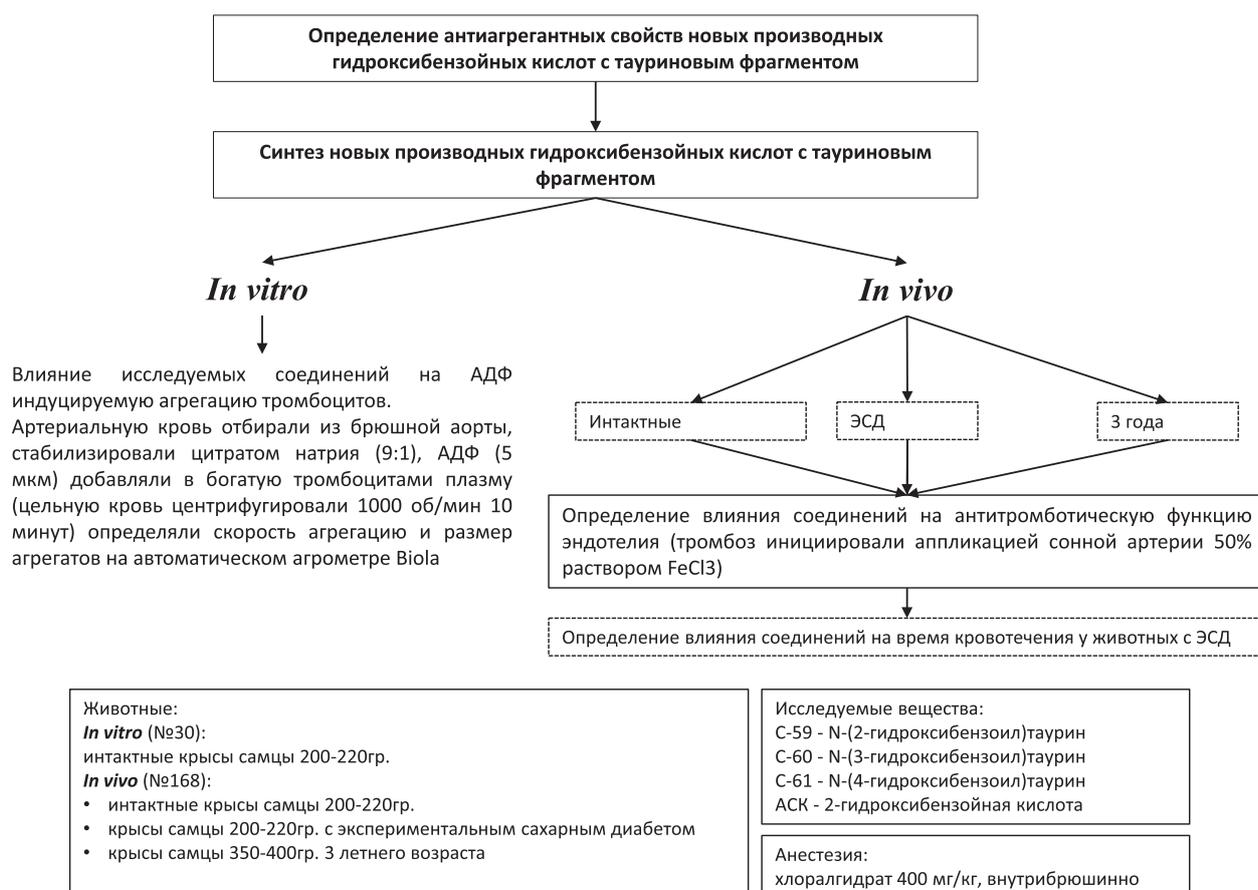


Рисунок 2 – Дизайн исследования

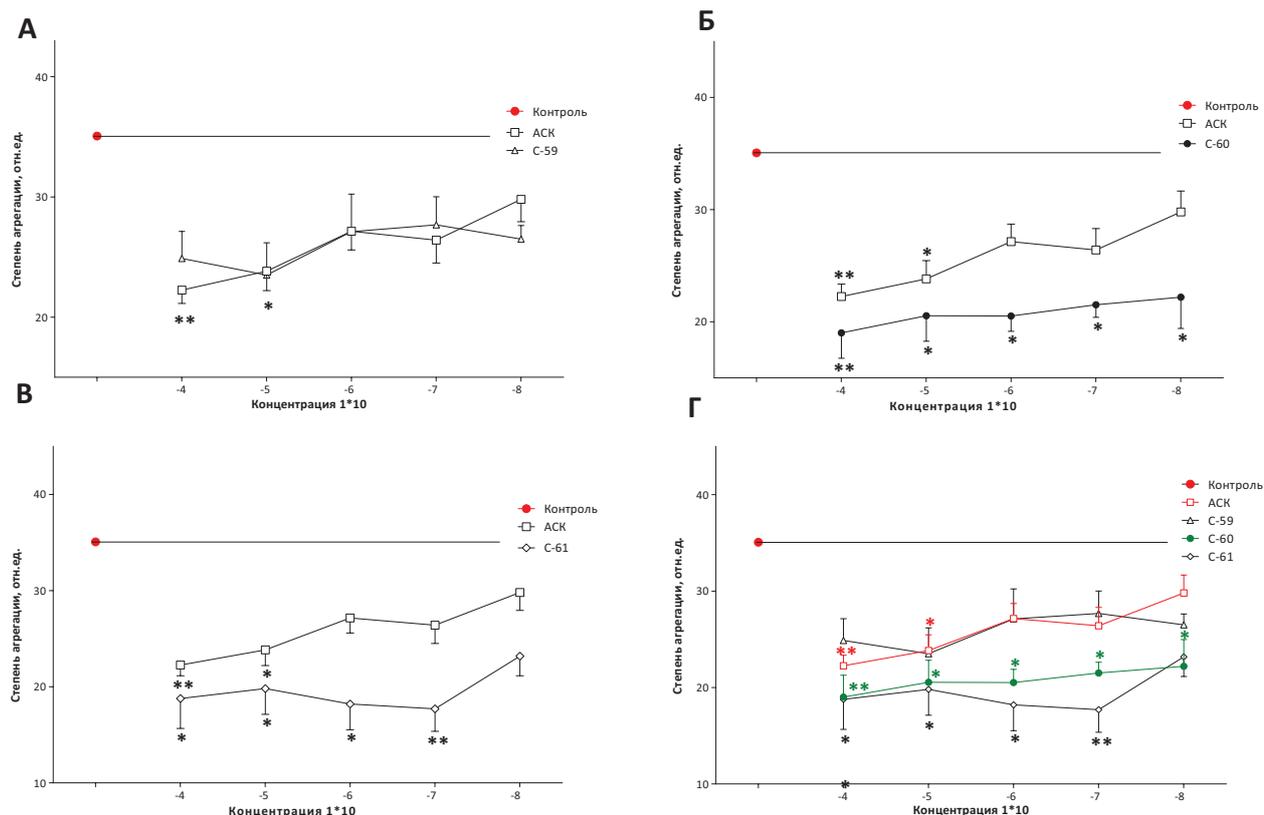


Рисунок 3 – Антиагрегантная активность соединений на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*

Примечание: А – антиагрегантная активность соединения С-59; Б – антиагрегантная активность соединения С-60; В – антиагрегантная активность соединения С-61; Г – объединенная схема исследуемых соединений, референтного препарата и контроля; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ изменения статистически значимы по отношению к контролю критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони

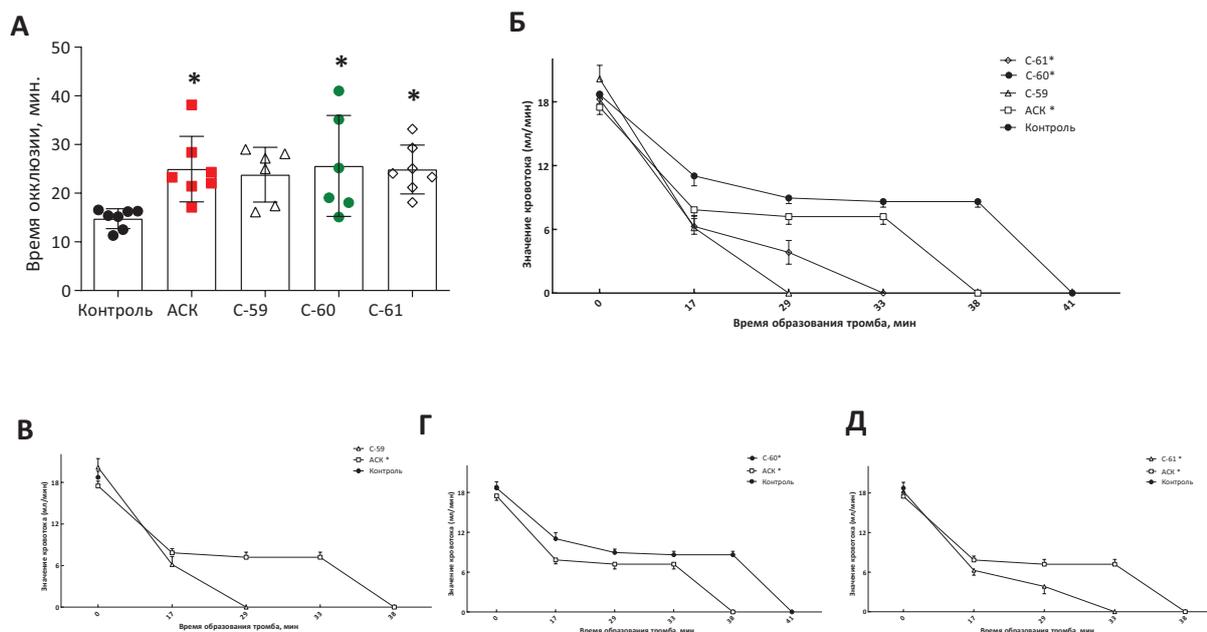


Рисунок 4 – Время образования тромба, после аппликации 50% раствором хлоридом железа на сонную артерию здоровых животных

Примечание: А – объединенная схема динамики тромбообразования исследуемых соединений, референтного препарата и контроля; Б – время полной окклюзии сосудов исследуемых соединений, препарата сравнения и контроля; В – динамика тромбообразования соединения С-59; Г – динамика тромбообразования соединения С-60; Д – динамика тромбообразования соединения С-61; * – $p < 0,05$ изменения статистически значимы по отношению к контролю критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони

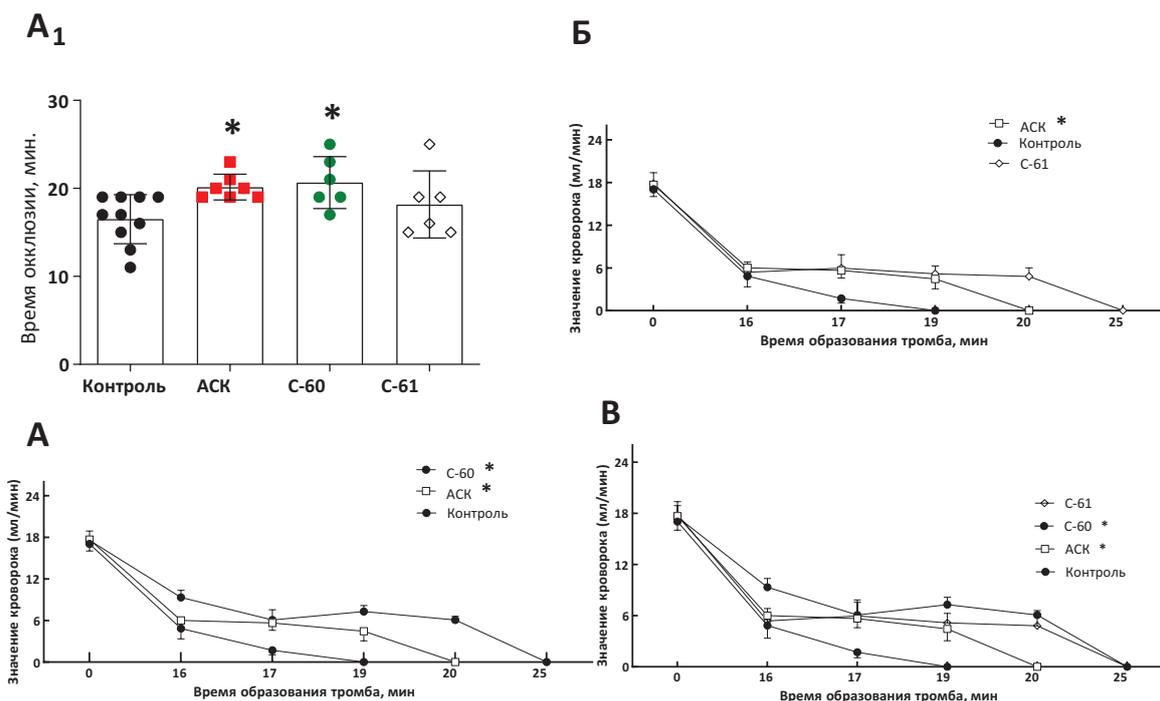


Рисунок 5 – Время образования тромба, после аппликации 50% хлоридом железа на сонную артерию у 3 годовалых (старых) животных

