

ISSN 2312-7821 (Print)
ISSN 2619-1164 (Online)

БЕЗОПАСНОСТЬ И РИСК ФАРМАКОТЕРАПИИ

Safety and Risk of Pharmacotherapy

www.risksafety.ru



ГЛАВНАЯ ТЕМА:

От исследований *in vitro* к *in vivo* и клиническим исследованиям

ТОМ
VOL. 11

№
NO. 2

2023





Дорогие читатели и авторы!

Данный выпуск журнала «Безопасность и риск фармакотерапии» посвящен фундаментальным этапам создания новых лекарственных препаратов: доклиническим и клиническим исследованиям.

Доклинические исследования с использованием животных являются важным шагом перед переходом к клиническим испытаниям. Они позволяют получить представление о структуре лекарственного средства, способности его связывания с мишенями, базовые представления о фармакокинетике и различных видах токсичности. Если исследования имеют низкое качество дизайна и исполнения, это не только препятствует клиническому внедрению новых лекарственных препаратов, но и приводит к значительной трате ценных исследовательских ресурсов. В связи с этим особое внимание и время уделяется идентификации цели экспериментов и их планированию.

При организации доклинических исследований необходимо соблюдать правила по этическому обращению с животными. Принципиально важным сегодня является сокращение использования в исследованиях лабораторных животных в соответствии с концепцией 3R (замена, сокращение, улучшение – Replacement, Reduction, Refinement). При этом следует рассматривать возможность использования новых альтернативных *in vitro*, *in vivo* и *in silico* методов оценки безопасности, которые при их надлежащей валидации и одобрении регуляторными органами в ближайшем будущем могут заменить существующие стандартные методы.

Несмотря на технологический прогресс при проведении доклинических экспериментов, основой для анализа соотношения «польза–риск» при применении нового лекарственного средства по-прежнему являются клинические исследования. Действительно, хотя доклинические исследования отвечают на основные вопросы о безопасности препаратов, они не заменяют изучения способов и особенностей их взаимодействия с человеческим организмом. По мере того как разработчики планируют клиническое исследование, они обдумывают, чего они хотят достичь на каждой из различных фаз клинических исследований. Неудивительно, что более 41% фармпроизводителей считают, что на планирование необходимо затратить от 7 до 12 месяцев, а 21% – от 12 до 24 месяцев.

Новые технологии, такие как методы дистанционного мониторинга и телекоммуникация, позволяют надеяться на открытие новой страницы в клинических исследованиях – проведение децентрализованных клинических исследований, которые могут улучшить их доступность за счет переноса исследовательской деятельности в дома их участников. Неслучайно ключевые возможности децентрализованных клинических исследований признаны рядом регулирующих органов.

Повышение уровня и качества доклинических и клинических исследований неизбежно положительно отразится на эффективности и безопасности новых лекарственных препаратов и в конечном счете будет способствовать сохранению здоровья нации.

С уважением,
Ренед Николаевич АЛЮТДИН,
главный редактор журнала

Безопасность и риск фармакотерапии

Bezопасnost' i risk farmakoterapii

Рецензируемый научно-практический журнал

Основан в 1994 г.

Выходит ежеквартально (четыре раза в год)

Главный редактор

Аляутдин Ренад Николаевич, д-р мед. наук, профессор, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Редакционная коллегия

Архипов Владимир Владимирович, д-р мед. наук, доцент, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Астахова Алла Васильевна, канд. мед. наук, доцент, РУДН (Москва, Россия)

Верлан Надежда Вадимовна, д-р мед. наук, профессор, ИГМАПО – филиал РМАНПО (Иркутск, Россия)

Гавриленко Лариса Николаевна, канд. мед. наук, доцент, БГМУ (Минск, Республика Беларусь)

Драпкина Оксана Михайловна, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, НМИЦ ТПМ (Москва, Россия)

Журавлева Марина Владимировна, д-р мед. наук, профессор, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Зиганшин Айрат Усманович, д-р мед. наук, профессор, Казанский ГМУ (Казань, Россия)

Зиганшина Лилия Евгеньевна, д-р мед. наук, профессор, РМАНПО (Москва, Россия)

Зурдинова Аида Аширалиевна, д-р мед. наук, доцент, Кыргызско-Российский Славянский Университет (Бишкек, Кыргызская Республика)

Зырянов Сергей Кенсариневич, д-р мед. наук, профессор, РУДН (Москва, Россия)

Иежица Игорь Николаевич, д-р биол. наук, профессор, Международный медицинский университет (Куала-Лумпур, Малайзия)

Каспаров Сергей Ашотович, д-р мед. наук, профессор, Бристольский университет (Бристоль, Великобритания)

Колбин Алексей Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, ПСПбГМУ им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия)

Заместители главного редактора

Трапкова Алла Аркадьевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Романов Борис Константинович, д-р мед. наук, доцент, РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Вельц Наталья Юрьевна, канд. биол. наук, доцент, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Кононова Светлана Владимировна, д-р фарм. наук, доцент, ПИМУ (Нижний Новгород, Россия)

Корсун Лилия Владимировна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Крашенинников Анатолий Евгеньевич, д-р фарм. наук, доцент, РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Лазарева Наталья Борисовна, д-р мед. наук, доцент, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Лепяхин Владимир Константинович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Максимов Максим Леонидович, д-р мед. наук, доцент, Казанская ГМА – филиал РМАНПО (Казань, Россия)

Нейман Инесса, Ph.D., Пфайзер (Нью-Йорк, США)

Постников Сергей Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Москва, Россия)

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, профессор, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Солонина Анна Владимировна, д-р фарм. наук, профессор, ПГФА (Пермь, Россия)

Спасов Александр Алексеевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, ВолгГМУ (Волгоград, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, РМАНПО (Москва, Россия)

Хохлов Александр Леонидович, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, ЯГМУ (Ярославль, Россия)

Яхно Николай Николаевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Учредитель и издатель

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес учредителя и редакции

127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

Редакция

Тел.: +7(499)190-18-18 (доб. 63-34, 63-45)

e-mail: birf@expmed.ru

<https://www.risksafety.ru>

Шеф-редактор

Федотова Ольга Федоровна

Fedotovaof@expmed.ru

тел.: +7(495)121-06-00 (доб. 63-05)

Ответственный редактор

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доцент

Ответственный редактор тематического выпуска

Спасов Александр Алексеевич, академик РАН,
д-р мед. наук, профессор

Научный редактор

Смирнова Юлия Анатольевна, канд. фарм. наук

Редактор

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук

Редактор перевода

Балтина Любовь Александровна

Исполнитель

ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,
ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография

ООО «Издательство «Триада»:
170034, Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

Тираж

150 экз. Цена свободная

Подписано в печать

22.06.2023

Дата выхода в свет

28.06.2023

Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» – 57940,
в каталоге агентства «Урал-Пресс» – 57940

Журнал является уникальным изданием, информирующим специалистов в сфере охраны здоровья и фармацевтической деятельности об аспектах фармакотерапии, связанных с риском возникновения нежелательных реакций. В журнале освещаются актуальные вопросы эффективности и безопасности лекарственных препаратов, совершенствования системы фармаконадзора, разработки и оптимизации методов фармакотерапии и профилактики заболеваний у пациентов, публикуются результаты изучения механизмов действия и проявлений нежелательных реакций, актуальная информация об административных решениях зарубежных регуляторных органов об ограничении обращения лекарственных препаратов, о необходимости внесения изменений в инструкции по их медицинскому применению в связи с изменением профиля безопасности.

В журнале публикуются обзоры, оригинальные статьи, клинические наблюдения, область исследований которых соответствует медицинским отраслям науки и следующим научным специальностям: Фармакология, клиническая фармакология; Внутренние болезни, Неврология, Геронтология и гериатрия.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ – 2,149.

Журнал индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Embase, «Российский индекс цитирования» (РИНЦ), его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек Российская государственная библиотека, КиберЛенинка, ЭБС ЛАНЬ, DOAJ, WorldCat, Академия Google (Google Scholar), Base и др.

Требования к оформлению статей и порядок их предоставления размещены на сайте www.risksafety.ru

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается.

Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0.

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82932 от 14 марта 2022 г.

© Составление, оформление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2023

Safety and risk of pharmacotherapy

Bezopasnost' i risk farmakoterapii

A peer-reviewed research and practice journal

Founded in 1994

Published quarterly (four issues per year)

Editor-in-Chief

Renad N. Alyautdin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Editorial Board

Vladimir V. Arkhipov, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Alla V. Astakhova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, Russia)

Nadezhda V. Verlan, Dr. Sci. (Med.), Prof., Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Irkutsk, Russia)

Larisa N. Gavrilenko, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Republic of Belarus)

Oksana M. Drapkina, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine (Moscow, Russia)

Marina V. Zhuravleva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Airat U. Ziganshin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

Lilia E. Ziganshina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Moscow, Russia)

Aida A. Zurdinova, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Kyrgyz-Russian Slavic University (Bishkek, Kyrgyzstan)

Sergey K. Zyryanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, Russia)

Igor N. Iezhitsa, Dr. Sci. (Biol.), Prof., International Medical University (Kuala Lumpur, Malaysia)

Sergey A. Kasparov, Dr. Sci. (Med.), Prof., University of Bristol (Bristol, United Kingdom)

Alexey S. Kolbin, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (Saint Petersburg, Russia)

Svetlana V. Kononova, Dr. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof.,

Deputy Editors-in-Chief

Alla A. Trapkova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Boris K. Romanov, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Nataliya Yu. Velts, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Privolzhsky Research Medical University (Nizhny Novgorod, Russia)

Lilia V. Korsun, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Anatoly E. Krasheninnikov, Dr. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof., N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Natalia B. Lazareva, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Vladimir V. Lepakhin, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Maxim L. Maximov, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Kazan State Medical Academy – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Kazan, Russia)

Inessa Neyman, Ph.D., Pfizer, Inc. (New York, USA)

Sergey S. Postnikov, Dr. Sci. (Med.), Prof., N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Anna V. Soloninina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

Alexander A. Spasov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Dmitry A. Sychev, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Moscow, Russia)

Alexander L. Khokhlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Yaroslavl State Medical University (Yaroslavl, Russia)

Nikolay N. Yakhno, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Founder and publisher

Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation

Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Editorial office

tel.: +7(499)190-18-18 (ext. 63-34, 63-45)

e-mail: birf@expmed.ru

<https://www.risksafety.ru>

Managing Editor

Olga F. Fedotova

Fedotovaof@expmed.ru

tel.: +7(495)121-06-00 (ext. 63-05)

Executive Editor

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

Guest Editor for the Special Issue

Alexander A. Spasov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Science Editor

Yulia A. Smirnova, Science Editor, Cand. Sci. (Pharm.)