Примечание: А – динамика тромбообразования соединения С-60; А₁ – время полной окклюзии сосудов исследуемых соединений, препарата сравнения и контроля; Б – динамика тромбообразования соединения С-61; В – объединенная схема динамики тромбообразования исследуемых соединений, референтного препарата и контроля; * – $p < 0,05$ изменения статистически значимы по отношению к контролю критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони

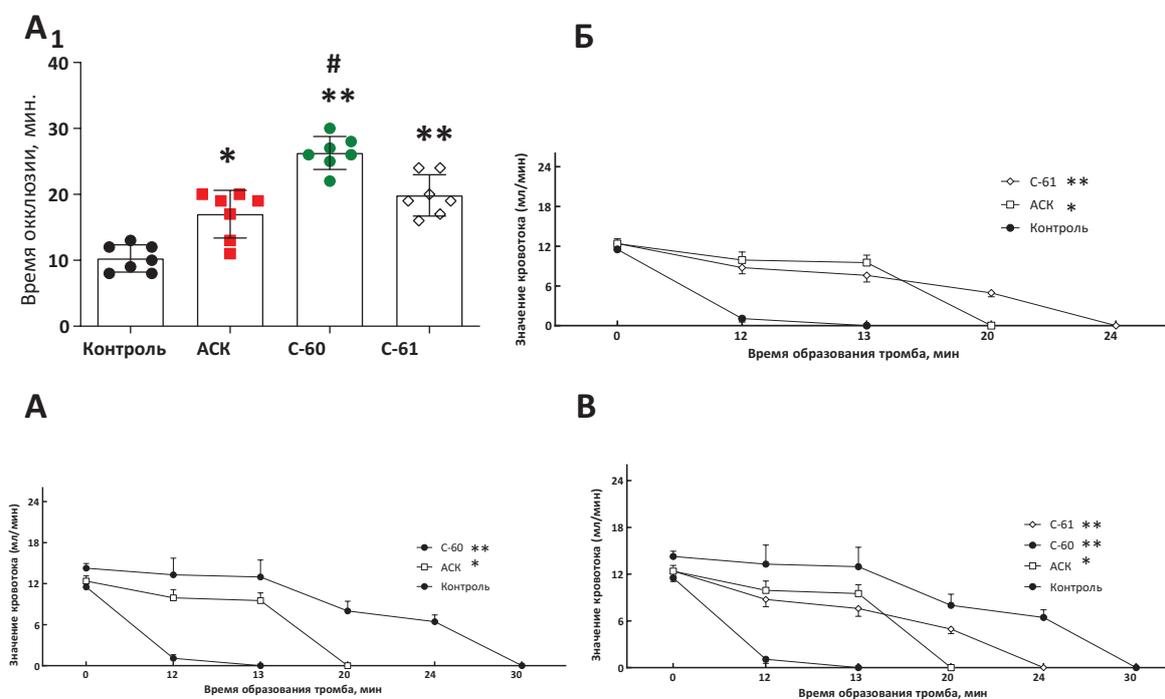


Рисунок 6 – Время образования тромба, после аппликации 50% хлоридом железа на сонную артерию животных с СД

Примечание: А – динамика тромбообразования соединения С-60; А₁ – время полной окклюзии сосудов исследуемых соединений, препарата сравнения и контроля; Б – динамика тромбообразования соединения С-61; В – объединенная схема динамики тромбообразования исследуемых соединений, референтного препарата и контроля; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ изменения статистически значимы по отношению к контролю критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, # – $p < 0,05$ изменения статистически значимы по отношению к эффекту референтного препарата критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони

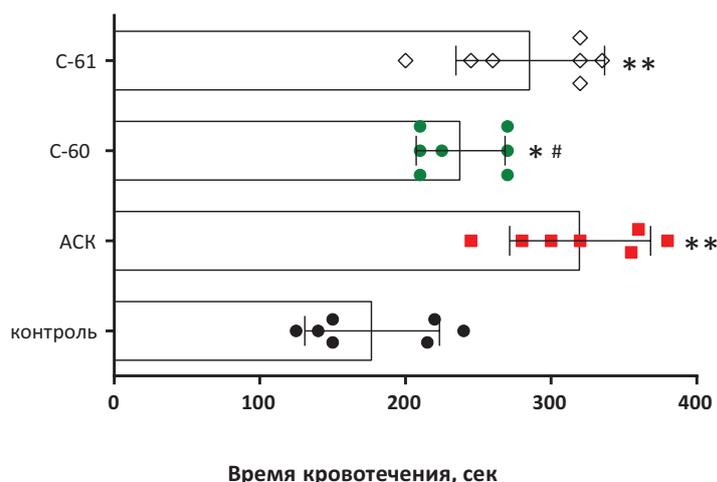


Рисунок 7 – Исследование времени кровотоечения у животных с СД

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ изменения статистически значимы по отношению к контролю критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, # – $p < 0,05$ изменения статистически значимы по отношению к эффекту референтного препарата критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони

Исследование антитромботической активности новых производных гидроксibenзойных кислот на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствором хлоридом железа, у 3-годовалых (старых) животных

У 3-годовалых (старых) животных проведена оценка антитромботического действия исследуемых соединений при однократном внутривенном введении крысам веществ, представленных на рисунке 5.

Среднее время полной окклюзии сонной артерии у животных контрольной группы составило $16,50 \pm 0,89$ минут. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в эффективной терапевтической дозе увеличивало время окклюзии до $20,14 \pm 0,55$ минут, что на 22%, данные статистически достоверны, больше контрольной группы животных.

Соединение С-60 в дозе 18 мг/кг пролонгировало время образования тромба до $20,67 \pm 1,20$ минут ($p < 0,05$), что на 25% медленнее по отношению к группе, получавшей физиологический раствор, и на 3% медленнее, чем у группы животных, которым вводили референтный препарат. При введении соединения С-61 в дозе 23 мг/кг, время полной окклюзии составило $18,17 \pm 1,56$ минут, что было на 10% медленнее относительно группы контроля и на 10% меньше группы, получавшей препарат сравнения.

Таким образом, на модели артериального тромбоза сонной артерии 3-годовалых (старых) крыс, соединение С-60 продемонстрировало антитромботическую активность, полная окклюзия сонной артерии проходила медленнее чем под действием ацетилсалициловой кислоты.

Исследование атромбоцитарной активности соединений-лидеров на модели артериального тромбоза у животных с экспериментальным сахарным диабетом

Антитромбогенное действие наиболее активных

соединений (С-60, С-61) было исследовано на животных со стрептозотоцин-никотинамид индуцированным сахарным диабетом.

В результате эксперимента было выявлено, что в контрольной группе животных образование тромба происходило на $10,3 \pm 0,78$ минуте (рис. 6).

Ацетилсалициловая кислота в эффективной терапевтической дозе увеличивала время полной окклюзии до $17,0 \pm 1,36$ минут, что превышало показатели группы контроля на 65%.

Соединение С-60 в дозе 18 мг/кг достоверно пролонгировало время образования тромба до $26,3 \pm 0,94$ мин, что на 156% медленнее относительно значений контроля и на 55% медленнее относительно группы животных, получавших препарат сравнения ($p < 0,01$).

В группе крыс, которым предварительно перорально вводили соединение С-61 в дозе 23 мг/кг, время полной окклюзии сонной артерии составило $19,9 \pm 1,18$ минут, что на 93% медленнее по отношению к контрольной группе ($p < 0,01$) и на 17% медленнее, чем у группы животных, получавших референтный препарат.

Таким образом, исследуемые соединения при однократном пероральном введении животным с экспериментальным сахарным диабетом в дозах, взятых в эквимолярных концентрациях, обладают выраженной антитромботической активностью и превосходят препарат сравнения – ацетилсалициловую кислоту.

Исследования влияния соединений-лидеров и ацетилсалициловой кислоты на время кровотоечения из хвостовой вены животного с сахарным диабетом.

В контрольной группе животных время кровотоечения составило $177,1 \pm 17,45$ секунд. Исследуемые производные в дозах, взятых в эквимолярных

концентрациях, пролонгировали время кровотечения. Референтный препарат увеличивал время кровотечения на 81%, что составило 320,0±18,29 секунд.

В группе животных, получавших соединение под лабораторным шифром С-60, время кровотечения пролонгировалось до 237,9±11,54 секунд, что на 34% медленнее относительно показателей группы контроля и на 26% быстрее, чем у группы животных, получавших препарат сравнения.

Соединение С-61 увеличивало время кровотечения до 285,7±19,29 секунд; что было на 61% медленнее, чем у животных, получавших физиологический раствор и на 11% быстрее относительно группы жи-

вотных, которым вводили ацетилсалициловую кислоту. Результаты представлены на рисунке 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённого исследования (*in vitro*) было установлено, что соединение под лабораторным шифром С-60 проявляет выраженную антиагрегантную активность, в исследованиях *in vivo* пролонгирует образование тромба. Соединение С-60 оказывает более выраженное чем референтный препарат антиагрегантное и антитромботическое действие. Безопасность новых производных гидроксисбензойных аминокислот, по влиянию на скорость кровотечения, сопоставима с показателем АСК.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.К. Брель, Ю.Н. Будаева, С.В. Лисина – методология синтеза соединений, интерпретация результатов, написание текста; Н.В. Атапина, С.С. Царук – методология исследований, статистическая обработка результатов интерпретация результатов, написание текста; Д.В. Куркин – работа над концепцией и дизайном исследований, методология исследований, интерпретация и визуализация результатов, написание текста; И.Н. Тюренков – работа над концепцией и дизайном исследований, интерпретация и визуализация результатов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Петров В.И., Шаталова О.В., Маслаков А.С., Горбатенко В.С. Анализ фармакотерапии тромбоза глубоких вен нижних конечностей (фармакоэпидемиологическое исследование) // Флебология. – 2014. – Т. 8, №3 – С. 32–37.
- Шляхто Е.В., Конради А.О. Основные направления и перспективы трансляционных исследований в кардиологии // Вестник Росздравнадзора. – 2015. – №5 – С. 33–37.
- Чазов Е.И. К вопросу об атеротромботической болезни // Кардиология. – 2001. – Т. 41, №4 – С. 4–7.
- Брель А.К., Тюренков И.Н., Лисина С.В., Попов С.С., Верхоляк Д.В., Будаева Ю.Н., Волотова Е.В., Атапина Н.В., Куркин Д.В. Ацетоксисбензоилглицилглицины как потенциальные церебропротекторные препараты // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, №1 – С. 15–18.
- Townsend N., Wilson L., Bhatnagar P., Wickramasinghe K., Rayner M., Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016 // European Heart Journal. – 2016. – Vol. 37, No.42 – P. 3232–3245.
- European Society of Cardiology [Электронный доступ] // European Society of Cardiology (ESC) CVD Prevention in Clinical Practice (European Guidelines on) Guidelines [published in 2016] Available from: <https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines/CVD-Prevention-in-clinical-practice-Europe-Guidelines-on>
- Чарная М.А., Морозов Ю.А. Тромбозы в клинической практике. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – С. 224.
- Aaron M.W., Gary E.R. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects // Circulation Research. – 2016. – Vol. 118, No.9 – P.1340–1347. DOI: 10.1161/CIRCRESA-NA.115.306841.
- Timmis A., Gale C.P, Flather M., Maniadakis N., Notes P.V.A. Cardiovascular disease statistics from the European atlas: inequalities between high- and middle-income member countries of the ESC // European Heart Journal – Quality of Care and Clinical Outcomes. – 2018. – Vol. 4, No. 1 – P. 1–3. DOI:10.1093/ehjqcco/qcx045.
- Timmis A., Townsend N., Gale C., Grobbee R., Maniadakis N., Flather M., Wilkins E., Wright L., Vos R., Bax J., Blum M., Pinto F., Vardas P., ESC Scientific Document Group. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017 // European Heart Journal. – 2018. – Vol. 39, No.7 – P. 508–579. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx628.
- Hussain M.A., Al-Omran M., Creager M.A., Anand S.S., Verma S., Bhatt D.L. Antithrombotic Therapy for Peripheral Artery Disease: Recent Advances // Journal of the American College of Cardiology. – 2018. – Vol.71, No.21 – P.2450–2467. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.03.483.
- Kong D., Xue T., Guo B., Cheng J., Liu S., Wei J., Lu Z., Liu H., Gong G., Lan T., Hu W., Yang Y. Optimization of P2Y12 Antagonist Ethyl 6–(4–((Benzylsulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-5-cyano-2-methylnicotinate (AZD1283) Led to the Discovery of an Oral Antiplatelet Agent with Improved Druglike Properties // Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 62, No.6 – P. 3088–3106. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01971.
- Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2020 // Diabetes Care. – 2020. – Vol.43, No.1 – P.1–2. DOI: 10.2337/dc20-Sint

14. Арсланбекова В.А., Верхоляк Д.В., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Атапина Н.В., Брель А.К., Лисина С.В. Церебропротекторная активность производного гидроксibenзойной кислоты – соединения С–38 на модели окклюзии общих сонных артерий у крыс // Вестник ВолГМУ. – 2017. – Т. 4, №64 – С. 54–57.
15. Brel A.K., Zhoglo E.N. Synthesis of hydroxybenzoic acids derivatives containing a fragment of p-aminobenzoic acid // International journal of applied and fundamental research. – 2016. – 8 – P. 370–373.
16. Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., Попов С.С. Поиск новых биологически активных производных гидроксibenзойных кислот и перспективы их применения // Сборник материалов IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» 09–10 ноября 2016 г. Санкт-Петербург: ФГБОУ ВО СПбХУ Минздрава России. – 2016. – С. 263–266.
17. Roy J., Adili R., Kulmacz R., Holinstat M., Das A. Development of Poly Unsaturated Fatty Acid Derivatives of Aspirin for Inhibition of Platelet Function // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic. – 2016. – Vol. 359, No.1 – P. 134–141. DOI: 10.1124/jpet.116.234781.
18. Yang X., Forster E.R., Darabedian N., Kim A.T., Pratt M.R., Shen A., Hang H. C. Translation of microbiota short-chain fatty acid mechanisms affords anti-infective acyl-salicylic acid derivatives. // ACS Chemical Biology. – 2020. – Vol. 15, No.5 – P. 1141–1147. DOI: 10.1021/acscchembio.9b01009.
19. Christina N.B., Sotiris K.H. Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Metal Complexes and Their Effect at the Cellular Level // European Journal of Inorganic Chemistry. – 2016. Vol. 2016, No.19 – P. 3048–3071. DOI: 10.1002/ejic.201501480.
20. Rohwer N., Kühl A.A., Ostermann A.I., Hartung N. M., Schebb N. H., Dieter Z., McDonald F.M., Weylandt K.-H. Effects of chronic low-dose aspirin treatment on tumor prevention in three mouse models of intestinal tumorigenesis // Cancer Medicine. – 2020. – Vol. 9, No.7 – P. 2535–2550. DOI: 10.1002/cam4.2881.
21. Lu S., Obianom O.N., Ai Y. Novel cinnamaldehyde-based aspirin derivatives for the treatment of colorectal cancer // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2018. – Vol. 28, No. 17 – P. 2869–2874. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.07.032.
22. Debashree B., Robert C.C., Gaurav B., Ridnour L. A., Wink D. A., Miranda K. M. Chemotherapeutic Potential of Diazeniumdiolate-based Aspirin Prodrugs in Breast Cancer // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 83 – P. 101–114. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.029.
23. Wu X.W., Zheng Y., Wang F.X., Cao J.-J., Zhang H., Zhang D.-Y., Tan C.-P., Ji L.-N., Mao Z.-W. Aspirin Conjugates for Enhanced Metabolic Immuno-Modulation and Mitochondrial Lifetime Imaging // Chemistry A European Journal. – 2019. – Vol. 25, No.28 – P. 7012–7022. DOI: 10.1002/chem.201900851.
24. Kowalski K., Corrigendum: Insight into the Biological Activity of Organometallic Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Derivatives // ChemPlusChem A Multidisciplinary Journal Centering on Chemistry. – 2019. – Vol. 84, No.7 – P. 821. DOI: 10.1002/cplu.201900331.
25. Martin-Martin A., Rivera-Dictrer A., Muñoz-Urbe M., López-Contreras F., Pérez-Laines J., Molina-Berrios A., López-Muñoz R. Reconsidering the Role of Cyclooxygenase Inhibition in the Chemotherapeutic Value of NO-Releasing Aspirins for Lung Cancer // Molecules. – 2019. – Vol. 24, No.10 – P. 1924. DOI: 10.3390/molecules24101924.
26. Basudhar D., Bharadwaj G., Cheng R.Y., Jain S., Shi S., Heinecke J. L., Holland R. J., Ridnour L. A., Caceres V. M., Spadari-Bratfisch R.C., Paolucci N., Velázquez-Martínez C. A., Wink D. A., Miranda K M. Synthesis and chemical and biological comparison of nitroxyl- and nitric oxide-releasing diazeniumdiolate-based aspirin derivatives // Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – Vol. 56, No. 20 – P. 7804–7820. DOI: 10.1021/jm400196q
27. Bkaily G., Jazzar A., Normand A., Simon Y., Al-Khoury J., Jacques D. Taurine and cardiac disease: state of the art and perspectives // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2020. – Vol. 98, No.2 – P. 67–73. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0313.
28. Kim H.Y., Yang S.H., Yoon J., Jang H., Baek S., Shin J., Kim S. H. Taurine-Carbohydrate Derivative Stimulates Fibrillogenesis of Amyloid-β and Reduce Alzheimer-Like Behaviors // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2017. – Vol. 975, No.1 – P. 225–232. DOI: 10.1007/978-94-024-1079-2_20.
29. Inam-U-L., Piao F., Aadil R.M., Suleman R., Li K., Zhang M., Wu P., Shahbaz M., Ahmed Z. Ameliorative effects of taurine against diabetes: a review // Amino Acids. – 2018. – Vol. 50, No.5 – P. 487–502. DOI: 10.1007/s00726-018-2544-4.
30. Sarkar P., Basak P., Ghosh S., Kundu M., Sil P.C. Prophylactic role of taurine and its derivatives against diabetes mellitus and its related complications // Food and Chemical Toxicology. – 2017. – Vol. 110 – P. 109–121. DOI: 10.1016/j.fct.2017.10.022.
31. Król E., Okulicz M., Kupsz J. The Influence of Taurine Supplementation on Serum and Tissue Fe, Zn and Cu Levels in Normal and Diet-Induced Insulin-Resistant Rats // Biological Trace Element Research. – 2020. – Vol. 198, No.2 – P. 592–601. DOI: 10.1007/s12011-020-02100-3.
32. Брель А.К., Тюренков И.Н., Лисина С.В., Куркин Д.В., Атапина Н.В., Будаева Ю.Н., Волотова Е.В. дикалиевая соль N-(3-гидроксibenзоил)таурина, обладающая антиагрегантной и антитромботической активностью в сочетании с церебропротективным действием // Патент на изобретение RU 2 730 835 C1 Заявка № 2019134137, от 23.10.2019.
33. Лисина С.В., Брель А.К., Волотова Е.В., Атапина Н.В., Тюренков И.Н., Будаева Ю.Н., Куркин Д.В. Дикалиевая соль N-(4-гидроксibenзоил)таурина, обладающая антиагрегантной и антитромботической активностью // Патент на изобретение RU 2731106 C1, 28.08.2020. Заявка № 2019134135 от 23.10.2019
34. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилова И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // Лабораторное дело. – 1989. – Т. 10 – С.15–18.
35. Люсов В.А., Белоусов Ю.Б. Метод графической регистрации агрегации тромбоцитов и изменения ее при ишемической болезни сердца // Кардиология. – 1971. – №8 – С. 459–461.
36. Hyuk W.K., Jung H.S., Deok H.L., Ok W. J., Nam G. S., Kim M.J., Kwon H., Noh J., Lee J., Kim H., Kim J., Park H. Antiplatelet and antithrombotic effects of cordycepin-enriched WIB-801CE from Cordyceps militaris ex vivo, in vivo, and in vitro. // BMC Complementary Medicine and

- Therapies. – 2016. – Vol. 16, No.1 – P. 508. DOI: 10.1186/s12906-016-1463-8
37. Özgün M.G.T., Şevket E.G., Hüsamettin E., Kumandaş A., Aydingöz S. E., Yılmaz E. Ç., Kırdan T., Midi A. Effects of Algan Hemostatic Agent on bleeding time in a rat tail hemorrhage model // Turkish Journal Of Trauma And Emergency Surgery. – 2020. – Vol. 26, No.6 – P. 853–858. DOI: 10.14744/tjtes.2020.50384.
38. Kurz K.D., Main B.W., Sandusky G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride // Thrombosis Research. – 1990. – Vol.60, No.4 – P. 269–280. DOI:10.1016/0049-3848(90)90106-m
39. Girish S., Komal H., Ghanshyam P., Maheshwari R., Singh R., Seth A. K. Platelet Augmentation Potential of Polyherbal Formulation in Cyclophosphamide-Induced Thrombocytopenia in Wistar Rats // Folia Medica. – 2021. – Vol. 63, No.1 – P. 67–73. DOI: 10.3897/folmed.63.e49167.
40. Мурина М.А., Рощупкин Д.И., Сергиенко В.И. Антиагрегантное действие хлораминовых производных структурных аналогов таурина. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация // Сборник статей. Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». – 2019. – С. 838–841.
41. Самородов А.В., Камиллов Ф.Х., Халимов А.Р., Клен Е.Э., Халиуллин Ф.А. Влияние новой калиевой соли на основе 3-тиетанилзамещенного триазола на систему гемостаза // Биомедицина. – 2016. – №3 – С. 59–67.
42. Haybar H., Khodadi E., Zibara K., Saki N. Platelet Activation Polymorphisms in Ischemia // Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets. – 2018. – Vol. 18, No.2 – P. 153–161. DOI: 10.2174/1871529X18666180326121239.
43. Carson D.S., Garner J.P., Hyde S.A., Libove R. A., Berquist S.W., Hornbeak K.B., Jackson L.P., Sumiyoshi R.D., Hower-ton C L., Hannah S.L., Partap S., Phillips J.M., Hardan A.Y., Parker K.J. Arginine Vasopressin Is a Blood-Based Biomarker of Social Functioning in Children with Autism // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, No.7 – e0132224. DOI: 10.1371/journal.pone.0132224.

АВТОРЫ

Брель Анатолий Кузьмич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химии, Волгоградский государственный медицинский университет. ORCID ID: 0000-0003-3980-2847. E-mail: breлак@yandex.ru

Атапина Наталья Валентиновна – старший преподаватель кафедры химии, Волгоградский государственный медицинский университет. ORCID ID: 0000-0001-8272-5950. E-mail: rodina.natasha@inbox.ru

Будаева Юлия Николаевна – кандидат химических наук, доцент кафедры химии, Волгоградский государственный медицинский университет. ORCID ID: 0000-0003-2034-8285. E-mail: julya82@list.ru

Лисина Светлана Викторовна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры химии, Волгоградский государственный медицинский университет. ORCID ID: 0000-0002-5080-4854. E-mail: svlisina@gmail.com

Царук Светлана Сергеевна – студент, Волгоградский государственный медицинский университет. ORCID ID: 0000-0002-7726-3787. E-mail: svitlana.tsaruk@yandex.ru

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, заместитель директора по науке НЦИЛС, Волгоградский государственный медицинский университет. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Тюренков Иван Николаевич – доктор медицинских наук, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный работник высшей школы РФ, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармации Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования, Волгоградский государственный медицинский университет. ORCID ID: 000-0001-7574-3923. E-mail: fibfuv@mail.ru

УДК 658.8+614.275



ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РОССИЙСКОГО БИОАНАЛОГА ОМАЛИЗУМАБА У ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ СРЕДНЕТЯЖЕЛОГО И ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ

В.С. Крысанова^{1,2,3}, А.Д. Ермолаева^{1,3}, Т.Н. Ермолаева¹, М.В. Давыдовская^{1,4}, К.А. Кокушкин^{1,3}

¹ Государственное бюджетное учреждение Московской области «Научно-практический центр клинико-экономического анализа Министерства здравоохранения Московской области» 143403, Россия, Московская область, г. Красногорск, ул. Карбышева, 4А

² Медицинский институт непрерывного образования Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств» 125080, Россия, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

E-mail: v.krysanova@mail.ru

Получено 19.05.2021

Принята к печати 20.06.2021

Определённый успех в лечении бронхиальной астмы связан с внедрением в лечебный процесс моноклональных антител, которые позволили улучшить контроль заболевания. На территории России в настоящее время зарегистрирован целый ряд оригинальных генно-инженерных биологических препаратов, таких как бенрализумаб, реслизумаб, дупилумаб, меполизумаб и омализумаб. В 2020 году этот список пополнил первый российский биоаналог препарата омализумаб – Генолар® (АО «Генериум», Россия). Высокие темпы развития современной медицины тесно связаны с применением биоаналогов. Назначение биоаналогов сегодня зачастую дает возможность обеспечить большее количество пациентов современными препаратами за счет более низкой стоимости.

Цель. Проведение комплексной фармакоэкономической оценки применения отечественного биоаналогичного препарата омализумаба при лечении пациентов, страдающих atopической бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения.

Материалы и методы. На первом этапе был проведен информационный поиск в доступных базах данных (Cochrane Library, MedLine, Embase, eLIBRARY), по результатам которого был обнаружен мета-анализ Agache I., с соавторами, 2020 г., в рамках которого проводилась оценка эффективности и безопасности применения нескольких моноклональных антител. В качестве препарата сравнения был выбран дупилумаб. Фармакоэкономический анализ проводился с применением метода «минимизации затрат» и анализа влияния на бюджет. Разработанный алгоритм оказания медицинской помощи взрослым пациентам с atopической бронхиальной астмой, учитывающий ее различные варианты, позволил провести оценку затрат, включающую прямые медицинские и непрямые затраты.

Результаты. Анализ затрат продемонстрировал преимущество применения российского биоаналога омализумаба у пациентов с atopической бронхиальной астмой по сравнению с дупилумабом в связи с экономией финансовых средств до 40%. Анализ влияния на бюджет показал, что применение отечественного биоаналога омализумаба даже с учетом ежегодного прироста числа пациентов (8%) позволит сэкономить до 109 641 409,64 руб. (или 3%) по сравнению с текущей практикой.