Editor

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Contract publisher

NEICON ISP LLC:

4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114

Printing company

"Triada" publishing house:

9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034

Print run

150 copies. Free price

Passed for printing

22.06.2023

Date of publication

28.06.2023

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57940

Ural-Press agency catalogue: 57940

Safety and Risk of Pharmacotherapy is a unique journal providing information to healthcare and pharmacy professionals on pharmacotherapy issues related to risks of adverse drug reactions. It covers relevant aspects of medicines' efficacy and safety, improvement of the pharmacovigilance system, development and improvement of disease prevention and treatment methods. It publishes the results of studies investigating mechanisms and manifestations of adverse drug reactions and updates the readers on the regulatory decisions to suspend, withdraw, or revoke marketing authorisations or to demand variation of patient information leaflets due to changes in the medicines' safety profiles.

The journal publishes original articles, reviews, clinical case studies related to one of the following specialist fields: Pharmacology, Clinical Pharmacology; Internal diseases, Neurology, Gerontology and geriatrics.

The journal is included in the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgement of the published research by the State Commission that grants Candidate of Science and Doctor of Science degrees.

The journal's two-year RISC impact factor is 2.149.

The journal is indexed in Russian and international abstracting and indexing databases: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Russian Index of Science Citation (RISC), with the archive included in major aggregator databases, such as Russian State Library, CyberLeninka, Lan' ELS, DOAJ, WorldCat, Google Academy (Google Scholar), Base, etc.

The requirements for the layout and submission of articles are posted on the website www.risksafety.ru

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript.

The content is licensed under Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0.

The journal is registered as mass media by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI: No. FS77-82932 dated 14 March 2022.

АВТОРИТЕТНОЕ МНЕНИЕ

Проведение фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP ЕАЭС в Российской Федерации является осознанной необходимостью
А.А. Трапкова

ГЛАВНАЯ ТЕМА: ОТ ИССЛЕДОВАНИЙ *IN VITRO* К *IN VIVO* И КЛИНИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

Оценка лекарственной гепатотоксичности *in vitro* на клеточных моделях (обзор)
И.А. Мазеркина

Выбор высокой дозы для изучения общетоксического действия новых лекарственных средств
Г.Н. Енгальчева, Р.Д. Сяубаев

Сравнительное исследование чувствительности клеточных линий HEK293 и RPTEC для оценки нефротоксического действия цефуроксима и цефепима
В.А. Евтеев, И.С. Семенова, Н.Д. Бунятыян, А.Б. Прокофьев

Производные тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов как потенциальные нейропротекторы
Н.А. Лозинская, А.А. Морозов, Д.Р. Базанов, Е.Р. Милаева, Д.А. Арешидзе, П.Н. Шевцов, Л.Н. Петрова, Е.Ф. Шевцова

Изучение безопасности и токсикокинетики препарата эзомепразол в доклинических исследованиях
В.М. Косман, М.В. Карлина, Е.В. Мазукина, А.А. Глобенко, Е.А. Джайн, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров

Изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия нового противотуберкулезного препарата тиозонид у беременных кроликов
А.Ю. Бородина, К.Л. Крышен, А.Ю. Савченко, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров

Идиосинкратическая лекарственная гепатотоксичность – от патогенеза к снижению риска
И.А. Мазеркина

Токсичность, ассоциированная с ингибиторами иммунных контрольных точек: анализ иммуноопосредованных нежелательных явлений при применении биоаналога пембролизумаба (Пемброриа)
М.Ю. Федянин, А.В. Снеговой, В.В. Бредер, Ю.Н. Линькова, А.В. Зинкина-Орихан, С.Б. Сеткина, С.Н. Фогт, В.С. Чистяков, Н.А. Кравцова

Клинико-anamnestические предикторы развития сухого кашля у пациентов с сердечно-сосудистой патологией на фоне приема эналаприла
И.В. Сычев, Н.П. Денисенко, А.А. Качанова, А.В. Лапштаева, Ш.П. Абдуллаев, Л.Н. Гончарова, К.Б. Мирзаев, Д.А. Сычев

AUTHORITATIVE OPINION

127 Conducting Pharmaceutical Inspections in the Russian Federation to Ensure Compliance with the EAEU GCP Requirements Is an Accepted Necessity
A.A. Trapkova

MAIN TOPIC: FROM *IN VITRO* EXPERIMENTS TO *IN VIVO* AND CLINICAL STUDIES

131 *In Vitro* Assessment of Drug-Induced Liver Injury Using Cell-Based Models: A Review
I.A. Mazerkina

145 High Dose Selection for General Toxicity Studies of New Medicines
G.N. Engalycheva, R.D. Syubaev

155 Susceptibility of HEK293 and RPTEC Cell Lines to Nephrotoxic Effects of Cefuroxime and Cefepime: A Comparative Study
V.A. Evteev, I.S. Semenova, N.D. Bunyatyan, A.B. Prokofiev

165 Thiuronium Salt Derivatives Based on Vicinal Diamines as Potential Neuroprotectors
N.A. Lozinskaya, A.A. Morozov, D.R. Bazanov, E.R. Milaeva, D.A. Areshidze, P.N. Shevtsov, L.N. Petrova, E.F. Shevtsova

176 Preclinical Evaluation of Esomeprazole Safety and Toxicokinetics
V.M. Kosman, M.V. Karlina, E.V. Mazukina, A.A. Globenko, E.A. Jain, M.N. Makarova, V.G. Makarov

191 A Study of Embryotoxic, Foetotoxic, and Teratogenic Effects of the Original Antituberculosis Agent Thiozonide in Pregnant Rabbits
A.Yu. Borodina, K.L. Kryshen, A.Yu. Savchenko, M.N. Makarova, V.G. Makarov

204 Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury: From Pathogenesis to Risk Reduction
I.A. Mazerkina

215 Toxicity Associated with Immune Checkpoint Inhibitors: Analysis of Immune-Related Adverse Events with a Pembrolizumab Biosimilar (Pembroria)
M.Yu. Fedyanin, A.V. Snegovoy, V.V. Breder, Yu.N. Linkova, A.V. Zinkina-Orikhan, S.B. Setkina, S.N. Fogt, V.S. Chistiakov, N.A. Kravtsova

231 Clinical Signs and Medical History as Predictors of Enalapril-Associated Dry Cough in Cardiovascular Patients
I.V. Sychev, N.P. Denisenko, A.A. Kachanova, A.V. Lapshtaeva, Sh.P. Abdullaev, L.N. Goncharova, K.B. Mirzaev, D.A. Sychev

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-127-130>

Интервью | Interview



Алла ТРАПКОВА:
«Проведение фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP ЕАЭС в Российской Федерации является осознанной необходимостью»

Alla TRAPKOVA:
“Conducting pharmaceutical inspections in the Russian Federation to ensure compliance with the EAEU GCP requirements is an accepted necessity”

РЕЗЮМЕ

Проверка соответствия субъектов фармацевтического рынка требованиям надлежащих практик является неотъемлемой частью надлежащей регуляторной практики государств – членов Евразийского экономического союза. Проведение фармацевтических инспекций на соответствие требованиям правил надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice, GCP) предусмотрено Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78.

В интервью с Аллой Аркадьевной ТРАПКОВОЙ, заместителем генерального директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, представлена информация о значении, целях и правилах проведения фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP.

Ключевые слова: правила надлежащей клинической практики; фармацевтическая инспекция; клинические исследования; регистрация препаратов; Евразийский экономический союз

Для цитирования: Трапкова А.А. Проведение фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP ЕАЭС в Российской Федерации является осознанной необходимостью. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):127–130. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-127-130>

ABSTRACT

Inspections of pharmaceutical market participants to verify their compliance with good practice requirements are integral to good regulatory practices of the Member States of the Eurasian Economic Union (EAEU). The framework for Good Clinical Practice (GCP) inspections is outlined in Decision No. 78 of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016.

This interview with Alla A. TRAPKOVA, Deputy General Director of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, provides information on the importance, objectives, and rules of conducting GCP inspections.

Key words: Good Clinical Practice; pharmaceutical inspection; clinical trials; marketing authorisation of medicinal products; Eurasian Economic Union

For citation: Trapkova A.A. Conducting pharmaceutical inspections in the Russian Federation to ensure compliance with the EAEU GCP requirements is an accepted necessity. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):127–130. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-127-130>

– Алла Аркадьевна, чем вызвана необходимость проведения фармацевтических инспекций и какие основополагающие документы регламентируют этот процесс?

Требования надлежащих практик, таких как надлежащая практика производства (Good Manufacturing Practice, GMP), надлежащая лабораторная практика (Good Laboratory Practice, GLP), надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice, GCP), надлежащая практика фармаконадзора (Good Pharmacovigilance Practice, GVP), утверждены соответствующими решениями Совета Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Проверка соответствия субъектов фармацевтического рынка требованиям надлежащих практик является неотъемлемой частью надлежащей регуляторной практики государств – членов ЕАЭС.

Проведение фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP ЕАЭС заложено в Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, утвержденных Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78. В частности, пунктом 36 Правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения предусматривается, что до подачи заявления на регистрацию лекарственного препарата заявитель проводит клинические исследования (как минимум одно исследование по усмотрению заявителя и по согласованию с уполномоченным органом) полностью или частично на территории ЕАЭС или при проведении экспертизы регистрационного досье по решению уполномоченного органа назначается внеплановая инспекция одного из клинических

центров, в которых проводилось клиническое исследование.

Таким образом, для заявителя существует возможность заменить проведение локального клинического исследования фармацевтической инспекцией на соответствие GCP ЕАЭС, которая может быть проведена как в рамках регистрации, так и в отсроченный период – 3 года после регистрации.

Основным документом, регламентирующим проведение фармацевтических инспекций, являются Правила проведения фармацевтических инспекций на соответствие одной из надлежащих практик. В настоящее время в Союзе принят ряд документов, отражающих работу фармацевтических инспекторов:

- Решение Совета ЕАЭС от 03.11.2016 № 83 «Об утверждении Правил проведения фармацевтических инспекций» (в редакции от 08.02.2021);
- Решение Совета ЕАЭС от 03.11.2016 № 91 «Об утверждении Порядка обеспечения проведения совместных фармацевтических инспекций»;
- Решение Совета ЕАЭС от 03.11.2016 № 82 «Об утверждении Общих требований к системе качества фармацевтических инспекторов государств – членов Евразийского экономического союза»;
- Решение Совета ЕАЭС от 03.11.2016 № 90 «Об утверждении Порядка формирования и ведения реестра фармацевтических инспекторов Евразийского экономического союза».