Для цитирования: В.С. Крысанова, А.Д. Ермолаева, Т.Н. Ермолаева, М.В. Давыдовская, К.А. Кокушкин. Экономические аспекты применения российского биоаналога омализумаба у пациентов с atopической бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):235-248. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-235-248

© В.С. Крысанова, А.Д. Ермолаева, Т.Н. Ермолаева, М.В. Давыдовская, К.А. Кокушкин, 2021

For citation: V.S. Krysanova, A.D. Ermolaeva, T.N. Ermolaeva, M.V. Davydovskaya, K.A. Kokushkin. Economic aspects of application of the russian biosimilar omalizumab in patients with atopical bronchial asthma of moderate to severe clinical courses. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):235-248. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-235-248

Заключение. Применение отечественного биоаналога омализумаба у пациентов с atopической бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения является клинически эффективным и экономически выгодным подходом к организации медицинской помощи взрослым пациентам на территории России.

Ключевые слова: бронхиальная астма; биоаналог; омализумаб; дупилумаб; затраты; клинико-экономический анализ
Список сокращений: БА – бронхиальная астма; АВБ – анализ влияния на бюджет; ИГКС – ингаляционные глюкокортикостероиды; ПГКС – пероральные глюкокортикостероиды, ГИБП – генно-инженерные биологические препараты, ЖН-ВЛП – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты; ГЕТЕ – глобальная оценка эффективности лечения (Global Evaluation of Treatment Effectiveness); СМА – анализ «минимизации затрат» (cost-minimization analysis); СМП – скорая медицинская помощь; ОРИТ – отделения реанимации и интенсивной терапии; ИВЛ – искусственная вентиляция легких; ОМС – обязательное медицинское страхование; ФФОМС – Федеральный фонд обязательного медицинского страхования; ВВП – валовый внутренний продукт; НДС – налог на добавленную стоимость; ПГГ – программа государственных гарантий; КСГ – клинико-статистические группы; КЗ – коэффициент затратно-емкости; МНН – международное непатентованное наименование; ТН – торговое наименование

ECONOMIC ASPECTS OF APPLICATION OF THE RUSSIAN BIOSIMILAR OMALIZUMAB IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA OF MODERATE TO SEVERE CLINICAL COURSES

V.S. Krysanova^{1,2,3}, A.D. Ermolaeva^{1,3}, T.N. Ermolaeva¹, M.V. Davydovskaya^{1,4}, K.A. Kokushkin^{1,3}

¹ Scientific and Practical Center for Clinical and Economic Analysis, the Ministry of Health of Moscow Region
4A, Karbyshev Str., Krasnogorsk, Moscow Reg., Russia, 143403

² Medical Institute of Continuing Education, Moscow State University of Food Production
11, Volokolamsk Hwy., Moscow, Russia, 125080

³ Sechenov First Moscow State Medical University
8, Trubetskaya Str., Moscow, Russia, 119991

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University
1, Ostrovityanov Str., Moscow, Russia, 117997

E-mail: v.krysanova@mail.ru

Received 19 May 2021

Accepted 20 June 2021

A certain success in the treatment of bronchial asthma is associated with the introduction of monoclonal antibodies into the treatment process. They made it possible to improve the control of the disease. A number of original genetically engineered biological drugs, such as benralizumab, reslizumab, dupilumab, mepolizumab and omalizumab, are currently registered in Russia. In 2020, this list was supplemented by the first Russian biosimilar drug omalizumab – Genolar® (JSC Generium, Russia). High rates of the development of modern medicine are closely related to the use of biosimilars. The prescription of biosimilars today often makes it possible to provide a larger number of patients with modern drugs at lower costs.

The aim of the study was a comprehensive pharmacoeconomic assessment of the application of the domestic biosimilar drug omalizumab in the treatment of patients suffering from moderate and severe atopic bronchial asthma.

Materials and methods. At the first stage, an information search in the available databases (Cochrane Library, MedLine, Embase, eLIBRARY) was carried out. According to the results obtained, a meta-analysis (Agache I. et al.) was found out; within its framework, the efficacy and safety of the use of several monoclonal antibodies was assessed. Dupilumab was chosen as the reference drug. Pharmacoeconomic analyses were carried out using a “Cost-Minimization Analysis” (CMA) and a “Budget Impact Analysis” (BIA). Taking into account various options of bronchial asthma, the developed algorithm for providing medical care to adult patients with atopic asthma made it possible to assess the costs, including direct medical and indirect costs.

Results. The cost analysis demonstrated the advantage of using the Russian biosimilar omalizumab in patients with atopic asthma compared to dupilumab due to financial savings of up to 40%. The Budget Impact Analysis showed that the use of the domestic biosimilar omalizumab, even taking into account the annual increase in the number of patients (8%), will save up to 109,641,409.64 rubles (or 3%) compared to the current practice.

Conclusion. The use of the domestic biosimilar omalizumab in patients with moderate to severe atopic bronchial asthma is a clinically effective and economically justified approach to organizing medical care for adult patients in Russia.

Keywords: bronchial asthma; biosimilar; omalizumab; dupilumab; costs; pharmacoeconomic analysis

Abbreviations: BA – bronchial asthma; BIA – Budget Impact Analysis; ИГКСs – inhaled glucocorticosteroids; ОГКСs – oral glucocorticosteroids; ГЕБДs – genetically engineered biologic drugs; ВЕДs – vital and essential drugs; ГЕТЕ – Global Evaluation of Treatment Effectiveness; СМА – cost minimization analysis; А – Ambulance / EMS – Emergency medical services; РИСУ – resuscitation and intensive care unit; АЛВ – artificial lung ventilation; CHI – compulsory health insurance; GDP – gross domestic product; VAT – value added tax; PSGs – Programme on State Guarantees; DRG – diagnostic related groups; ИИ – input intensity coefficient; ИМН – international non-proprietary name; ТН – tradename

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) является серьезной медико-социальной проблемой, которая встречается почти у 262 млн человек [1]. Вне зависимости от возраста пациенты с данным заболеванием при недостаточно эффективном лечении подвержены различным ограничениям повседневной жизни, снижению ее качества или даже в крайних случаях смертельному исходу¹. В последнее время отмечается более высокий рост распространенности БА и уровня смертности от нее в развивающихся странах [2]. Увеличение числа пациентов с данной патологией также характерно и для отечественной популяции, о чем свидетельствуют данные официальной статистики^{2,3} и результаты эпидемиологических исследований [3–5].

Высокая распространенность, длительное хроническое течение заболевания, необходимость постоянной лекарственной терапии – все это обуславливает высокую социальную значимость БА [6, 7]. Астма представляет собой серьезное социально-экономическое бремя для стран с низким и средним уровнем дохода [3]. Термин «социально-экономическое бремя» подразумевает под собой не только высокие расходы на лечение (прямые медицинские затраты), но и затраты, связанные с потерей как временной, так и постоянной трудоспособности (прямые немедицинские затраты), ограничение физической и социальной активности, и, как следствие, снижение качества жизни пациентов и членов их семей (косвенные затраты) [8]. Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, глобальное бремя болезней измеряется в количестве лет жизни, утраченных в результате инвалидности. Данное понятие объединяет под собой годы жизни, потерянные в связи с состоянием здоровья, не отвечающим критериям полного здоровья, и годы жизни, потерянные из-за преждевременной смертности [9].

По опубликованным данным в 2019 году, БА среди всех заболеваний заняла высокое место по социально-экономическому бремени среди детей в

возрасте от 0 до 9 лет (19 место); среди взрослых в возрасте от 50 до 74 лет (28 место); в группе от 75 лет и старше (24 место), что в общей картине всемирного бремени всех болезней составило 0,85% от всех лет жизни, утраченных в результате инвалидности (Disability Adjusted Life years, DALY) [10]. В 2019 году неконтролируемое течение БА стало причиной потери 752 тыс. лет качественной жизни (Quality-adjusted Life years, QALYs) в Соединённых Штатах Америки (США) [11]. Медицинские расходы на борьбу с БА в США только за период с 2008 по 2013 г. составили около 50,3 млрд. долларов США [12], в Греции в 2019 г. экономические потери общества, обусловленные БА, составили 727 млн евро [13].

Астма является частой причиной пропуска школьных занятий и рабочих дней. Ретроспективный анализ показал, что в США дети школьного возраста при наличии БА в 1,54 раза чаще пропускают занятия, что приводит к более частому пропуску работы со стороны их родителей – в 1,16 раза. Это приводит к ежегодной потере около 7 млн. школьных дней [14]. Данный показатель также коррелирует со степенью тяжести БА. Так в работе Song H.J. и соавторов в 2020 г. [15] было показано, что в течение года на 1 пациента с легкой, средней и тяжелой БА приходится 0,76, 2,31 и 7,19 потерянных школьных и рабочих дней, соответственно, в пересчете на не прямые затраты это приводит к дополнительным тратам на 1 человека в течение года в размере 106, 321 и 1000 долларов США. Особое внимание заслуживает тяжелое течение БА, так в данном случае речь идет не только о более существенных экономических затратах, но и о значительном снижении качества жизни и увеличении риска смерти [16, 17]. Например, в Турции ежегодно на 1 пациента с тяжелой формой БА тратится около 4,4 тыс. долларов США [18]. Ретроспективный анализ за период июнь–ноябрь 2016 г. в Испании показал, что тяжелая форма БА приводит в среднем к потере 9,1 рабочего дня в год на 1 пациента, а средние прямые затраты при этом составляют около 7,5 тыс. евро на 1 пациента в год, с учетом не прямых затрат сумма возрастает до 8,6 тыс. евро в год [19].

По оценкам американских исследователей социально-экономическое бремя неконтролируемой БА у подростков и взрослых в течение последующих 20 лет составит порядка 963,5 млрд долларов США и 15,46 млн утраченных QALYs [11]. Следует отметить, что это все относится к предотвратимым потерям, так как они связаны с недостаточным контролем заболевания.

Контроль заболевания является наиболее важным критерием эффективности терапии БА, он подразумевает под собой устойчивое состояние с минимально выраженными или отсутствующими симптомами БА, что приводит к значительному снижению вероятности обострения и, соответственно, госпитализации, что уменьшает бремя заболевания

¹ Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2021. [Электронный ресурс] <http://www.ginasthma.org/>

² Александрова Г.А., Голубев Н.А., Тюрина Е.М., Оськов Ю.И., Шелепова Е.А., Поликарпов А.В., Кадулина Н.А., Беляева И.М., Гладких Т.Е., Щербакова Г.А., Семенова Т.А. Заболеваемость всего населения России в 2019 году с диагнозом, установленным впервые в жизни. Статистические материалы. Часть I. М.: Департамент мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Минздрава Российской Федерации. 2020. Режим доступа: <https://mednet.ru/napravleniya/medicinskaya-statistika>. Russian

³ Александрова Г.А., Голубев Н.А., Тюрина Е.М., Оськов Ю.И., Шелепова Е.А., Поликарпов А.В., Кадулина Н.А., Беляева И.М., Гладких Т.Е., Щербакова Г.А., Семенова Т.А. Заболеваемость всего населения России в 2019 году. Статистические материалы. Часть II. М.: Департамент мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Минздрава Российской Федерации. ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава Российской Федерации. 2020. Режим доступа: <https://mednet.ru/napravleniya/medicinskaya-statistika>.

как для пациентов, так и для системы здравоохранения [20, 21]. Поэтому данную проблему рассматривают не только как медицинскую, но и как важную проблему организации и экономики системы здравоохранения Российской Федерации [21]. В общей структуре заболевания около 5–10% [22] пациентов можно отнести к страдающим тяжелой формой БА, такие пациенты плохо поддаются стандартной терапии или достигают контроля над заболеванием только при применении ингаляционных глюкокортикостероидов (иГКС) в высоких дозах и/или пероральных ГКС (пГКС)⁴. Как правило, тяжелое течение БА ассоциировано с увеличением частоты использования ресурсов системы здравоохранения в связи с более частыми обострениями и, соответственно, более частыми посещениями медицинских учреждений различного уровня [23].

Прогресс в лечении БА тяжелого течения был достигнут на фоне внедрения в лечебный процесс моноклональных антител. Разработка генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) позволила достичь контроля заболевания у наиболее трудно поддающейся лечению группы пациентов [24].

На территории РФ в настоящее время зарегистрирован целый ряд ГИБП, таких как бенрализумаб, реслизумаб, дупилумаб, меполизумаб и омализумаб [25]. Эффективность и безопасность данных препаратов доказана в многочисленных клинических исследованиях, они включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП)⁵ и федеральные клинические рекомендации⁶.

С учетом значительных темпов развития современная медицина, в настоящее время, тесно связана с применением биоаналогов. Назначение биоаналогов сегодня зачастую дает возможность обеспечить большее количество пациентов жизненно необходимыми препаратами за счет более низкой стоимости. Анализ рынка демонстрирует, что после выхода биоаналогичных препаратов удается достичь значительной экономии бюджетных средств [26]. Разработка и исследования биоаналогов в РФ проводятся в соответствии с международными требованиями с целью доказательства их сопоставимости по показателям качества, безопасности и эффективности оригинальному препарату [27].

⁴ Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2021.

⁵ Распоряжение Правительства РФ от 12.10.2019 г. № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи» (в ред. распоряжений Правительства РФ от 26.04.2020 № 1142-р, от 12.10.2020 № 2626-р, от 23.11.2020 № 3073-р).