Стоит, однако, отметить, что эти документы в основном направлены на проведение фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GMP ЕАЭС. Именно поэтому разработаны

Правила проведения инспекций GVP ЕАЭС, которые в настоящее время прошли общественное обсуждение и будут направлены для утверждения экспертным комитетом ЕЭК, а также Правила проведения инспекций GCP ЕАЭС, находящиеся на рассмотрении в рабочей группе по формированию общих подходов к регулированию обращения лекарственных средств в рамках ЕАЭС.

Правила проведения инспекций GVP ЕАЭС и Правила проведения инспекций GCP ЕАЭС войдут отдельными Приложениями к Решению Совета ЕАЭС № 83.

– Кто является уполномоченным органом и руководителем фармацевтического инспектората по GCP? В чем вы видите роль ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в проведении фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP ЕАЭС?

В каждом государстве – члене ЕАЭС определяется национальный уполномоченный орган, ответственный за проведение инспекций. Постановлением Правительства Российской Федерации от 14.07.2022 № 1255 Министерство здравоохранения Российской Федерации наделено полномочиями по организации и (или) проведению инспекций клинических исследований лекарственных препаратов для медицинского применения на соответствие требованиям Правил GCP ЕАЭС, а также фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP ЕАЭС и GLP ЕАЭС в период регистрации лекарственного препарата.

Указанным постановлением одновременно внесены изменения в перечень услуг, которые являются необходимыми и обязательными для предоставления федеральными органами исполнительной власти, органами государственных внебюджетных фондов, государственными корпорациями, наделенными в соответствии с федеральными законами полномочиями по предоставлению государственных услуг в установленной сфере деятельности, и предоставляются организациями и уполномоченными в соответствии с законодательством Российской Федерации экспертами, участвующими в предоставлении государственных услуг. Перечень услуг утвержден постановлением Правительства Российской Федерации от 06.05.2011 № 352.

В настоящее время Минздравом России подготовлен проект приказа, в котором предоставление государственных услуг по проведению инспекций (проверок, фармацевтических

инспекций) при проведении доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов предусмотрено посредством наделяния ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России указанными полномочиями.

Аналогичные подходы в организации предоставления государственных услуг при обращении лекарственных средств использованы Минпромторгом России в приказе от 21.12.2015 № 4184 «Об определении федерального бюджетного учреждения «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации уполномоченным учреждением на проведение инспектирования».

– Алла Аркадьевна, не является ли проведение фармацевтических инспекций дублированием контрольно-надзорных функций?

Как сказано выше, проведение фармацевтических инспекций на соответствие требованиям GCP ЕАЭС является услугой, оказываемой в рамках проведения регистрационных процедур или в пострегистрационный период в целях подтверждения достоверности данных клинических исследований, представленных в регистрационном досье, и оценки возможных отклонений в проведении клинического исследования, способных повлиять на оценку соотношения «польза–риск» конкретного лекарственного препарата. Проведение фармацевтических инспекций носит заявительный характер и осуществляется за счет заявителя, так как конечной целью является вывод лекарственного препарата в гражданский оборот с целью получения прибыли.

Контрольно-надзорная функция направлена на проверку деятельности субъекта обращения лекарственных средств и осуществляется в соответствии с Федеральным законом от 31.07.2020 № 248-ФЗ «О государственном контроле (надзоре) и муниципальном контроле в Российской Федерации».

– Как будет осуществляться подготовка и аттестация инспекторов?

Общие требования к системе качества фармацевтических инспекторатов государств – членов ЕАЭС определены Решением Совета ЕАЭС от 03.11.2016 № 82. Соответственно, каждый инспекторат государства-члена разрабатывает систему менеджмента качества, которая определяет требования к образованию, обучению, компетентности и структуре фармацевтического инспектората.

– Каковы основные цели инспектирования на соответствие требованиям GCP EAЭС?

Цель проверки соблюдения правил надлежащей клинической практики EAЭС включает вопросы защиты прав и благополучия субъектов клинических исследований, качества и достоверности данных, получаемых в клиническом исследовании, а также этические аспекты.

В случае инспекций, связанных с регистрацией лекарственного препарата или завершёнными исследованиями, результатом инспекции являются рекомендации уполномоченному органу о том, позволяет ли качество представленных данных использовать их при оценке заявления на регистрацию лекарственного препарата с указанием выявленных несоответствий, которые могут непосредственно влиять на оценку соотношения «польза–риск» лекарственного препарата.

– По каким принципам будет осуществляться выбор организаций для инспектирования?

Основанием для рассмотрения необходимости назначения инспекции клинического исследования является оценка данных регистрационного досье лекарственного препарата с учетом возможных рисков и соблюдения условий пунктов 36–39 Правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, утвержденных Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78.

Решение о необходимости проведения внеплановой инспекции выносится уполномоченным органом (экспертной организацией) референтного государства на основании комплексной оценки соответствующих факторов, указанных в пунктах 38 и/или 39 Правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, утвержденных Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78, таких как:

- отсутствие информации об одобрении клинического исследования независимым этическим комитетом;
- выявление фактов нарушения в получении информированного согласия или информации, представляемой субъектам исследования;

- отсутствие или недостаточность в протоколе и отчете о клиническом исследовании сведений, описывающих определение показателей эффективности и (или) безопасности (относительно отбора, идентификации, обработки клинических образцов, условий количественного определения);
- выявление фактов, ставящих под сомнение достоверность сведений, представленных в регистрационном досье в отношении клинического исследования лекарственного препарата (необоснованные или неясные различия конечных точек эффективности и безопасности в протоколе и отчете клинического исследования; непоследовательность, неточность или неполнота записи данных; изменения протокола не учитываются в других документах клинического исследования; большое количество пропущенных значений, способное повлиять на статистическую мощность исследования);
- неправдоподобность или несоответствие клинических данных (противоречивые результаты по сравнению с известными результатами других исследований, низкая частота сообщений о случаях серьезных нежелательных реакций и (или) неправдоподобные данные в пользу исследуемого препарата по сравнению с результатами других исследователей или других исследований, сомнительных (неправдоподобных или противоречивых) с медико-биологической точки зрения результатов между исследованиями или между исследовательскими центрами) и др.

В любом случае решение о проведении фармацевтической инспекции должно основываться на объективных факторах.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что становление фармацевтического инспектора для проведения инспекций на соответствие требованиям GCP EAЭС в Российской Федерации является осознанной необходимостью и будет осуществлено в кратчайшие сроки после принятия соответствующих нормативных правовых документов Российской Федерации и EAЭС.

УДК 615.015.44:612.354
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-351>

Обзорная статья | Review



Оценка лекарственной гепатотоксичности *in vitro* на клеточных моделях (обзор)

И.А. Мазеркина[✉]

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Мазеркина Ирина Анатольевна mazerkina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Лекарственная гепатотоксичность составляет 15–18% от общего числа всех причин отзыва лекарственных препаратов из оборота при пострегистрационном применении. Стандартные доклинические исследования *in vivo* на лабораторных животных часто бывают нерелевантны из-за видоспецифичных различий с человеком. Перспективной альтернативой является разработка методов доклинических исследований *in vitro* на клеточных культурах.

Цель работы — обзор современных клеточных моделей для определения лекарственной гепатотоксичности *in vitro*.

Клетки, используемые для изучения механизмов гепатотоксичности *in vitro*, должны обладать специфичным метаболизмом и активностью ферментных и транспортных систем печени. Представлен обзор по основным клеточным культурам (первичные гепатоциты, бессмертные клеточные линии, гепатоцит-подобные клетки, полученные из стволовых клеток, и сокультуры из гепатоцитов и непаренхиматозных клеток) и конфигурациям клеточных систем. Продемонстрировано, что совершенствование клеточных систем происходит в направлении увеличения продолжительности жизни и функциональной сохранности клеток, усложнения конфигурации и клеточного состава с приближением к условиям *in vivo*. Установлено, что лекарственное повреждение печени может происходить вследствие образования химически активных метаболитов, развития оксидативного стресса, митохондриального повреждения, внутриклеточного накопления токсических желчных кислот при ингибировании транспортеров, активации адаптивной иммунной системы. В связи с этим для исследования лекарственной гепатотоксичности применяют различные методики, в том числе инновационные технологии (одновременного многопараметрического скрининга, транскриптомики, протеомики, метаболомики) для получения, хранения и обработки большого объема данных. Клеточные модели могут использоваться не только для выявления лекарственной гепатотоксичности, но и для изучения механизмов повреждения печени. Наиболее перспективными являются омик-технологии, создание сложных моделей с сокультивированием различных типов клеток и органы-на-чипе.

Ключевые слова: гепатотоксичность; лекарственное повреждение печени; исследования *in vitro*; клеточные культуры; клеточные модели; орган-на-чипе; омик-технологии; транскриптомика; протеомика; метаболомика; доклинические исследования

Для цитирования: Мазеркина И.А. Оценка лекарственной гепатотоксичности *in vitro* на клеточных моделях (обзор). *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):131–144. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-351>

In Vitro Assessment of Drug-Induced Liver Injury Using Cell-Based Models: A Review

I.A. Mazerkina[✉]

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Corresponding author: Irina A. Mazerkina mazerkina@expmed.ru

ABSTRACT

Drug-induced liver injury (DILI) is the reason for 15–18% of medicinal product recalls from the market. Since interspecies differences often limit the relevance of standard non-clinical tests *in vivo*, a promising alternative is to develop cell-based *in vitro* methods.

The aim of the study was to review current advances in cell modelling for the *in vitro* identification of DILI.

In vitro mechanistic studies of DILI require cells that exhibit activity specific to hepatic metabolising enzymes and transporters. This article reviews the main cell cultures (primary human hepatocytes, immortal cell lines, stem cell-derived hepatocyte-like cells, co-cultures of hepatocytes and non-parenchymal liver cells) and their configurations. The optimisation of cell systems is directed towards enhancing their viability, functionality, compositional and configurational complexity, thus bringing them closer to *in vivo* models. Potential DILI causes include chemically reactive metabolites, oxidative stress, mitochondrial damage, intracellular accumulation of toxic bile acids resulting from transporter inhibition, and adaptive immune system activation. Accordingly, DILI studies rely on various methods, including innovative technologies for acquisition, storage, and analysis of large datasets (e.g. high-content screening, transcriptomics, proteomics, and metabolomics). Cell models are applicable to both DILI identification and mechanistic studies. Currently, the most promising technologies are omics, complex co-culture models, and organ-on-a-chip systems.