⁶ Клинические рекомендации Министерства здравоохранения РФ. Бронхиальная астма. Российское респираторное общество. 2019. Доступно по: https://spulmo.ru/upload/kr_bronhastma_2019.pdf. Ссылка активна на 12.06.2021 г.

В 2020 году на территории России был зарегистрирован отечественный биоаналог препарата омализумаб – ТН Генолар® (АО «Генериум», Россия)⁷. Его эффективность, безопасность и иммуногенность были продемонстрированы в двойном слепом сравнительном в параллельных группах рандомизированном исследовании III фазы, которое было проведено в период с июня 2018 г. по декабрь 2019 г. (NCT04607629 База данных clinicaltrials.gov). На базе 25 клинических центров в исследовании приняли участие 191 пациент, которые были рандомизированы в соотношении 2:1 в 2 группы: 1-я (n = 127) – лечение препаратом ТН Генолар® в течение 52 нед. ± 3 дня и 2-я (n = 64) – лечение препаратом ТН Ксолар® в течение 26 нед. ± 3 дня [28].

Основным критерием эффективности терапии в данном исследовании являлась доля пациентов с оценкой врача-исследователя «отлично» или «хорошо» по шкале Глобальной оценки эффективности лечения (Global Evaluation of Treatment Effectiveness – GETE) через 26 недель терапии. В обеих изучаемых популяциях (PP (Per Protocol) и FAS (Full Analyses Set)) не было обнаружено статистически значимых различий (p>0,05), в PP-популяции доля пациентов с оценкой врача-исследователя «отлично» или «хорошо» по шкале GETE в 1-й группе составила 57,4%, во 2-й – 45,2% (p = 0,132). Рассчитанный односторонний 95%-ный доверительный интервал с целью тестирования статистической гипотезы исследования о том, что изучаемый препарат «не хуже» препарата сравнения, в PP-популяции составил – 0,5–25,0% (p = 0,116) и –1,1–24,2% (p = 0,134) – в FAS-популяции. Анализ безопасности показал сопоставимость анализируемых препаратов по частоте развития нежелательных явлений. По результатам анализа частоты выявления общих антилекарственных антител к омализумабу показано отсутствие выработки антител в ответ на введение исследуемых препаратов.

На основании результатов проведенного клинического исследования [28] можно сделать вывод о клинической сопоставимости препаратов ТН Генолар® (АО «Генериум», Россия) и ТН Ксолар® («Новартис Фарма АГ», Швейцария) у пациентов с атопической БА среднетяжелого или тяжелого течения.

Таким образом, высокая распространенность БА, а также трудности, связанные с достижением контроля заболевания, невысокая приверженность пациентов к длительной многокомпонентной терапии обуславливают необходимость поиска новых путей решения проблемы лекарственного обеспечения. Однако высокая стоимость препаратов демонстрирует важность правильного распределения финансовых ресурсов при выборе таргетной терапии БА. Появление на отечественном фармацевтическом рынке пер-

⁷ Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Генолар®. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>

вого биоаналога омализумаба позволит постепенно повысить обеспеченность пациентов эффективной и современной лекарственной терапией при экономии финансовых ресурсов системы здравоохранения РФ.

ЦЕЛЬ. Проведение комплексной фармакоэкономической оценки применения отечественного биоаналога омализумаба при лечении пациентов, страдающих атопической бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения.

Задачи исследования:

1. Провести поиск и анализ научных публикаций по клинической эффективности и безопасности применения омализумаба при атопической БА у взрослых пациентов;

2. Определить популяцию пациентов, страдающих атопической БА и требующих назначения иммунобиологических препаратов, на основании опубликованных данных по заболеваемости и распространенности в мире и в России;

3. Разработать схему оказания помощи взрослым пациентам с атопической БА, учитывающую применение анализируемых подходов к лекарственной терапии;

4. Провести анализ прямых и косвенных затрат на терапию пациентов с атопической БА;

5. Провести сравнительный клинико-экономический анализ применения анализируемых лекарственных препаратов у пациентов с атопической БА;

6. Провести анализ влияния на бюджет с учетом текущей и моделируемой практики назначения иммунобиологических препаратов пациентам с атопической БА;

7. Провести анализ чувствительности полученных результатов к изменению исходных параметров.

Гипотеза исследования: применение отечественного биоаналога омализумаба у взрослых пациентов с атопической БА является клинически эффективной и экономически целесообразной стратегией организации помощи больным в условиях системы здравоохранения РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Использовали метод клинико-экономического анализа «минимизации затрат» (CMA – cost-minimization analysis) и анализ влияния на бюджет (АВБ).

На первом этапе исследования в доступных источниках (Кокрейновская библиотека, электронные базы данных MEDLINE и Embase, российская информационно-аналитическая система eLIBRARY) был проведен поиск данных по эффективности и безопасности применения в качестве таргетной терапии у пациентов с атопической БА различных вариантов ГИБП.

При обзоре литературы был обнаружен систематический обзор с мета-анализом – Agache I., и соавторов., 2020 г. [29], в рамках которого проводилась оценка эффективности и безопасности применения

3 ГИБП: бенрализумаба, дупилумаба и омализумаба. На основании гипотезы исследования в рамках настоящей работы была проведена комплексная фармакоэкономическая оценка применения различных ГИБП, используемых в рамках данного показания. В качестве препарата сравнения был выбран препарат дупилумаб, так как в опубликованном непрямом сравнительном анализе Bateman E.D., и соавторов, 2020 г. [30] было показано отсутствие статистически достоверной разницы между омализумабом и дупилумабом в отношении снижения частоты обострений.

Анализ «минимизации затрат» (CMA – cost-minimization analysis) является частным случаем анализа «затраты-эффективность», при котором производят сравнительную оценку двух и более технологий, имеющих идентичную эффективность и безопасность, но разную стоимость [31]. Расчет «минимизации затрат» производится по формуле:

$$CMD = Cost1 - Cost2,$$

где: CMD (cost-minimization difference) – показатель разницы затрат; Cost1 и 2 – прямые и косвенные затраты на применение 1-й и 2-й технологий.

В ходе проведения клинико-экономического анализа для оценки уровня затрат был разработан алгоритм оказания медицинской помощи взрослым пациентам с атопической БА. Так как данная форма БА характеризуется частыми обострениями, то в рамках исследования оценивались ресурсы системы здравоохранения, связанные с их ведением, средняя ежегодная частота которых рассчитывалась как произведение частоты обострений на фоне отсутствия терапии ГИБП [32, 33] и коэффициента заболеваемости (Incidence Rate Ratio, IRR), полученного на основании мета-анализа Agache I., и соавторов, 2020 г. [29]. Тактика ведения обострений (условия оказания медицинской помощи) определялась на основании опубликованных ранее данных [34, 35]. Алгоритм учитывал оказание медицинской помощи 1 взрослому пациенту с атопической БА. Временной горизонт исследования составил 1 год. Общая схема исследования представлена на рисунке 1.

Описание допущений модели

1. В рамках исследования рассматривались только пациенты с атопической БА, получающие один из анализируемых вариантов ГИБП;

2. Вне обострения (контролируемое течение) пациенты с атопической БА получают базисную терапию и ГИБП, для контроля терапии наблюдаются у врача в условиях амбулаторно-поликлинического звена;

3. При обострении пациент с атопической БА помимо скорой медицинской помощи (СМП) может получить медицинскую помощь в стационарных условиях, при необходимости с оказанием помощи в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и проведением искусственной вентиляции легких (ИВЛ).



Рисунок 1 – Общая схема исследования

Таблица 1 – Прямые медицинские нелекарственные затраты

Медицинская услуга	Стоимость, руб.	Источник информации
Вызов бригады скорой медицинской помощи	2 713,40	Программа государственных гарантий, 2021 год
Обращение по поводу заболевания при оказании медицинской помощи в амбулаторных условиях	1 505,10	Программа государственных гарантий, 2021 год
Базовая ставка для круглосуточного стационара	37 382,3	Программа государственных гарантий, 2021 год
Базовая ставка для дневного стационара	22 261,5	Программа государственных гарантий, 2021 год
Бронхиальная астма, взрослые (КСГ st23.005; КЗ=1,1)	26 971,33	Методические рекомендации по способам оплаты медицинской помощи за счет средств ОМС ФФОМС, 2021 год
Болезни органов дыхания (КСГ ds23.001; КЗ=0,9)	12 021,21	Методические рекомендации по способам оплаты медицинской помощи за счет средств ОМС ФФОМС, 2021 год
Грипп и пневмония с синдромом органной дисфункции (КСГ st12.013; КЗ=4,4)	106 913,38	Методические рекомендации по способам оплаты медицинской помощи за счет средств ОМС ФФОМС, 2021 год

Таблица 2 – Результаты анализа показателей эффективности рассматриваемых ГИБП на 1 пациента, страдающего атопической БА среднетяжелого и тяжелого течения, в течение 1 года

Показатель	Дупилумаб	Омализумаб
Средневзвешенная частота обострений в год, число случаев	0,50	0,49
Частота госпитализаций, число случаев	0,13	0,13
Частота госпитализаций в ОРИТ, число случаев	0,005	0,005
Частота летальных исходов, число случаев	0,00003	0,00003

Таблица 3 – Результаты анализа затрат на лекарственную терапию с применением ГИБП на 1 пациента с атопической БА в течение 1 года

МНН	ТН	Лек. форма/ дозировка/ упаковка	Режим введения	Затраты на 1 месяц терапии, руб.	Затраты на терапию в течение 1 года, руб.
Дупилумаб	Дупиксент	раствор для подкожного введения, 175 мг/мл, 1.14 мл (2)	начальная доза – 400 мг (2 инъекции по 200 мг), далее – по 200 мг каждые 2 недели	80 534,19	966 410,34
		раствор для подкожного введения, 150 мг/мл, 2 мл – шприц с системой защиты иглы (2)	начальная доза – 600 мг (2 инъекции по 300 мг), далее – по 300 мг каждые 2 недели		
Омализумаб	Генолар	лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 150 мг (1)	от 75 до 600 мг 1 раз в 2 или 4 недели	46 586,37	559 036,47

Таблица 4 – Результаты анализа прямых медицинских и непрямых затрат на ведение 1 пациента с атопической БА в течение 1 года

Показатель	Дупилумаб	Омализумаб
Прямые медицинские затраты		
Затраты на терапию ГИБП, руб.	966 410,34	559 036,47
Затраты на базисную терапию, руб.	15 959,00	15 959,00
Затраты на контроль за введениями, руб.	18 061,20	18 061,20
Затраты на обострение без госпитализации, руб.	4 354,31	4 324,56
Затраты на обострение с госпитализацией (без учета ОРИТ), руб.	3 468,85	3 445,15
Затраты на обострение с госпитализацией (с учетом ОРИТ), руб.	572,93	569,02
Затраты на СМП, руб.	1 346,36	1 337,16
Итого, руб.	1 010 172,99	602 732,56
Непрямые затраты		
Недополученный ВВП в результате преждевременной смерти, руб.	59,50	59,10
Итого, руб.	59,50	59,10
Суммарные затраты, руб.	1 010 232,49	602 791,65

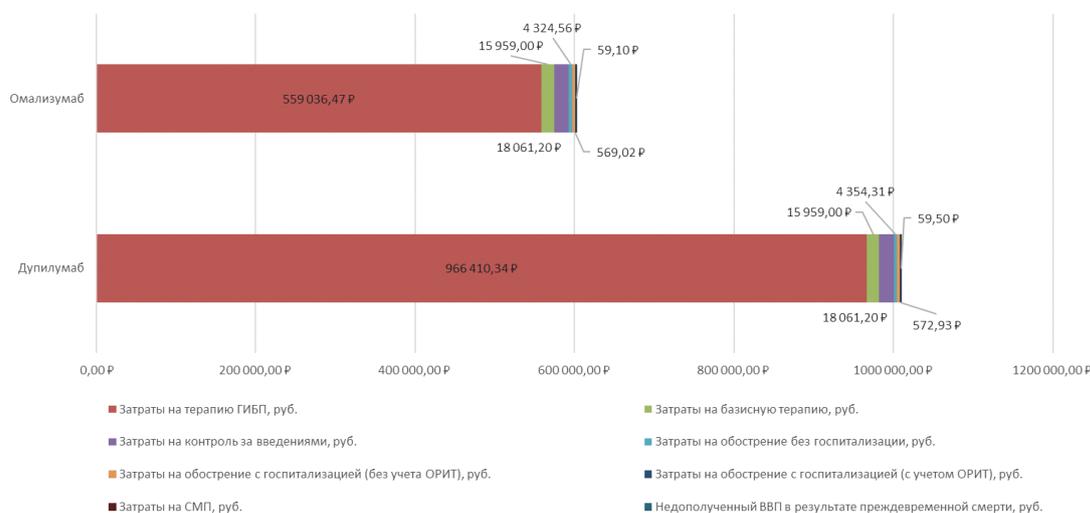


Рисунок 2 – Результаты оценки затрат на оказание медицинской помощи 1 пациенту с атопической БА в течение 1 года

Таблица 5 – Результаты анализа влияния на бюджет применения различных вариантов ГИБП у пациентов с atopической БА

Показатель	Текущая практика	Доля, %	Моделируемая практика 1	Доля, %	Моделируемая практика 2	Доля, %
Омализумаб						
Лекарственный препарат	ТН Ксолар®		ТН Ксолар® + ТН Генолар®		ТН Генолар®	
Количество пациентов, чел.	5608	93%	6040	93%	6040	93%
Затраты, руб.	3 783 840 662,93		3 858 091 061,99		3 640 861 581,16	
Дупилумаб						
Лекарственный препарат	Дупилумаб		Дупилумаб		Дупилумаб	
Количество пациентов, чел.	422	7%	455	7%	455	7%
Затраты, руб.	426 318 110,36		459 655 782,50		459 655 782,50	

Для проведения клинко-экономического анализа была выбрана позиция «государство», в связи с этим в анализе оценивались прямые медицинские затраты, оплачиваемые за счет бюджетных средств и/или средств системы обязательного медицинского страхования (ОМС) и непрямые затраты.

В рамках исследования затраты на оказание помощи пациентам с atopической БА включали в себя несколько видов.

Прямые медицинские затраты на: таргетные препараты (ГИБП); базовую лекарственную терапию; контроль за терапией (амбулаторное наблюдение); скорую медицинскую помощь (СМП); лечение обострения в условиях дневного и круглосуточного стационара; оказание помощи в условиях ОРИТ.

Непрямые затраты в виде потери валового внутреннего продукта (ВВП), связанные с преждевременной смертностью пациентов с atopической БА.

На первом этапе были определены прямые медицинские затраты на ГИБП, анализируемые в рамках настоящего исследования. Режим дозирования препаратов определялся с учетом официальной инструкции по применению^{8,9,10}, затраты на лекарственную терапию определялись на 1 пациента в течение одного года. На основании данных Регистра пациентов с тяжелой бронхиальной астмой (по состоянию на 31.12.2020 года)¹¹ были определены среднемесячные дозы анализируемых препаратов: для омализумаба она составила 383 мг, для дупилумаба – 567 мг.

Анализируемые лекарственные препараты включены в перечень ЖНВЛП, расчет стоимости 1 упаковки для них производился на основании цены, зарегистрированной в Государственном реестре предельных отпускных цен¹², с учетом средневзвешенного размера предельной оптовой надбавки,

утвержденной в различных регионах РФ (с учетом численности населения) и налога на добавленную стоимость (НДС)^{13,14,15}. НДС для лекарственных препаратов в РФ составляет 10% (льготное налогообложение), предельная оптовая надбавка равна 11,39%.

Базовые расчеты были осуществлены на основании следующих цен на лекарственные препараты (без учета НДС и предельной оптовой надбавки) за 1 упаковку:

Омализумаб (Генолар®), лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 150 мг – 14 890,61 руб.;

Дупилумаб (Дупиксент®), раствор для подкожного введения, 150 мг/мл, 2 мл (2) – 69 552 руб.;

Дупилумаб (Дупиксент®), раствор для подкожного введения, 175 мг/мл, 1.14 мл (2) – 46 368 руб.

На основании определенной стоимости 1 упаковки препарата был произведен расчет стоимости 1 мг действующего вещества для определения затрат на 1 месяц терапии с учетом среднемесячных доз, затем был произведен расчет затрат на годовой курс терапии (12 месяцев).

Затраты на базисную терапию пациента с atopической БА были определены на основании опубликованных ранее исследований [36], они составили 15 959 руб./пациент в течение 1 года.

С учетом формы выпуска для ГИБП также учитывались затраты на контроль за терапией, так как согласно инструкции по медицинскому применению данную группу препаратов следует вводить под присмотром медицинского персонала, однако для препарата дупилумаб предусмотрена возможность самостоятельного введения пациентом. Было принято допущение, что для всех рассматриваемых препа-

⁸ Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Генолар®.

⁹ Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Ксолар® [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>.

¹⁰ Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Дупиксент® [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>.

¹¹ МОО «Российское Респираторное Общество». Регистр пациентов с тяжелой бронхиальной астмой (по состоянию на 31.12.2020 г.). [Электронный ресурс] (материалы предоставлены АО «Генериум»).

¹² Государственный реестр предельных отпускных цен. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/Pricelims.aspx>.

¹³ Информация о предельных размерах оптовых надбавок и предельных размерах розничных надбавок к ценам на жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты, установленные в субъектах Российской Федерации (данные по состоянию на 19.02.2021 г.). Сайт Федеральной антимонопольной службы России. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://fas.gov.ru/documents/687611>.

¹⁴ Федеральная служба государственной статистики. Оценка численности постоянного населения на 1 января 2021 года. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.gks.ru/folder/12781>.

¹⁵ Налоговый кодекс Российской Федерации (часть вторая) от 05.08.2000 №117-ФЗ. Статья 164. Налоговые ставки. П. 2. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_28165/35cc6698564adc4507baa31c9cfdbb4f2516d068/.

ратов частота обращений за медицинской помощью в амбулаторных условиях составит 1 раз в месяц. Затраты на контроль за терапией рассчитывались на основании норматива финансовых затрат на 1 обращение по поводу заболевания в амбулаторных условиях согласно Программе государственных гарантий (ПГГ) бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2021 год¹⁶.

На следующем этапе определяли затраты, связанные с ведением пациентов в период обострения atopической БА. При обострении БА в рамках исследования было заложено оказание нескольких видов медицинской помощи: при возникновении обострения пациент осуществлял вызов СМП, после чего он мог проходить лечение либо в условиях дневного стационара, либо в условиях круглосуточного стационара. При оказании медицинской помощи в условиях круглосуточного стационара при необходимости пациент получал помощь в условиях ОРИТ с проведением ИВЛ.

Затраты на СМП и стационарное лечение определялись на основании норматива финансовых затрат за счет средств ОМС согласно ПГГ бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2021 год с учетом Методических рекомендаций по способам оплаты медицинской помощи за счет средств ОМС Федерального фонда ОМС¹⁷ и методических рекомендаций ФГБУ «Центр экспертизы и контроля качества медицинской помощи»¹⁸. Было сделано допущение, что количество вызовов СМП равнялось числу обострений atopической БА в течение 1 года. Все случаи стационарного лечения были сопоставлены с соответствующими клинико-статистическими группами (КСГ), для которых были определены коэффициенты затратноёмкости (КЗ). Все расчеты для стационарной помощи (круглосуточный и дневной стационар) осуществлялись по следующей формуле:

$$C = N \times K3 \times PK,$$

где: С – средняя стоимость законченного случая госпитализации, включённого в КСГ, в медицинских организациях (их структурных подразделениях), оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях за счёт средств ОМС; N – средний норма-

тив финансовых затрат на 1 случай госпитализации в медицинских организациях (их структурных подразделениях), оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях за счёт средств ОМС; КЗ – коэффициент затратноёмкости КСГ, к которой отнесён данный случай госпитализации; ПК – поправочный коэффициент, отражающий нижний уровень базовой ставки от норматива финансовых затрат, установленного ПГГ (для дневного стационара – 0,6, для круглосуточно стационара – 0,65).

Общая характеристика включенных в анализ прямых медицинских затрат (за исключением лекарственной терапии) представлена в таблице 1.

Непрямые затраты были рассчитаны на 1 пациента на один год. Недополученный ВВП государством вследствие потерь из-за преждевременной смертности рассчитывали исходя из вероятности смерти у пациентов с обострением atopической БА, находящихся на ИВЛ, умноженной на размер недополученного ВВП в сутки, равного 6208,23 руб./день^{19,20}.

На основании проведенных расчетов далее был проведен АВБ, который является частью комплексной оценки лекарственных препаратов и направлен на оценку финансовых последствий применения тех или иных лекарственных средств или медицинских изделий²¹.

С учетом того, что БА хроническое заболевание, которое требует постоянного и длительного лечения, временной горизонт для АВБ составил также 1 год. Основная характеристика популяции, у которой предполагается применение анализируемой медицинской технологии (отечественного биоаналога омализумаба): пациенты в возрасте 18 лет и старше, страдающие atopической бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения, которым показано назначение иммунобиологических препаратов.

Согласно данным Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохране-

¹⁶ Постановление Правительства РФ от 28 декабря 2020 года №2299 «О программе государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2021 год и на плановый период 2022 и 2023 годов». [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://government.ru/news/41272/>.

¹⁷ Методические рекомендации по способам оплаты медицинской помощи за счет средств обязательного медицинского страхования. Протокол заочного заседания членов рабочей группы от 29 декабря 2020 г. № 06/11/8 [Электронный ресурс] Официальный сайт Федерального фонда обязательного медицинского страхования. Режим доступа: <http://www.ffoms.ru/>.

¹⁸ Омеляновский В.В., Авксентьева М.В., Сура М.В. и др. Методические рекомендации по проведению сравнительной клинико-экономической оценки лекарственного препарата (новая редакция). Утверждены приказом ФГБУ «ЦЭКМП» Минздрава России от 29 декабря 2018 г. № 242-од. Москва, 2018 г. 46 с. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://rosmedex.ru/wp-content/uploads/2019/06/MR-KE%60I_novaya-redaktsiya_2018-g..pdf.

¹⁹ Омеляновский В.В., Авксентьева М.В., Сура М.В. и др. Методические рекомендации по расчету затрат при проведении клинико-экономических исследований лекарственных препаратов. Утверждены приказом ФГБУ «ЦЭКМП» Минздрава России от 29 декабря 2017 г. №185-од. Москва, 2017 г. 24 с. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://rosmedex.ru/wp-content/uploads/2018/02/Metodicheskie-rekomendatsii-po-raschetu-zatrat-pri-provedenii-kliniko-e%60konomicheskikh-issledovaniy-lekarstvennyih-preparatov-2017.pdf>.

²⁰ Об утверждении Методологии расчета экономических потерь от смертности, заболеваемости и инвалидизации населения [Электронный ресурс] Приказ Минэкономразвития России №192, Минздравсоцразвития России №323н, Минфина России №45н, Росстата №113 от 10.04.2012 (зарегистрировано в Минюсте России 28.04.2012 № 23983). Доступ из справ.-правовой системы «КонсультантПлюс»

²¹ Омеляновский В.В., Авксентьева М.В., Сура М.В. и др. Методические рекомендации по оценке влияния на бюджет в рамках реализации программы государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи. Добавить - Утверждены приказом ФГБУ «ЦЭКМП» Минздрава России от 29 декабря 2018 года № 242-од. Москва, 2018. 40 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://rosmedex.ru/wp-content/uploads/2019/06/MR-AVB_novaya-redaktsiya_2018-g..pdf.

ния ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России число впервые в жизни установленных диагнозов БА в 2019 г. составило 122 897 случаев или 83,7 случая на 100 тыс. человек, общее количество зарегистрированных случаев БА в 2019 г. составило 1 592 596 человек. Среди общей популяции пациентов с БА около 68% имеют atopическую форму БА [37], около 5–10% имеют тяжелую форму (для моделирования популяции было принято равным 8%) [38, 39], таким образом число пациентов с тяжелой формой atopической БА в РФ составляет около 86637. По данным «Регистра пациентов с тяжелой бронхиальной астмой на территории Российской Федерации» около 8% пациентов с БА тяжелого течения получают терапию с применением ГИБП [40, 41]. Доля пациентов, получающих ГИБП МНН омализумаб и дупилумаб, составляет около 87%, при этом между собой данные препараты соотносятся как 93% и 7%²². На основании проанализированных данных можно установить, что популяция пациентов с тяжелой формой atopической БА, получающих терапию с применением ГИБП МНН омализумаб и дупилумаб, может составлять около 6030 человек.

На заключительном этапе исследования был проведен анализ чувствительности, целью которого было выявить чувствительность результатов исследования к изменению исходных параметров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе обзора было выявлено, что на настоящий момент не было проведено прямых сравнительных клинических исследований для анализируемых препаратов.

В систематическом обзоре Agache I. с соавторами, 2020 г. [29] рассматривались вопросы эффективности и безопасности терапии тяжелой аллергической БА с применением бенрализумаба, дупилумаба, и омализумаба. В обзор было включено 28 исследований (3 РКИ, посвященных бенрализумабу, 1 РКИ, посвященное дупилумабу, и 24 РКИ, посвященных омализумабу) с участием пациентов в возрасте от 12 до 75 лет (за исключением популяции пациентов в исследованиях омализумаба, возраст пациентов в этих исследованиях составил также 6–11 лет), получающих терапию в течение 12–56 недель.

Оценка частоты обострений для дупилумаба была проведена в 1 РКИ, для омализумаба – в 6 РКИ. Было показано, что все анализируемые ГИБП снижают частоту обострений с высокой достоверностью доказательств: коэффициент заболеваемости (IRR) для бенрализумаба составил 0,63 (95% ДИ 0,50–0,81), для дупилумаба 0,58 (95% ДИ 0,47–0,73), для омализумаба 0,56 (95% ДИ 0,45–0,69). Применение бенрализумаба, дупилумаба и омализумаба по результатам систематического обзора приводит к статистически значимому улучшению контроля БА. При этом приме-

нение омализумаба и бенрализумаба ассоциировано с улучшением качества жизни пациентов. Также было показано, что применение омализумаба приводит к снижению необходимой дозы ИГКС и ПГКС.