Key words: hepatotoxicity; drug-induced liver injury; *in vitro* studies; cell cultures; cell models; organ-on-a-chip; omics; transcriptomics; proteomics; metabolomics; non-clinical studies

For citation: Mazerkina I.A. *In vitro* assessment of drug-induced liver injury using cell-based models: a review. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):131–144. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-351>

Введение

Лекарственная гепатотоксичность (ЛГТ) является одной из ведущих причин отзыва лекарственных препаратов из гражданского оборота на пострегистрационном этапе (15–18% от общего числа отзывов) [1]. Это не только актуальная проблема лекарственной безопасности, но и причина серьезного экономического ущерба для фармацевтической отрасли: разработка нового лекарственного средства (ЛС) занимает до 10–15 лет и в среднем обходится в 1,4 млрд долларов [2, 3].

Доклинические исследования *in vivo* имеют высокую себестоимость, при их проведении необходимо неукоснительное соблюдение принципов этики, но основным их недостатком при исследовании гепатотоксичности является несовпадение метаболизма и транспорта ЛС, связанное с межвидовыми гено- и фенотипическими различиями. Например, важнейшая

изоформа цитохрома P450 CYP3A, участвующая у человека в метаболизме до 50% ЛС, обладает неодинаковой субстратной специфичностью и выраженной вариабельностью индукции, достигающей 20–30-кратных различий у разных видов [4]. По данным разных авторов, от 38 до 51% веществ, оказывающих воздействие на печень у человека, не вызывают сходных эффектов у лабораторных животных [5]. Это стало стимулом поиска альтернативных методов доклинических тестирований, из которых наибольший интерес представляют исследования на клеточных культурах.

Клетки – первый уровень организации, на котором можно оценить нарушение взаимодействия и структуры субклеточных компонентов и определить механизмы повреждений при воздействии различных факторов. Механизм лекарственного повреждения печени может быть связан с непосредственным действием ЛС или его

метаболита, а также с накоплением токсичных веществ или желчных кислот в результате нарушения транспорта при ингибировании транспортеров [6], поэтому клетки для исследования гепатотоксичности *in vitro* должны обладать специфичным метаболизмом и активностью ферментных и транспортных систем.

Цель работы – обзор современных клеточных моделей для определения лекарственной гепатотоксичности *in vitro*.

Сверхтонкие срезы печени

Наиболее физиологически полная модель для исследования печени *in vitro* с воспроизведением ее архитектуры и сохранением всех межклеточных взаимодействий, с экспрессией генов, связанных с всасыванием, распределением, метаболизмом и выведением, – это сверхтонкие срезы печени. На сверхтонких срезах печени проводились исследования последствий ингибирования различных клеточных путей (например, митохондриальное бета-окисление) [7], лекарственного ингибирования/индукции изоферментов CYP [8], функции печеночных транспортеров [9], механизмов ЛГТ, связанных с воспалительным стрессом, и определение потенциальных биомаркеров повреждения печени [10]. Из-за сложности получения, низкой жизнеспособности и неравномерного распределения ЛС в срезах большого распространения данная методика не получила.

Клеточные культуры

Для моделирования ЛГТ используют первичные гепатоциты, бессмертные клеточные линии, гепатоцит-подобные клетки, полученные из стволовых клеток, и совместные культуры (сокультуры) из гепатоцитов и непаренхиматозных клеток (НПК) [11]. Кроме выбора клеток для получения необходимых свойств модели важен способ выращивания или конфигурация модели.

Первичные гепатоциты человека считаются «золотым стандартом» для изучения процессов в печени. Первичные гепатоциты получают из резецированных участков печени, из печеночной ткани, не подходящей для трансплантации, или приобретают в коммерческих клеточных банках. При посеве они приобретают полигональную форму и формируют плотные межклеточные контакты. Обладают такими функциональными характеристиками, как синтез альбумина, мочевины, активность цитохромов P450 и транспортеров. Основными

недостатками первичных гепатоцитов человека являются сложный путь получения, непродолжительный срок жизни и быстрая потеря функциональной активности [6].

Для удлинения срока жизни клеток предложена технология Upcyte® – трансдукция генов, вызывающих пролиферацию клеток. Модифицированные по технологии Upcyte® гепатоциты имеют улучшенную способность к пролиферации по сравнению с первичными гепатоцитами и обладают активностью ферментов 1-й и 2-й фаз биотрансформации. Также у них хорошо сохранена функция каналикулярных эффлюксных транспортеров, а при использовании в двухмерной конфигурации «сэндвич» – экспрессия полипептидных транспортеров органических анионов OATP1B1 и OATP2B1 (organic anion-transporting polypeptides, OATP), натрий таурохолат совместно транспортирующего полипептида NTCP (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide) и транспортера органических катионов OCT1 (organic cation transporters, OCT) [12].

Бессмертные клеточные линии. В отличие от первичных гепатоцитов бессмертные клеточные линии доступны, легко культивируются, обладают стабильным фенотипом и способностью неограниченно размножаться. Используются клеточные линии, полученные из гепатоцеллюлярной карциномы: HepG2, HepaRG, HuH7, Hep3B и THLE [13]. Клетки HepG2 обладают морфологией и некоторыми функциями гепатоцитов, секретируют альбумин и α-фетопроtein, но обладают низкой экспрессией и активностью метаболических ферментов и транспортеров, поэтому не могут использоваться для исследования токсичности метаболитов ЛС [14]. Контролируемую экспрессию цитохрома P450 можно получить векторной трансфекцией, однако избыточная экспрессия может также исказить результат теста. К общим недостаткам бессмертных клеточных линий относится их ограниченная метаболическая и транспортная активность [14]. Есть сообщения, что при длительном выращивании у клеток линии HuH7 проявляется активность некоторых изоферментов P430 и транспортеров, участвующих в переносе желчных кислот [15], но широкого распространения эта линия для исследования лекарственного транспорта и метаболизма не получила.

Гепатоцит-подобные клетки получают из стволовых клеток эмбриона, мезенхимальных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Специальные протоколы выращивания

позволяют получить зрелые клетки со свойствами первичных гепатоцитов: синтез мочевины, жиров, секреция альбуминов и лекарственный метаболизм [16, 17].

Совместные культуры (сокультуры). Поскольку токсическое воздействие на печень *in vivo*, как правило, затрагивает не один тип клеток, были разработаны совместные культуры (сокультуры) из нескольких типов клеток. В качестве сокультивируемых вместе с гепатоцитами используют НПК печени (синусоидальные эндотелиальные клетки, клетки Купфера, звездчатые клетки и холангиоциты), фибробласты и иммунные клетки. Было показано, что при сокультивировании с НПК фенотип первичных гепатоцитов становится ближе к таковому *in vivo* [18, 19]. Сокультуры изучены меньше, чем первичные гепатоциты, некоторые клетки, например звездчатые и синусоидальные эпителиальные клетки, плохо растут *in vitro* и теряют свои свойства через несколько дней [20]. Произвольно высеянные совместные культуры разных типов клеток могут содержать монослойные участки с неоптимальным межклеточным взаимодействием, что приводит к нестабильности и низкой функциональности, поэтому для увеличения взаимодействия клеток разработаны протоколы выращивания микроструктурированных сокультур (micropatterned co-cultures) – структурированный последовательный посев культур, например первичных гепатоцитов и НПК [21].

К сокультурам можно отнести клеточную линию НераRG – человеческие бипотентные клетки-предшественники, полученные из опухоли печени, ассоциированной с гепатитом С, которые способны развиваться в два фенотипа клеток – гепатоцит-подобные и билиарные. Клетки НераRG обладают стабильной во времени экспрессией и активностью метаболизирующих ферментов 2-й фазы и транспортеров, как у первичных гепатоцитов, и могут использоваться для исследования повторных доз ЛС. На клетках НераRG проводились исследования механизмов токсического действия ЛС, вызывающих внутрипеченочный холестаз и стеатоз, поскольку клетки НераRG обладают поляризацией, регуляцией экспрессии транспортеров, выработкой желчных кислот (ЖК) и липогенезом [22].

Недавно появился новый способ продления жизни и функционирования первичных клеток – условное репрограммирование (conditional reprogramming). Это сокультивирование первичных клеток с инактивированными фибробластами мыши 3T3-J2 в присутствии ингибитора

Rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK), что приводит к обретению первичными клетками характеристик стволовых при сохранении их способности к дифференцировке [23]. S. Su и соавт. вырастили первичные гепатоциты, взятые от пациентов с различными заболеваниями, используя метод условного репрограммирования, и получили увеличение продолжительности жизни с сохранением активности CYP и продукцией альбумина. Результаты исследования также показали, что клетки более молодых пациентов имели большую продолжительность жизни и пролиферативную активность, а экспрессия альбумина в клетках, полученных от пациентов старшего возраста, была ниже [24].

Конфигурации клеточных систем для исследования гепатотоксичности

Продолжительность жизни и функциональная активность клеток зависят от конфигурации системы. Это обусловлено тем, что *in vivo* клетки находятся в постоянном многофакторном взаимодействии непосредственно с соседними клетками, а также посредством сигнальных путей – с другими клетками и системами организма.

Двухмерные (2D) системы. 2D-система – это самая простая конфигурация, представляет собой слой клеток, высеянный на плотный субстрат, обработанный белками экстрацеллюлярного матрикса (коллаген, фибронектин или матригель). Свойства первичных клеток при посеве в монослой очень быстро угасают. Для предотвращения быстрых изменений используют конфигурацию «сэндвич», в которой плотный монослой гепатоцитов расположен между слоями коллагена или специальной прослойки. Наличие с двух сторон каркаса стабилизирует клетки, происходит поляризация клеток с образованием базолатеральной, апикальной и каналикулярной поверхностей, улучшается секреция органических соединений, активность ферментов и транспортеров, имитируется билиарная экскреция, а также удлиняется продолжительность жизни первичных гепатоцитов по сравнению с обычным монослоем. Такая конфигурация позволяет изучать гепатобилиарный транспорт ЛС, регуляцию транспортных белков, межлекарственное взаимодействие и гепатотоксичность [25–28].

Модификацией системы «сэндвич» является микроструктурированное сокультивирование. D.R. Berger и соавт. [29] предложили систему, в которой между мембранами были высеяны

островки из гепатоцит-подобных клеток в окружении фибробластов. Такая сокультура имела преимущества в плане созревания гепатоцит-подобных клеток, активности и продолжительности их функционирования по сравнению с теми же клетками, высеянными обычным методом.

Трехмерные (3D) системы. Дальнейшее совершенствование клеточных систем привело к созданию трехмерных моделей: сфероидов, систем, построенных с помощью биопечати, и органов-на-чипе.