Для проведения анализа «минимизации затрат» был проведен отбор критериев эффективности, влияющих на уровень затрат. Для настоящего исследования в качестве критерия эффективности, влияющего на общий уровень затрат и использование ресурсов системы здравоохранения, был выбран показатель частоты обострений.

По данным РКИ Hanania N.A. и соавторов, 2011 г. [32] частота обострений у пациентов с atopической БА, не получающих ГИБП, составляет 0,88 в год, относительно данного показателя было определено число обострений на фоне терапии омализумабом с учетом данных полученных в рамках мета-анализа Agache I. и соавторов, 2020 г. [29].

По данным РКИ Corren J. и соавторов, 2019 г. [33] частота обострений у пациентов с atopической БА, не получающих ГИБП, составляет 0,736 в одной группе и 0,975 в другой группе в год, относительно данных значений определялось среднее число обострений на фоне терапии дупилумабом с учетом данных полученных в рамках мета-анализа Agache I. и соавторов, 2020 г. [29].

Число госпитализаций было определено на основании числа обострений с учетом частоты госпитализаций равной 27% [37], при этом около 4% больных нуждаются в госпитализации в ОРИТ. Около 5% всех больных с обострением БА требуют проведения интубации трахеи и ИВЛ, в случае проведения ИВЛ летальность больных может достигать 9,8% [34]. Подробные данные представлены в таблице 2.

Результаты анализа затрат на лекарственную терапию с применением ГИБП на 1 пациента с atopической БА в течение 1 года представлены в таблице 3. Разница в затратах на лекарственную терапию ГИБП составляет 407 373,87 руб. или 42% в пользу применения отечественного биоаналога омализумаба.

Наименьшие общие затраты связаны с оказанием медицинской помощи пациентам с atopической БА при применении отечественного биоаналога омализумаба (602 791,65 руб.), наибольшие – при применении дупилумаба (1 010 232,49 руб.) (табл. 4 и рис. 2). При этом разница в пользу отечественного биоаналога (ТН Генолар®) составила 407 440,84 руб. или 40% в течение 1 года на 1 пациента. Для всех анализируемых ГИБП наибольшая доля в структуре прямых медицинских затрат приходится непосредственно на сами препараты, доля затрат максимальна доходит до 96% (для дупилумаба).

Таким образом, анализ затрат продемонстрировал преимущество применения отечественного биоаналога омализумаба у пациентов с atopической БА по сравнению с дупилумабом, так как его применение ассоциировано с наименьшими затратами в течение 1 года на 1 пациента с atopической БА среднетяжелого и тяжелого течения – разница составила 40%.

²² МОО «Российское Респираторное Общество». Регистр пациентов с тяжелой бронхиальной астмой (по состоянию на 31.12.2020 г.). [Электронный ресурс] (материалы предоставлены АО «Генериум»)

В рамках проведения АВБ был рассчитан ориентировочный размер целевой популяции (6030 чел.). Однако полученные данные могут не полностью отражать реальную картину количества пациентов с atopической БА, нуждающихся в назначении терапии ГИБП. Существует еще целая когорта пациентов, которые имеют коморбидные состояния (например, atopический дерматит, полипозный риносинусит или идиопатическая крапивница), при которых также требуется назначение ГИБП. В связи с этим определить точный размер популяции пациентов представляется затруднительным.

Для оценки уровня затрат в рамках анализа реальной и моделируемой практики был проведен расчет затрат на терапию пациентов с atopической БА, результаты представлены в таблице 5. В рамках проведения АВБ было принято допущение, что для моделируемой практики будет рассмотрено 2 варианта. В настоящее время основную долю препарата МНН омализумаб составляет оригинальный препарат ТН Ксолар®, после появления на отечественном фармацевтическом рынке биоаналога ТН Генолар® структура применения подвергнется изменениям. На основании данного предположения было рассмотрено несколько вариантов – применение препаратов МНН омализумаб в соотношении 1:1 и применение только отечественного биоаналога ТН Генолар®. При этом с учетом горизонта моделирования 1 год было учтено, что ежегодный прирост пациентов составит около 8% согласно официальным статистическим данным, что приведет к увеличению популяции до 6495 пациентов.

АВБ продемонстрировал, что затраты для текущей практики оказания медицинской помощи пациентам, нуждающимся в проведении терапии с применением ГИБП МНН омализумаб и дупилумаб, составили 4 210 158 773,29 руб. Для 1-го варианта (ТН Ксолар® + ТН Генолар® 50/50) моделируемой практики затраты составили 4 317 746 844,48 руб., для 2-го варианта (ТН Генолар® 100%) – 4 100 517 363,65 руб. Таким образом, АВБ продемонстрировал, что применение отечественного биоаналога омализумаба даже с учетом ежегодного прироста числа пациентов (8%) позволит сэкономить до 109 641 409,64 руб. (или 3%) по сравнению с текущей практикой.

Для оценки устойчивости модели было проведено изменение значения критериев эффективности для омализумаба и дупилумаба в сторону уменьшения и увеличения; стоимости лекарственных препаратов омализумаба и дупилумаба, а также численности целевой популяции. Анализ чувствительности был проведен с учетом того, что в реальной практике показатели эффективности терапии могут отличаться в связи с индивидуальными особенностями пациентом, уровнем приверженности к терапии и т.д., затраты на лекарственные препараты также могут отличаться в различных регионах РФ, т.к. для каждого региона установлен свой уровень оптовых надбавок. Анализ чувствительность продемонстрировал устой-

чивость настоящей модели к изменению исходных параметров.

Таким образом, настоящее исследование является первым опытом проведения комплексной фармакоэкономической оценки применения отечественного биоаналога омализумаба у пациентов с atopической БА среднетяжелого и тяжелого течения. Обзор отечественной литературы показал, что уже было проведено несколько клинико-экономических исследований, посвященных применению оригинального препарата омализумаба.

Так в работе Колбина А.С. и др., 2016 г. [42] были рассмотрены вопросы использования омализумаба у детей с тяжелой неконтролируемой БА, однако в ходе работы не проводилось сравнение нескольких ГИБП, а только по сравнению со стандартной терапией. Было показано, что в рамках 5-летнего горизонта моделирования использование омализумаба приведет к дополнительным затратам в размере 39821 руб. на 1 предотвращенную госпитализацию [42]. АВБ продемонстрировал сопоставимость общих затрат на 100 детей с БА, из которых 7 получали бы препарат омализумаб, и на 105 детей с БА без применения таргетной терапии. До этого в работе Колбина А.С., и др., 2015 г. [43] рассматривались схожие аспекты применения омализумаба в отношении взрослых пациентов.

В другой работе Куликова А.Ю. и др., 2018 г. [44] была проведена уже сравнительная оценка применения нескольких таргетных препаратов – омализумаба и реслизумаба. Результаты работы показали, что в рамках лечения тяжелой бронхиальной астмы с эозинофильным типом воспаления применение реслизумаба является более экономически эффективным, при этом в ходе исследования был применен анализ «затраты-эффективность». В работе Толкушина А.Г. и др., 2019 г. [45] клинико-экономический анализ проводился с позиции того, что между лекарственными препаратами омализумабом и меполизумабом не выявлено статистически достоверной разницы в эффективности и безопасности. Суммарные прямые медицинские затраты составили для меполизумаба 870 130 руб., а для омализумаба – 1 852 063 руб. Полученные различия в годовых затратах на терапию с применением омализумаба по сравнению с результатами в нашей работе можно обосновать различными подходами к моделированию и использованием при расчетах стоимости оригинального препарата. Если сопоставить полученные нами результаты с годовыми затратами на терапию меполизумабом, то мы получим экономию финансовых средств в пользу использования отечественного биоаналога омализумаба. Сравнительный фармакоэкономический анализ, проведенный Зыряновым С.К., и др., 2019 г. [46] уже включал в себя помимо омализумаба и меполизумаба еще и реслизумаб для терапии пациентов с неконтролируемой atopической БА среднетяжелого и тяжелого течения. В ходе анализа «затраты-эффективность» была продемонстри-

рована экономическая эффективность омализумаба по сравнению с другими препаратами, включенными в исследование.

В ходе нескольких обнаруженных работ проводилась сравнительная фармакоэкономическая оценка применения омализумаба и дупилумаба [35, 47], в рамках которых было продемонстрировано экономическое преимущество применения дупилумаба у пациентов с тяжелой БА. Так в публикации Саласюк А.С. и др., 2019 г. [37] были представлены результаты собственного непрямого сравнительного анализа эффективности применения омализумаба и дупилумаба, в ходе которого были показаны различия в отношении частоты развития обострений. Гипотеза нашего исследования строилась на основании непрямого сравнительного анализа Bateman E.D. et al., 2020 г. [30]. Появление более новых сведений в отношении сравнительной эффективности, а также выход на отечественный фармацевтический рынок биоаналога послужило поводом для проведения нового исследования. В ходе настоящей работы были представлены собственные расчеты по частоте обострений, основанные на данных крупных РКИ и мета-анализа Agache I. et al., 2020 г. [29].

Таким образом, в настоящее время накоплено большое количество данных о различных экономических аспектах применения ГИБП в отечественных условиях. В рамках всех обнаруженных публикаций рассматривались вопросы применения оригинальных лекарственных препаратов. При этом использование различных подходов к моделированию и выбору источников информации для проведения расчетов обусловили некоторую гетерогенность данных. В ходе нашей работы были рассмотрены вопросы применения отечественного биоаналога омализумаба, широкое внедрение которого позволит снизить среднюю годовую стоимость терапии с применением данного ГИБП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного фармакоэкономического анализа установлено, что применение отечественного биоаналога омализумаба у пациентов с атопической БА среднетяжелого и тяжелого течения является клинически эффективным и экономически выгодным подходом к организации медицинской помощи взрослым пациентам на территории Российской Федерации.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проводилось при поддержке компании АО «Генериум», Россия.

Спонсор не оказывал влияния на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.С. Крысанова – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста статьи; А.Д. Ермолаева – сбор и обработка материала; Т.Н. Ермолаева – разработка концепции исследования; М.В. Давыдовская – научное консультирование; К.А. Кокушкин – научное консультирование

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Enilari O., Sinha S. The Global Impact of Asthma in Adult Populations // *Annals of Global Health*. – 2019. – Vol. 85, No.1. – P. 2. DOI: 10.5334/aogh.2412
2. Reddel H.K., Hurd S.S., FitzGerald J.M. World Asthma Day. GINA 2014: A global asthma strategy for a global problem // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2014. – Vol. 18, No.5. – P. 505–506. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0246>.
3. Бельтюков Е.К., Братухин К.П. Эпидемиология аллергического ринита и бронхиальной астмы в Свердловской области // *Доктор.Ру*. – 2015. – № 7(108). – С. 11–14.
4. Авдеев С.Н., Ненашева Н.М., Жуденков К.В., Петраковская В.А., Изюмова Г.В. Распространенность, заболеваемость, фенотипы и другие характеристики тяжелой бронхиальной астмы в Российской Федерации // *Пульмонология*. – 2018. – Т. 28. – №3. – С. 341–358. DOI: 10.18093/08690189-2018-28-3-341-358.
5. Емельянов А.В., Сергеева Г.Р., Коровина О.В., Собченко С.А., Знахуренко А.А. Современная терапия бронхиальной астмы // *Российский семейный врач*. – 2012. – №2. – С. 9–15.
6. Шиловский И.П., Дынева М.Е., Курбачева О.М., Кудлай Д.А., Хаитов М.Е. Роль интерлейкина-37 в патогенезе аллергических заболеваний // *ACTA NATURAE*. – 2019. – №4(43). – С. 54–64. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-54-64.
7. Niespodziana K., Borochova K., Pazderova P., Schleder T., Astafyeva N., Baranovskaya T., Barbouche M.R., Beltyukov E., Berger A., Borzova E., Bousquet J., Bumbacea R.S., Bychkovskaya S., Caraballo L., Chung K.F., Custovic A., Docena G., Eiwegger T., Evsegneeva I., Emelyanov A. et al. Toward personalization of asthma treatment according to trigger factors // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2020. – Vol. 145, No.6. – P. 1529–1534.
8. Bahadori K, Doyle-Waters MM, Marra C, Lynd L, Alasaly K, Swiston J, FitzGerald JM. Economic burden of asthma: a systematic review // *BMC Pulm Med*. – 2009. – Vol. 9. – P. 24. DOI: 10.1186/1471-2466-9-24.
9. Mathers CD. History of global burden of disease assessment at the World Health Organization // *Arch Public Health*. – 2020. – Vol. 78. – P. 77. DOI: 10.1186/s13690-020-00458-3.
10. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396, No.10258. – P. 1204–1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9. Erratum in: *Lancet*. 2020. – Vol. 396, No.10262. – P.1562.

11. Yaghoubi M., Adibi A., Safari A., FitzGerald J.M., Sadatsafavi M. The Projected Economic and Health Burden of Uncontrolled Asthma in the United States // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2019. – Vol. 200, No.9. – P. 1102–1112. DOI: 10.1164/rccm.201901-0016OC.
12. Nurmamagambetov T., Kuwahara R., Garbe P. The Economic Burden of Asthma in the United States, 2008–2013 // *Ann Am Thorac Soc.* – 2018. – Vol. 15, No.3. – P. 348–356. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201703-259OC.
13. Vellopoulou K., Bakakos P., Loukides S., Maniadaakis N., Kourlaba G. The Economic Burden of Asthma in Greece: A Cross-Sectional Study // *Appl Health Econ Health Policy.* – 2019. – Vol. 17, No.5. – P. 629–640. DOI: 10.1007/s40258-019-00469-4.
14. Sullivan P., Ghushchyan V.G., Navaratnam P., Friedman H.S., Kavati A., Ortiz B., Lanier B. School absence and productivity outcomes associated with childhood asthma in the USA // *J Asthma.* – 2018. – Vol. 55, No.2. – P. 161–168. DOI: 10.1080/02770903.2017.1313273.
15. Song H.J., Blake K.V., Wilson D.L., Winterstein A.G., Park H. Medical Costs and Productivity Loss Due to Mild, Moderate, and Severe Asthma in the United States // *J Asthma Allergy.* – 2020. – Vol. 13. – P. 545–555. DOI: 10.2147/JAA.S272681.
16. Курбачева О.М., Павлова К.С. Фенотипы и эндотипы бронхиальной астмы: от патогенеза и клинической картины к выбору терапии // *Российский аллергологический журнал.* – 2013. – №1. – С. 15–24.
17. Ненашева Н.М. Тяжелая эозинофильная бронхиальная астма: новые возможности терапии // *Медицинский совет.* – 2018. – №15. – С. 44–52. DOI: 10.21518/2079-701X-2018-15-44-52.
18. Bavbek S., Malhan S., Mungan D., Misirligil Z., Erdinc M., Gemicioğlu B., Kivilcim Oguzulgen I., Oksuz E., Yildiz F., Yorgancioglu A. Economic burden of severe asthma in Turkey: a cost of illness study from payer perspective // *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* – 2021. – Vol. 53, No.3. – P. 128–137. DOI: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.149.
19. Melero Moreno C., Quirce S., Huerta A., Uría E., Cuesta M. Economic impact of severe asthma in Spain: multicentre observational longitudinal study // *J Asthma.* – 2019. – Vol. 56, No.8. – P. 861–871. DOI: 10.1080/02770903.2018.1499035.
20. Чучалин А., Цой А., Архипов В., Гавришина Е. Бронхиальная астма в России: результаты национального исследования качества медицинской помощи больным бронхиальной астмой // *Пульмонология.* – 2006. – №6. – С. 94–102. DOI: 10.18093/0869-0189-2006-6-94-102.
21. Ягудина Р.И., Куликов А.Ю., Огородова Л.М., Демко И.В., Толкушин А.Г., Кобякова О.С., Чучалин А. Г. Оптимизация поддерживающей терапии с использованием фармакоэкономической модели бронхиальной астмы (Оптим) // *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.* – 2010. – №1. – С. 40–46.
22. Bousquet J., Mantzouranis E., Cruz A.A. et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 126, No.5. – P. 926–938. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.07.019.
23. Ненашева Н.М. Биологическая терапия бронхиальной астмы: настоящее и будущее // *Consilium Medicum.* – 2016. – Т. 18, №11. – С. 30–38.
24. Al Efraij K., FitzGerald J.M. Current and emerging treatments for severe asthma // *J Thorac Dis.* – 2015. – Vol. 7. – P. E522– E525. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.10.73
25. Козлов В.А., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Козлов И.Г., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Борисов А.Г. Клиническая иммунология. Красноярск: Поликор, 2020. – 386 с.
26. Сыров В.В. Представления об эпидемиологии и возможностях профилактики бронхиальной астмы на современном этапе // *Аллергология и иммунология в педиатрии.* – 2016. – Т. 46, №3. – С. 20–33. DOI: 10.24411/2500-1175-2016-00017.
27. Иванов Р., Секарёва Г., Кравцова О., Кудлай Д., Лукьянов С., Тихонова И., Дёмин А., Максумова Л., Никитина И., Обухов А., Зайцев Д., Степанов А., Носырева М., Самсонов М. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств (биоаналогов) // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2014. – №1. – С. 21–36.
28. Ненашева Н.М., Аверьянов А.В., Ильина Н.И., Авдеев С.Н., Осипова Г.Л., Рубаник Т.В., Зорин В.Н., Молотков А.О., Кузубова Н.А., Костина Н.Э., Куддеса Л.М., Петров Д.В. Сравнительное изучение клинической эффективности биоаналогичного препарата Генолар® по результатам рандомизированного клинического исследования III фазы // *Пульмонология.* – 2020. – Т. 30, №6. – С. 782–796. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-6-782-796.
29. Agache I., Rocha C., Beltran J., Song Y., Posso M., Solà I., Alonso-Coello P., Akdis C., Akdis M., Canonica G.W., Casale T., Chivato T., Corren J., Del Giacco S., Eiwegger T., Firinu D., Gern J.E., Hamelmann E., Hanania N., Mäkelä M., Martin I.H., Nair P., O'Mahony L., Papadopoulos N.G., Papi A., Park H.S., Pérez de Llano L., Quirce S., Sastre J., Shamji M., Schwarze J., Canelo-Aybar C., Palomares O., Jutel M. Efficacy and safety of treatment with biologicals (benralizumab, dupilumab and omalizumab) for severe allergic asthma: A systematic review for the EAACI Guidelines – recommendations on the use of biologicals in severe asthma // *Allergy.* – 2020. – Vol. 75, No.5. – P. 1043–1057. DOI: 10.1111/all.14235.
30. Bateman E.D., Khan A.H., Xu Y., Guyot P., Chao J., Kamat S., Rowe P., Burnett H., Msihid J., Weinreich D., Pavord I.D. Pairwise indirect treatment comparison of dupilumab versus other biologics in patients with uncontrolled persistent asthma // *Respiratory Medicine.* – 2020. DOI: 10.1016/j.rmed.2020.105991
31. Авксентьева М.В. Основы клинико-экономического анализа. Клинико-экономическое обоснование протоколов ведения больных // *Проблемы стандартизации в здравоохранении.* – 2005. – №11. – С. 23–27.
32. Hanania N.A., Alpan O., Hamilos D.L., Condemi J.J., Reyes-Rivera I., Zhu J., Rosen K.E., Eisner M.D., Wong D.A., Busse W. Omalizumab in severe allergic asthma inadequately controlled with standard therapy: a randomized trial // *Ann Intern Med.* – 2011. – Vol. 154, No.9. – P. 573–582. DOI: 10.7326/0003-4819-154-9-201105030-00002. Erratum in: *Ann Intern Med.* – 2019. Vol. 171, No.7. – P. 528.
33. Corren J., Castro M., O'Riordan T., Hanania N.A., Pavord I.D., Quirce S., Chipps B.E., Wenzel S.E., Thangavelu K., Rice M.S., Harel S., Jagerschmidt A., Khan A.H., Kamat S., Maroni J., Rowe P., Lu Y., Amin N., Pirozzi G., Ruddy M., Graham N.M.H., Teper A. Dupilumab Efficacy in Patients with Uncontrolled, Moderate-to-Severe Allergic Asthma // *J Allergy Clin Immunol Pract.* – 2020. – Vol. 8, No.2. – P. 516–526. DOI: 10.1016/j.jaip.2019.08.050.
34. Kaur B.P., Lahewala S., Arora S., Agnihotri K., Panaich S.S., Secord E., Levine D. Asthma: Hospitalization Trends and Predictors of In-Hospital Mortality and Hospitalization Costs in the USA (2001-2010) // *International archives of allergy and immunology.* – 2015. – Vol. 168, No.2. – P. 71–78. DOI: 10.1159/000441687.
35. Саласюк А.С., Фролов М.Ю., Барыкина И.Н. Дупилумаб при тяжёлой неконтролируемой бронхиальной астме – экономические аспекты применения // *Качествен-*

- ная клиническая практика. – 2019. – №2. – С. 15–24. DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10069.
36. Крысанов И.С., Крысанова В.С., Карпов О.И., Ермакова В.Ю. Экономическое бремя тяжёлой бронхиальной астмы и атопического дерматита и влияние на него дупилумаба // Качественная клиническая практика. – 2020. – №3. – С. 15–26. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-3-15-26.
37. Ушакова Д.В., Никонов Е.Л. Эпидемиология бронхиальной астмы // Терапия. – 2018. – Т. 2, №20. – С. 90–95.
38. Архипов В.В., Григорьева Е.В., Гавришина Е.В. Контроль над бронхиальной астмой в России: результаты многоцентрового наблюдательного исследования НИКА // Пульмонология. – 2011. – №6. – С. 87–93. DOI:10.18093/0869-0189-2011-0-6-87-93.
39. Сергеева Г.Р., Емельянов А.В., Лешенкова Е.В., Знахуренко А.А. Биомаркеры воспаления дыхательных путей у пациентов с тяжелой бронхиальной астмой в реальной клинической практике // Пульмонология. – 2020. – Т. 30, №4. – С. 437–445. DOI:10.18093/0869-0189-2020-30-4-437-445.
40. Nenasheva, N., Belevsky, A., Kravchenko, N., Avdeev, S., Emel'yanov, A., Kurbacheva, O., Leschenko, I. Late Breaking Abstract-Preliminary analysis of the data of patients with severe bronchial asthma included in the Russian National Register of Severe Asthma (RSAR) // European Respiratory Journal. – 2019. – Vol. 54, No.63 suppl. – P. PA4261. DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA4261.
41. Nenasheva N., Belevsky A. Characteristics of Patients with Severe Asthma in the Russian Federation-the Russian Severe Asthma Registry // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2019. – Vol. 199. – P. A1337. DOI: 10.1164/ajrccm-conference.2019.199.1_MeetingAbstracts.A1337.
42. Колбин А.С., Намазова-Баранова Л.С., Вишнёва Е.А., Фролов М.Ю., Галанкин Т.Л., Алексеева А.А., Добрынина Е.А. Фармакоэкономический анализ применения омализумаба у детей, больных тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой: данные реальной клинической практики в России // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, №4. – С. 345–353. DOI: 10.15690/pf.v13i4.1606.
43. Колбин А.С., Фролов М.Ю., Галанкин Т.Л. Фармакоэкономический анализ лечения больных тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой в России // Практическая пульмонология. – 2015. – №4. – С. 10–17.
44. Куликов А.Ю., Макарова Е.И., Авдеев С.Н., Айсанов Р., Архипов В.В., Емельянов А.В., Ильина Н.И., Курбачева О.М., Матвеев Н.В., Ненашева Н.М., Федосенко С.В. Фармакоэкономический анализ применения лекарственного препарата реслизумаб в лечении тяжелой бронхиальной астмы с эозинофильным типом воспаления дыхательных путей // Пульмонология. – 2018. – Т. 28, №1. – С. 50–60. DOI: 10.18093/0869-0189-2018-28-1-50-60.
45. Толкушин А.Г., Погудина Н.Л., Иванов Д.А., Демко И.В. Клиническо-экономический анализ лечения взрослых пациентов с тяжелой аллергической эозинофильной бронхиальной астмой: меполизумаб и омализумаб // Медицинские технологии. Оценка и выбор. – 2019. – №1(35). – С. 74–85. DOI: 10.31556/2219-0678.2019.35.1.074-085.
46. Зырянов С.К., Дьяков И.Н., Авдеев С.Н. Сравнительный фармакоэкономический анализ использования генно-инженерных биологических препаратов при лечении больных неконтролируемой среднетяжелой и тяжелой атопической бронхиальной астмой // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. – 2019. – Т. 12, №4. – С. 268–278. DOI: 10.17749/2070-4909.2019.12.4.268-278.
47. Зырянов С.К., Дьяков И.Н., Карпов О.И. Моделирование влияния иммунобиологических препаратов на экономическое бремя тяжёлой бронхиальной астмы // Качественная клиническая практика. – 2019. – №3. – С. 4–12. DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10078.

АВТОРЫ

Крысанова Вера Сергеевна – научный сотрудник отдела клинико-экономического анализа ГБУ МО «Научно-практический центр клинико-экономического анализа Министерства здравоохранения Московской области»; аспирант кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России; преподаватель кафедры терапии с курсом фармакологии и фармации Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств». ORCID ID: 0000-0002-0547-2088. E-mail: v.krysanova@mail.ru

Ермолаева Алина Дмитриевна – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник отдела мониторинга и анализа лекарственного обеспечения ГБУ МО «Научно-практический центр клинико-экономического анализа Министерства здравоохранения Московской области», ассистент кафедры организации и экономики фармации Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9082-1010. E-mail: aluska.ru@mail.ru

Ермолаева Татьяна Николаевна – начальник отдела клинико-экономического анализа ГБУ МО «Научно-практический центр клинико-экономического анализа Министерства здравоохранения Московской области». ORCID ID: 0000-0002-3615-0292. E-mail: ermolaeva_mzmo@mail.ru

Давыдовская Мария Вафаевна – доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ГБУ МО «Научно-практический центр клинико-экономического анализа Министерства здравоохранения Московской области»; профессор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8294-0893. E-mail: mdavydovskaya@gmail.com

Кокушкин Константин Александрович – директор ГБУ МО «Научно-практический центр клинико-экономического анализа Министерства здравоохранения Московской области»; соискатель кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6758-2389. E-mail: kokushkinka@gmail.com