Сфероиды — это округлые конгломераты, образующиеся из гепатоцитов, помещенных в гелевую среду при определенных условиях. Сфероиды получают из клеточных линий — производных гепатомы, первичных гепатоцитов или гепатоцит-подобных клеток, полученных из стволовых. Чтобы преодолеть некроз, развивающийся в центре сфероида из-за нарушения диффузии питательных веществ, кислорода, а также накопления ЖК при большом размере, используются методы унификации размеров сфероидов, например система «подвешенной капли» [30]. С.С. Bell и соавт. [31] провели в 6 лабораториях сравнение моделей из первичных гепатоцитов, выращенных в конфигурациях «сэндвич» и сфероид. Были получены сходные результаты между лабораториями, показавшие более длительную стабильность экспрессии белков и большую чувствительность к гепатотоксичным ЛС в сфероидах по сравнению с двухмерной культурой. R. Kostadinova и соавт. [32] создали трехмерные модели печени человека и крысы из гепатоцитов и НПК, включая эндотелиальные клетки сосудов и желчных протоков, клетки Купфера и звездчатые клетки. Архитектура и взаимодействие между разными типами клеток способствовали сохранению функции не только гепатоцитов, но и НПК до 3 месяцев (секреция альбумина, синтез мочевины, активность изоферментов СУР, транспортеров, синтез гликогена, ответ на воспалительные стимулы). Системы отличались более высокой чувствительностью к токсическим веществам по сравнению с двухмерными, что позволяло использовать дозы ЛС, близкие к терапевтическим, и проводить исследование повторных доз. Ответ на воздействие видоспецифичных гепатотоксикантов (фенофибрат — для грызунов, троглитазон — для человека) показал, что такие системы также могут использоваться для исследований видоспецифичной лекарственной токсичности. S.U. Vorrink и соавт. [33] определяли

количественное изменение АТФ на сфероидах из первичных гепатоцитов при воздействии 123 ЛС с наличием/отсутствием гепатотоксических свойств; были показаны 69% чувствительность и 100% специфичность данной модели для определения ЛГТ.

Биопечать — построение на 3D-принтере трехмерной каркасной конструкции из матрикса и клеток. I. Ide и соавт. [34] создали с помощью биопринтера сфероиды из сокультуры гепатоцитов и звездчатых клеток человека. Функциональность системы, определявшаяся по уровню АТФ, альбумина и мочевины, сохранялась более 25 суток. В работе K. Schmidt и соавт. [35] трехмерная матрица, распечатанная из дифференцированных клеток HepaRG, альгинат-желатинового гидрогеля, жидкого матригеля и среды William's E, использовалась для сравнительной оценки токсичности афлатоксина В1. Модель показала более длительное выживание и устойчивость клеток к токсину по сравнению с двухмерной системой, а также лучшее восстановление синтеза альбумина после 1 и 2 недель токсического действия.

Большая продолжительность жизни и повышенная чувствительность к токсическим веществам позволяют рекомендовать системы трехмерной конфигурации для исследования хронической гепатотоксичности [31–35].

Печень-на-чипе. Достижения микрофлюидной инженерии позволили создавать миниатюрные клеточные системы *in vitro* — органы-на-чипе. В этих чипах, или микрофизиологических печеночных системах, отделения с различными тканями могут взаимодействовать друг с другом посредством секреции молекул. Перфузия культур обеспечивает обмен питательными веществами, лучшее снабжение кислородом и напряжение сдвига потока. В системе образуются агрегации округлых клеток, сходных по строению с гепатоцитами *in vivo*, с улучшенными и поддерживаемыми специфическими функциями печени. Для микрофлюидных систем используются первичные гепатоциты, гепатоцит-подобные клетки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) и клетки HepG2 [36]. A. Rubiano и соавт. сравнивали гепатотоксические эффекты тровафлоксацина (фторхинолон) на сокультуру первичных гепатоцитов и клеток Купфера, выращенную в разных конфигурациях: «сэндвич», сфероиды и микрофизиологическая система [37]. Функциональность систем сравнивалась по активности цитохрома СУР3А4 и продукции альбумина, токсичность определялась

по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и снижению активности цитохрома. В микрофизиологической системе отмечена более высокая и длительная функциональная стабильность, а также более высокая чувствительность к токсическому действию по сравнению с другими моделями.

Полиорганные чипы. Микрофизиологические системы с клетками разных органов — это следующий шаг в моделировании, приближающий условия *in vitro* к живому организму. Комбинация органов в модели зависит от целей исследования: фармакокинетика, метаболизм, токсичность, метастазирование опухолей и др. Полиорганные системы для исследования токсичности обычно включают модель печени, поскольку многие ЛС метаболизируются печенью [38]. Т. Bricks и соавт. [39] для исследования метаболизма и транспорта фенацетина использовали систему из клеток печени HepG2 и кишечника Caco-2. С. Oleaga и соавт. [40] в системе из клеток сердца, мышц, печени и нейронов исследовали ответ на воздействие ЛС с известным токсическим потенциалом: доксирубина, аторвастатина, вальпроевой кислоты, парацетамола, N-ацетил-м-аминофенола, — и показали соответствие реакции разных типов клеток известным данным по воздействию этих веществ на органы. Основные проблемы в использовании систем орган-на-чипе — высокая стоимость и сложность масштабирования для моделирования релевантного взаимодействия между тканями.

Показатели гепатотоксичности *in vitro*

При определении повреждающего действия ЛС на печень проводят тесты *in vitro* по оценке общей цитотоксичности либо устанавливают конечные точки с учетом повреждающих механизмов: образование химически активных метаболитов и активных форм кислорода, ингибирование транспортных белков или ферментов, повреждение митохондрий, эндоплазматический ретикулярный стресс, оксидативный стресс и др.

Показатели цитотоксичности. Оценка цитотоксичности обычно используется как скрининг, позволяющий определить собственную токсичность вещества как представителя определенного класса, а также для исследования взаимосвязи химической структуры и активности/токсичности вещества. К методам оценки цитотоксичности относят простой подсчет клеток, биохимическую оценку основных клеточных процессов или продуктов, оценку целостности

мембраны как признака некроза или апоптоза, определение лизосомальной функции, клеточной морфологии, пролиферации, гепатоцеллюлярных маркеров (продукция мочевины и альбуминов, микроРНК122) [13, 41].

Цитотоксичность показывает высокую корреляцию с системной толерантностью и общей токсичностью ЛС в исследованиях на лабораторных животных [42]. Определение цитотоксичности является простым, недорогим и быстрым способом определения потенциально гепатотоксичных ЛС, но не позволяет установить молекулярные процессы при ЛГТ и не дает информации касательно непрямого идиосинкратической ЛГТ [13, 43, 44].

Образование активных метаболитов. Химически активные метаболиты образуются в печени в 1-ю фазу биотрансформации и могут стать причиной истощения гепатопротекторных механизмов, что, в свою очередь, приводит к развитию оксидативного стресса. Кроме того, ковалентно связываясь с белками, метаболиты могут вызвать их модификацию с появлением антигенных свойств, что приводит к каскаду событий с включением комплексного иммунного ответа при развитии идиосинкратической ЛГТ [44]. Химически активные метаболиты обычно определяют в тесте ковалентного связывания (количественная оценка радиоактивно меченого вещества, связавшегося с белками микросом) [45] или в тестах-ловушках, в которых используют вещества, способные утилизировать электрофильные метаболиты путем связывания с образованием аддуктов, определяемых методом масс-спектрометрии [46].

Оксидативный стресс. Оксидативный стресс развивается при дисбалансе образования активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной активности клетки. Определяется оценкой количества АФК, уровня перекисного окисления липидов, истощения глутатиона и/или активации путей стресса, например пути фактора NRF2 [47, 48].

Митохондриальная токсичность. Митохондрией производят более 90% клеточной энергии в форме АТФ и регулируют некоторые сигнальные пути, в том числе некроза и апоптоза. Для выявления митохондриальной токсичности оценивают митохондриальный мембранный потенциал, резервную емкость окислительно-фосфорилирования, активность различных комплексов электронно-транспортной цепи митохондрий, бета-окисление жирных кислот, уровень митохондриальной ДНК (мтДНК) и синтеза митохондриальных белков, митохондриальный

оксидативный стресс, изменение синтеза АТФ в глюкозо-галактозном тесте и др. [49].

Механизмы лекарственной митохондриальной токсичности разнообразны: тиазолидиндионы, например, нарушают функцию митохондрий прямым ингибированием цепи транспорта электронов, а нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) могут прервать транспорт электрона при синтезе АТФ. При этом рассеивается митохондриальный мембранный потенциал и снижается или прекращается образование АТФ. Парацетамол, доксирубицин и этанол индуцируют оксидативный стресс через окислительно-восстановительный цикл или образование АФК [50]. Прямое или не прямое ингибирование бета-окисления жирных кислот может вызвать накопление капель жира в гепатоцитах – микровезикулярный стеатоз [51]. Лекарственная митохондриальная токсичность также может быть результатом повреждающего действия некоторых ЛС на репликацию мтДНК [52] или ингибирования синтеза митохондриальных белков, например оксазолидинонами [53].

Глюкозо-галактозный тест проводят с использованием клеточной линии HepG2. В отличие от первичных гепатоцитов в клетках HepG2 АТФ образуется двумя путями: гликолизом и окислительным фосфорилированием. В глюкозо-галактозном тесте на клетках HepG2 определяют токсическое воздействие ЛС на митохондрии, сравнивая образование АТФ в богатой галактозой среде, в которой запускается путь окислительного фосфорилирования с образованием АТФ в клетках в богатой глюкозой среде, в которой преобладает гликолиз [54].

Повреждение митохондрий также оценивают по изменению митохондриального дыхания и высвобождению молочной кислоты при гликолизе. Митохондриальное дыхание оценивается по изменению скорости потребления кислорода, а гликолиз – по высвобождению молочной кислоты, которое определяется скоростью внеклеточного закисления [55]. В стресс-тестах могут измеряться другие показатели, связанные с механизмом действия, например определение резервной биоэнергетической емкости [56]. Клеточные модели с длительным сроком жизни позволяют определять нарушения репликации мтДНК или синтеза белков, кодирующихся мтДНК. S. Nadanaciva и соавт. [57] определяли нарушение синтеза белков митохондрий по соотношению комплекс IV / фратаксин методом иммунохроматографического анализа, которое уменьшается при подавлении репликации мтДНК и синтеза белка.

Несмотря на имеющиеся сведения о токсическом действии многих ЛС на функцию митохондрий *in vitro*, информации о корреляции действия митохондриальных токсикантов с изменениями *in vivo* не так много, возможно, в связи с высоким уровнем ложноположительных результатов в тестах из-за использования высоких концентраций ЛС [58].

Лекарственный холестаз. Лекарственное холестатическое повреждение печени связано с нарушением транспорта и накоплением ЖК в клетке. Высокие концентрации ЖК обладают клеточной токсичностью и морфологически вызывают гепатоцеллюлярное повреждение в отличие от классического клинического холестатического поражения вследствие нарушения оттока [59].

Транспорт ЖК регулируется АТФ-зависимыми транспортерами, в частности транспортным белком BSEP (bile salt export pump). Предполагается, что ингибирование или подавление BSEP является основным механизмом развития лекарственного холестаза [60]. Для изучения взаимодействия ЛС с BSEP определяют изменения захвата производных таурохолевой кислоты в мембранные везикулы с экспрессией BSEP при воздействии ЛС [61], однако это исследование не позволяет оценить активность метаболитов ЛС и взаимодействие с другими транспортерами. Поэтому более физиологически релевантным является исследование транспорта на культурах в конфигурации «сэндвич», в которых по клиренсу тестового субстрата определяют уровень ингибирования транспортеров, при этом наличие работающих ферментов позволяет также учитывать влияние активных метаболитов [62]. В частности, было показано, что метаболит троглитазона (препарат отозван с фармацевтического рынка из-за способности вызвать идиосинкратическую ЛГТ) является более мощным ингибитором BSEP, чем сам троглитазон [63].

Следует отметить, что данные о связи ингибирования BSEP с идиосинкратической ЛГТ получены в исследованиях *in vitro*, в которых использовались концентрации ЛС, значительно превышающие концентрации в сыворотке *in vivo*, поэтому существуют сомнения относительно их прогностической ценности. Более вероятно, что ингибирование BSEP является одним из факторов стресса, способствующих иммунообусловленному повреждению печени у пациентов с имеющейся предрасположенностью [64].

Активация иммунной системы. Адаптивной иммунной системе придается важное значение в развитии идиосинкратической ЛГТ, поэтому

продолжается разработка систем, позволяющих оценить взаимодействие клеток печени с клетками, участвующими в формировании иммунного ответа. Для исследования активации иммунной системы в ответ на действие ЛС предлагается использовать сокультуру клеток печени с эндотелиальными клетками печеночных синусов, клетками Купфера или звездчатыми клетками, поскольку известно, что они участвуют в иммунном ответе в качестве антигенпрезентирующих клеток [32, 65]. М.О. Ogeese и соавт. [66] изучали влияние на дендритные клетки надосадочной жидкости (супернатанта), полученной после воздействия гепатотоксичных ЛС на первичные гепатоциты. Результаты исследования показали, что супернатант, содержащий молекулярные фрагменты, связанные с повреждением, стимулировал секрецию дендритными клетками провоспалительных цитокинов.

Инновационные технологии

Биотехнологические инновации в исследовании ЛГТ *in vitro* включают технологии, позволяющие осуществлять получение, хранение и обработку большого количества данных (Big Data).

Одновременный многопараметрический скрининг (*high-content screening, HCS*). HCS — это комбинация автоматизированной микроскопии с анализом изображений, позволяющая одновременно оценить комплекс параметров благодаря использованию флуоресцентных зондов-красителей. HCS позволяет одновременно оценивать целый спектр показателей: от клеточной жизнеспособности, накопления активных форм кислорода или повреждения эндоплазматического ретикулума до признаков развития холестаза, стеатоза или фосфолипидоза. Для теста HCS используют первичные гепатоциты человека, клеточные линии, полученные из опухолей, или гепатоцит-подобные клетки, полученные из стволовых клеток, а также сокультивированные клеточные системы [67]. Получение разнообразной информации на уровне отдельной клетки помогает углубить представление о механизме токсического действия ЛС. Р. J. O'Brien и соавт. одними из первых применили одновременный многопараметрический скрининг на клетках HepG2, исследуя 243 ЛС с разной степенью гепатотоксичности [68]. Использовались 4 флуоресцентных красителя, позволявших оценивать площадь ядра, митохондриальный мембранный потенциал, проницаемость митохондриальной мембраны и внутриклеточную концентрацию кальция.

Определение токсического потенциала ЛС для человека показало 80% чувствительность и 90% специфичность при концентрации *in vitro*, равной 30-кратной максимальной эффективной концентрации.

Обычно HCS применяют на культурах в двумерной конфигурации (монослой или «сэндвич»), но есть опыт получения и анализа изображений для HCS в трехмерной клеточной культуре [69]. HCS используется в фармацевтической индустрии для скрининга потенциальных ЛС на предмет гепатотоксичности и показал себя мощным инструментом прогнозирования ЛГТ на ранних этапах разработки благодаря высокой чувствительности по сравнению с общепринятыми методами [70, 71].

Для улучшения прогностической силы в плане потенциальной гепатотоксичности и повышения чувствительности HCS применяют в комбинации с другими методами, такими как транскриптомика или метаболомика.

Омик-технологии. В последнее время привлекают внимание и бурно развиваются новые подходы оценки гепатотоксичности в клеточных системах *in vitro* на основании омик-технологий: транскриптомики (исследование совокупности транскриптов), протеомики (исследование совокупности белков) и метаболомики (исследование совокупности метаболитов). Омик-технологии генерируют огромное количество данных, которые отражают комплексность происходящих в биологическом объекте процессов в ответ на воздействие ЛС.

Транскриптомика. Многие клеточные процессы контролируются на уровне экспрессии генов, поэтому изменение совокупности транскриптов РНК в клетке позволяет судить об изменении экспрессии генов, то есть об активации процессов в ответ на воздействие различных веществ. Определение матричных РНК (мРНК) является инструментом прогнозирования синтеза и активности белков. Для обработки большого количества мРНК используются несколько методов: РНК-секвенирование, методы сериального и кэпового анализа экспрессии генов SAGE/CAGE (serial analysis of gene expression/cap analysis of gene expression), метод микрочипов. Метод SAGE основан на определении сотен фрагментов мРНК с последующим подсчетом специфичных фрагментов в образце. Микрочипы — фиксированные на плотном субстрате молекулы олигонуклеотидов или комплементарных ДНК, имеющие участки, способные гибридизироваться с определенными РНК, что позволяет проводить сортировку РНК

и оценку уровня их экспрессии. Тестируемые образцы предварительно окрашиваются флуорохромами, и количественная оценка проводится по интенсивности свечения с использованием флуоресцентной микроскопии. С помощью одного чипа могут определяться сотни различных генов. Существуют также высокопроизводительные секвенаторы нового поколения, позволяющие быстро секвенировать большое количество генов [72]. Профиль экспрессии генов может использоваться для сравнения фенотипа различных клеточных культур [73] или для классификации механизма действия новых экспериментальных ЛС путем сравнения с характеристиками, полученными в других исследованиях [74].

K.N. De Abrew и соавт., исследуя изменения транскриптома под влиянием препаратов с различным механизмом токсического действия, показали, что изменение транскриптома отражает специфичность механизма повреждающего действия [75]. B.R. Ware и соавт. сравнивали изменение профилей экспрессии генов первичных гепатоцитов, выращенных в микроструктурированной сокультуре с фибробластами, при воздействии гепатотоксичных и негепатотоксичных ЛС аналогичных фармакологических групп. Воздействие троглитазона и росиглитазона показало на 14 сутки инкубации различие экспрессии 628 генов по сравнению с контролем. При этом >75% транскриптов, участвующих в таких путях, как метаболизм жирных кислот и ЛС, оксидативный стресс, воспалительный ответ и коагуляционный каскад, были изменены под действием гепатотоксичного троглитазона.

Сходные изменения транскриптома были получены для других пар гепатотоксичных и негепатотоксичных аналогов [76]. Описаны модели *in vitro* для прогнозирования ЛГТ, основанные на токсигеномных данных. H.J. Cha и соавт., основываясь на изменении профилей экспрессии генов при воздействии гепатотоксичных и негепатотоксичных НПВП, использовали клетки HepG2 для создания модели прогноза гепатотоксичности на основе избранных генов, показавших максимальные изменения при токсическом воздействии. Валидация модели была проведена на 4 НПВП и показала 100% чувствительность и специфичность [77].

Протеомика. мРНК является промежуточным звеном между геном и синтезом белка, изменения транскриптома отражают реакцию на воздействие, но не всегда коррелируют с уровнем экспрессии белков. Посттрансляционная модификация белка может повлиять на его активацию, локализацию,

стабильность, взаимодействие и передачу сигналов. Протеомика, изучая совокупность белков в клетке в данный момент, дополняет данные транскриптомики в плане определения и оценки процессов, происходящих при токсическом действии. Для идентификации и количественной оценки белков используют иммунохимические методики, электрофорез, хроматографию и современные технологии с высокой пропускной способностью: микрочипы и масс-спектрометрию [78, 79]. M. Alvergnas и соавт., изучая изменение протеома первичных гепатоцитов человека при воздействии гепатотоксичного препарата безафибрат, определили изменение экспрессии белков, участвующих в печеночном канцерогенезе и воспалительном ответе, при этом дополнительное воздействие предшественника глутатиона N-ацетилцистеина модифицировало набор белков, регулируемых безафибратом [80].

Метаболомика. Метаболомика изучает биохимический профиль организма на уровне малых молекул: промежуточных и конечных продуктов обмена веществ, гормонов, сигнальных молекул. Метаболизм – нижний уровень биомолекулярной организации системы, его динамика может меняться при минимальном воздействии, и данные, отражающие эти изменения, еще больше детализируют механизм токсического действия и ответную реакцию организма [81]. Для определения метаболитов используют комбинацию хроматографических методов с масс-спектрометрией либо ядерный магнитный резонанс [82]. Идентификация метаболитов проводится на основании данных собственных или общедоступных баз данных по метаболомике.

A. Ruiz-Arascama и соавт. [83], исследуя на клетках HepG2 изменение метаболома *in vitro* в ответ на гепатотоксичный 2,3,7,8-тетрахлордифендиоксин, показали соответствие метаболитических изменений данным ранее проведенных исследований *in vivo* и *in vitro*. E. Krajnc и соавт. [84] при исследовании метаболома на клетках HuH7 и первичных гепатоцитах мышей определили, что гепатотоксичный антидепрессант нефазодон нарушал глюконеогенез, анаэробный гликолиз и окислительное фосфорилирование, что указывало на наличие нескольких путей подавляющего действия ЛС на синтез АТФ.

Комбинирование метаболомики с другими омик-технологиями позволяет в еще большей степени детализировать пути и механизмы, активирующиеся в ответ на токсическое воздействие. R.M. Rodrigues и соавт. [85] использовали транскриптомику и метаболомику для оценки

холестатической токсичности бозентана на клетках HepaRG и определили генные изменения, связанные с активацией рецептора ядерного фанезоида X, и метаболические изменения, указывающие на митохондриальное повреждение.

Информация по токсической активности различных веществ, влиянию на геном, транскриптом, метаболом, получаемая из разных лабораторий, собирается в общедоступных базах данных — MetabolomeXchange¹, Human Metabolome Database², GenomeNet³, NCBI⁴, Protein Information Resource (PIR)⁵ и др.

Рекомендации регуляторных органов по доклиническим исследованиям гепатотоксичности

Согласно руководству Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) по доклиническим исследованиям лекарственно-индуцированной гепатотоксичности (редакция 2010 г.)⁶ исследования *in vitro* рекомендуется проводить как дополнительные для уточнения механизма после выявления сигналов о гепатотоксичности ЛС *in vivo* на лабораторных животных или в дозарегистрционных клинических испытаниях. В последней редакции отмечена значимость показателей ответа на клеточный стресс, данных многопараметрического исследования клеток, изменений экспрессии генов и белков, а также биомаркеров клеточного повреждения или восстановления. В то же время эти методики не стандартизированы, имеют различный экспериментальный дизайн и не валидированы в плане чувствительности и/или специфичности для прогноза клинической безопасности. Также отмечена перспективность интегрированного анализа данных омик-технологий.

Отсутствие более позднего обновления рекомендаций, возможно, обусловлено наличием нескольких нерешенных вопросов, связанных с исследованиями *in vitro*. Это проблема валидации и стандартизации методик, поскольку существует большой разброс данных между лабораториями. Другое затруднение состоит в том, что большинство клеточных систем подходят для скрининга дозозависимой токсичности, то есть эффективно выявляют прямую

гепатотоксичность, но не отражают межлекарственные взаимодействия и индивидуальные особенности человека. Также сохраняется проблема количественного переноса результатов тестов *in vitro* на условия *in vivo*.

Заключение

За последние десятилетия достигнут значительный прогресс в разработке клеточных моделей для исследования ЛГТ *in vitro*. Клеточные культуры совершенствуются в направлениях увеличения продолжительности жизни и сохранности функций, повышения экспрессии ферментов и транспортеров, усложнения конфигураций систем с имитацией канальцев и возможности сокультивирования паренхиматозных и непаренхиматозных клеток.

Использование современных клеточных моделей позволяет не только выявлять токсичность, но также изучать механизмы цитотоксичности, митохондриальной токсичности, нарушения обмена желчных кислот, клеточного стресса и других процессов повреждения печени. Сделаны шаги в плане создания сложных клеточных систем для изучения иммунных сигналов и путей, которым отводится большая роль в патогенезе идиосинкратической ЛГТ.

Широкое внедрение одновременного многопараметрического скрининга (HCS) для изучения ЛГТ позволило быстро и производительно обрабатывать большие объемы данных. Высокая технологичность омик-технологий открывает большие возможности в плане стандартизации методик, что позволит получать сопоставимые данные в разных лабораториях и более конкретно трактовать полученные результаты. Перспективными направлениями моделей для исследований *in vitro* представляются создание сложных систем сокультивирования и органов-на-чипе, максимально приближающих условия к таковым *in vivo*, а также создание моделей *in silico*.

Увеличение количества и разнообразия получаемой в тестах *in vitro* информации и наличие инструментов для ее обработки представляются предвестниками если не прорыва, то существенного шага вперед в плане детализации механизмов и определения релевантных биомаркеров для доклинической диагностики гепатотоксичности.

¹ <http://www.metabolomexchange.org>

² <https://hmdb.ca>

³ <https://www.genome.jp>

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁵ <https://proteininformationresource.org>

⁶ Reflection paper on non-clinical evaluation of drug-induced liver injury (DILI). EMEA/CHMP/SWP/150115/2006. EMA; 2010.

Литература / References

- Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med.* 2016;4(14):10. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0553-2>
- Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009–2018. *JAMA.* 2020;323(9):844–53. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>
- DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. *J Health Econ.* 2016;47:20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
- Sakai C, Iwano S, Yamazaki Y, Ando A, Nakane F, Kouno M, et al. Species differences in the pharmacokinetic parameters of cytochrome P450 probe substrates between experimental animals, such as mice, rats, dogs, monkeys, and microminipigs, and humans. *Drug Metab Toxicol.* 2014;5:6. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000173>
- Spanhaak S, Cook D, Barnes J, Reynolds J. Species concordance for liver injury. In: *Safety Intelligence Program Board.* Cambridge, UK: BioWisdom, Ltd; 2008.
- Hewitt NJ, Gómez Lechón MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev.* 2007;39(1):159–234. <https://doi.org/10.1080/03602530601093489>
- Vickers AE, Bentley P, Fisher RL. Consequences of mitochondrial injury induced by pharmaceutical fatty acid oxidation inhibitors is characterized in human and rat liver slices. *Toxicol In Vitro.* 2006;20(7):1173–82. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.021>
- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR, Lake BG. Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(3):282–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.3.282>
- Starokozhko V, Vatakuti S, Schievink B, Merema MT, Asplund A, Synnergren J, et al. Maintenance of drug metabolism and transport functions in human precision-cut liver slices during prolonged incubation for 5 days. *Arch Toxicol.* 2017;91(5):2079–92. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1865-x>
- Hadi M, Westra IM, Starokozhko V, Dragovic S, Merema MT, Groothuis GM. Human precision-cut liver slices as an *ex vivo* model to study idiosyncratic drug-induced liver injury. *Chem Res Toxicol.* 2013;26(5):710–20. <https://doi.org/10.1021/tx300519p>
- Khetani SR, Kanchagar C, Ukairo O, Krzyzewski S, Moore A, Shi J, et al. Use of micropatterned cocultures to detect compounds that cause drug-induced liver injury in humans. *Toxicol Sci.* 2013;132(1):107–17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs326>
- Burkard A, Dähn C, Heinz S, Zutavern A, Sonntag-Buck V, Maltman D, et al. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica.* 2012;42(10):939–56. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.675093>
- Segovia-Zafra A, Di Zeo-Sánchez DE, López-Gómez C, Pérez-Valdés Z, García-Fuentes E, Andrade RJ, et al. Preclinical models of idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): moving towards prediction. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(12):3685–726. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.013>
- Sison-Young RL, Mitsa D, Jenkins RE, Mottram D, Alexandre E, Richert L, et al. Comparative proteomic characterization of 4 human liver-derived single cell culture models reveals significant variation in the capacity for drug disposition, bioactivation, and detoxication. *Toxicol Sci.* 2015;147(2):412–24. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv136>
- Saran C, Fu D, Ho H, Klein A, Fallon JK, Honkakoski P, et al. A novel differentiated HuH-7 cell model to examine bile acid metabolism, transport and cholestatic hepatotoxicity. *Sci Rep.* 2022;12(1):14333. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18174-z>
- Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnol Adv.* 2014;32(2):504–13. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.01.003>
- Imagawa K, Takayama K, Isoyama S, Tanikawa K, Shinkai M, Harada K, et al. Generation of a bile salt export pump deficiency model using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Sci Rep.* 2017;7:41806. <https://doi.org/10.1038/srep41806>
- Nguyen TV, Ukairo O, Khetani SR, McVay M, Kanchagar C, Seghezzi W, et al. Establishment of a hepatocyte-Kupffer cell coculture model for assessment of proinflammatory cytokine effects on metabolizing enzymes and drug transporters. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(5):774–85. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.061317>
- Baze A, Parmentier C, Hendriks DFG, Hurrell T, Heyd B, Bachellier P, et al. Three-dimensional spheroid primary human hepatocytes in monoculture and coculture with nonparenchymal cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2018;24(9):534–45. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2018.0134>
- Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MD, Georges PC, Sackey B, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(1):110–8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2010>
- Khetani SR, Berger DR, Ballinger KR, Davidson MD, Lin C, Ware BR. Microengineered liver tissues for drug testing. *J Lab Autom.* 2015;20(3):216–50. <https://doi.org/10.1177/2211068214566939>
- Yokoyama Y, Sasaki Y, Terasaki N, Kawataki T, Takekawa K, Iwase Y, et al. Comparison of drug metabolism and its related hepatotoxic effects in HepaRG, cryopreserved human hepatocytes, and HepG2 cell cultures. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(5):722–32. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00913>
- Wu X, Wang S, Li M, Li J, Shen J, Zhao Y, et al. Conditional reprogramming: next generation cell culture. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10(8):1360–81. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.011>

24. Su S, Di Poto C, Roy R, Liu X, Cui W, Kroemer A, Res-som HW. Long-term culture and characterization of patient-derived primary hepatocytes using conditional reprogramming. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(11):857–64.
<https://doi.org/10.1177/1535370219855398>
25. De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolaï J, Augustijns P, et al. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for *in vitro* exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(5):589–616.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2013.773973>
26. Yanni SB, Augustijns PF, Benjamin DK Jr, Brouwer KL, Thakker DR, Annaert PP. *In vitro* investigation of the hepatobiliary disposition mechanisms of the antifungal agent micafungin in humans and rats. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(10):1848–56.
<https://doi.org/10.1124/dmd.110.033811>
27. Matsunaga N, Suzuki K, Nakanishi T, Ogawa M, Imawaka H, Tamai I. Modeling approach for multiple transporters-mediated drug-drug interactions in sandwich-cultured human hepatocytes: effect of cyclosporin A on hepatic disposition of mycophenolic acid phenyl-glucuronide. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2015;30(2):142–8.
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.10.006>
28. Fu D, Cardona P, Ho H, Watkins PB, Brouwer KLR. Novel mechanisms of valproate hepatotoxicity: impaired Mrp2 trafficking and hepatocyte depolarization. *Toxicol Sci*. 2019;171(2):431–42.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz154>
29. Berger DR, Ware BR, Davidson MD, Allsup SR, Khetani SR. Enhancing the functional maturity of induced pluripotent stem cell-derived human hepatocytes by controlled presentation of cell-cell interactions *in vitro*. *Hepatology*. 2015;61(4):1370–81.
<https://doi.org/10.1002/hep.27621>
30. Takahashi Y, Hori Y, Yamamoto T, Urashima T, Ohara Y, Tanaka H. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Biosci Rep*. 2015;35(3):e00208.
<https://doi.org/10.1042/BSR20150034>
31. Bell CC, Dankers ACA, Lauschke VM, Sison-Young R, Jenkins R, Rowe C, et al. Comparison of hepatic 2D sandwich cultures and 3D spheroids for long-term toxicity applications: a multicenter study. *Toxicol Sci*. 2018;162(2):655–66.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx289>
32. Kostadinova R, Boess F, Applegate D, Suter L, Weiser T, Singer T, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;268(1):1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.012>
33. Vorrink SU, Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Prediction of drug-induced hepatotoxicity using long-term stable primary hepatic 3D spheroid cultures in chemically defined conditions. *Toxicol Sci*. 2018;163(2):655–65.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy058>
34. Ide I, Nagao E, Kajiyama S, Mizoguchi N. A novel evaluation method for determining drug-induced hepatotoxicity using 3D bio-printed human liver tissue. *Toxicol Mech Methods*. 2020;30(3):189–96.
<https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1686795>
35. Schmidt K, Berg J, Roehrs V, Kurreck J, Al-Zeer MA. 3D-bioprinted HepaRG cultures as a model for testing long term aflatoxin B1 toxicity *in vitro*. *Toxicol Rep*. 2020;7:1578–87.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.11.003>
36. Deng J, Wei W, Chen Z, Lin B, Zhao W, Luo Y, et al. Engineered liver-on-a-chip platform to mimic liver functions and its biomedical applications: a review. *Micromachines (Basel)*. 2019;10(10):676.
<https://doi.org/10.3390/mi10100676>
37. Rubiano A, Indapurkar A, Yokosawa R, Miedzki A, Rosenzweig B, Arefin A, et al. Characterizing the reproducibility in using a liver microphysiological system for assaying drug toxicity, metabolism, and accumulation. *Clin Transl Sci*. 2021;14(3):1049–61.
<https://doi.org/10.1111/cts.12969>
38. Picollet-D'hahan N, Zuchowska A, Ilemeunier I, Le Gac S. Multiorgan-on-a-chip: a systemic approach to model and decipher inter-organ communication. *Trends in Biotechnology*. 2021;39(8):788–810.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.014>
39. Bricks T, Paullier P, Legendre A, Fleury MJ, Zeller P, Merlier F, et al. Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol Vitro*. 2014;28(5):885–95.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.02.005>
40. Oleaga C, Bernabini C, Smith AS, Srinivasan B, Jackson M, McLamb W, et al. Multi-organ toxicity demonstration in a functional human *in vitro* system composed of four organs. *Sci Rep*. 2016;6(1):20030.
<https://doi.org/10.1038/srep20030>
41. Weaver RJ, Betts C, Blomme EAG, Gerets HHH, Gjervig Jensen K, Hewitt PG, et al. Test systems in drug discovery for hazard identification and risk assessment of human drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13(7):767–82.
<https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1341489>
42. Benbow JW, Aubrecht J, Banker MJ, Nettleton D, Aleo MD. Predicting safety toleration of pharmaceutical chemical leads: cytotoxicity correlations to exploratory toxicity studies. *Toxicol Lett*. 2010;197(3):175–82.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.05.016>
43. Roth AD, Lee MY. Idiosyncratic drug-induced liver injury (IDILI): potential mechanisms and predictive assays. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9176937.
<https://doi.org/10.1155/2017/9176937>
44. Jee A, Sernoskie SC, Uetrecht J. Idiosyncratic drug-induced liver injury: mechanistic and clinical challenges. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):2954.
<https://doi.org/10.3390/ijms22062954>
45. Devi SS, Palkar PS, Mehendale HM. Measuring covalent binding in hepatotoxicity. *Curr Protoc Toxicol*. 2007;14:Unit14.6.
<https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1406s32>
46. Wang Q, Liu H, Slavsky M, Fitzgerald M, Lu C, O'Shea T. A high-throughput glutathione trapping assay with combined high sensitivity and specificity in high-resolution mass spectrometry by applying product ion extraction and data-dependent neutral loss. *J Mass Spectrom*. 2019;54(2):158–66.
<https://doi.org/10.1002/jms.4320>
47. Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress and acute hepatic injury. *Curr Opin Toxicol*. 2018;7:17–21.
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.011>
48. Chen S, Zhang Z, Qing T, Ren Z, Yu D, Couch L, Ning B,

- Mei N, Shi L, Tolleson WH, Guo L. Activation of the Nrf2 signaling pathway in usnic acid-induced toxicity in HepG2 cells. *Arch Toxicol.* 2017;91(3):1293–307. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1775-y>
49. Mihajlovic M, Vinken M. Mitochondria as the target of hepatotoxicity and drug-induced liver injury: molecular mechanisms and detection methods. *Int J Mol Sci.* 2022;23:3315. <https://doi.org/10.3390/ijms23063315>
 50. Nadanaciva S, Will Y. The role of mitochondrial dysfunction and drug safety. *IDrugs.* 2009;12(11):706–10. PMID: 19844857
 51. Begriche K, Massart J, Robin M, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol.* 2011;54(14):773–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.006>
 52. Fromenty B. Alteration of mitochondrial DNA homeostasis in drug-induced liver injury. *Food Chem Toxicol.* 2020;135:110916. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110916>
 53. McKee E, Ferguson M, Bentley A, Marks T. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2006;50(16):2042–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01411-05>
 54. Kamalian L, Douglas O, Jolly CE, Snoeys J, Simic D, Monshouwer M, et al. Acute metabolic switch assay using glucose/galactose medium in HepaRG cells to detect mitochondrial toxicity. *Curr Protoc Toxicol.* 2019;80(1):76. <https://doi.org/10.1002/cptx.76>
 55. Nadanaciva S, Willis J, Barker M, Gharaibeh D, Capaldi R, Marusich M, et al. Assessment of drug-induced mitochondrial dysfunction via altered cellular respiration and acidification measured in a 96-well platform. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(14):421–37. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9446-z>
 56. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J.* 2020;34(10):13106–24. <https://doi.org/10.1096/fj.202000767R>
 57. Nadanaciva S, Willis JH, Barker ML, Gharaibeh D, Capaldi RA, Marusich MF, et al. Lateral-flow immunoassay for detecting drug-induced inhibition of mitochondrial DNA replication and mtDNA-encoded protein synthesis. *J Immunol Methods.* 2009;343(1):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.12.002>
 58. Porceddu M, Buron N, Rustin P, Fromenty B, Borgne-Sanchez A. In vitro assessment of mitochondrial toxicity to predict drug-induced liver injury. In: Chen M, Will Y, eds. *Drug-induced liver toxicity.* New York: Springer New York; 2018. P. 283–300. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7677-5_14
 59. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009;15(14):1677–89. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1677>
 60. Garzel B, Yang H, Zhang L, Huang SM, Polli JE, Wang H. The role of bile salt export pump gene repression in drug-induced cholestatic liver toxicity. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(3):318–22. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054189>
 61. Stieger B, Mahdi ZM. Model systems for studying the role of canalicular efflux transporters in drug-induced cholestatic liver disease. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2295–301. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.023>
 62. Schaefer M, Morinaga G, Matsui A, Schänzle G, Bischoff D, Süssmuth RD. Quantitative expression of hepatobiliary transporters and functional uptake of substrates in hepatic two-dimensional sandwich cultures: a comparative evaluation of upcyte and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(2):166–77. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.078238>
 63. Funk C, Pantze M, Jehle L, Ponelle C, Scheuermann G, Lazendic M, et al. Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology.* 2001;167(1):83–98. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00460-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00460-7)
 64. Chan R, Benet LZ. Measures of BSEP inhibition *in vitro* are not useful predictors of DILI. *Toxicol Sci.* 2018;162(2):499–508. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx284>
 65. LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol.* 2012;42(6):501–48. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.682115>
 66. Ogese MO, Faulkner L, Jenkins RE, French NS, Copple IM, Antoine DJ, et al. Characterization of drug-specific signaling between primary human hepatocytes and immune cells. *Toxicol Sci.* 2017;158(1):76–89. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx069>
 67. Persson M. High content screening for prediction of human drug-induced liver injury. In: Chen M, Will Y, eds. *Drug-induced liver toxicity.* New York: Springer New York; 2018. P. 331–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7677-5_16
 68. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol.* 2006;80(9):580–604. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0091-3>
 69. Hong S, Song JM. A 3D cell printing-fabricated HepG2 liver spheroid model for high-content *in situ* quantification of drug-induced liver toxicity. *Biomater Sci.* 2021;9(17):5939–50. <https://doi.org/10.1039/d1bm00749a>
 70. Donato M, Tolosa L. High-content screening for the detection of drug-induced oxidative stress in liver cells. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(1):106. <https://doi.org/10.3390/antiox10010106>
 71. Kozak K, Rinn B, Leven O, Emmenlauer M. Strategies and solutions to maintain and retain data from high content imaging, analysis, and screening assays. *Methods Mol Biol.* 2018;1683:131–48. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6_9
 72. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(5):1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>

73. Gupta R, Schrooders Y, Hauser D, van Herwijnen M, Albrecht W, Ter Braak B, et al. Comparing *in vitro* human liver models to *in vivo* human liver using RNA-Seq. *Arch Toxicol*. 2021;95(2):573–89. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02937-6>
74. Russo MW, Steuerwald N, Norton HJ, Anderson WE, Foureau D, Chalasani N, et al. Profiles of miRNAs in serum in severe acute drug induced liver injury and their prognostic significance. *Liver Int*. 2017;37(5):757–64. <https://doi.org/10.1111/liv.13312>
75. De Abrew KN, Overmann GJ, Adams RL, Tiesman JP, Dunavent J, Shan YK, Carr GJ, et al. A novel transcriptomics based *in vitro* method to compare and predict hepatotoxicity based on mode of action. *Toxicology*. 2015;328:29–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.008>
76. Ware BR, McVay M, Sunada WY, Khetani SR. Exploring chronic drug effects on microengineered human liver cultures using global gene expression profiling. *Toxicol Sci*. 2017;157(2):387–98. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx059>
77. Cha HJ, Ko MJ, Ahn SM, Ahn JI, Shin HJ, Jeong HS, et al. Identification of classifier genes for hepatotoxicity prediction in non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Mol Cell Toxicol*. 2010;6:247–53. <https://doi.org/10.1007/s13273-010-0034-1>
78. Ölander M, Wiśniewski JR, Artursson P. Cell-type-resolved proteomic analysis of the human liver. *Liver Int*. 2020;40(7):1770–80. <https://doi.org/10.1111/liv.14452>
79. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016;537(7620):347–55. <https://doi.org/10.1038/nature19949>
80. Alvergnas M, Rouleau A, Lucchi G, Heyd B, Ducoroy P, Richert L, et al. Proteomic mapping of bezafibrate-treated human hepatocytes in primary culture using two-dimensional liquid chromatography. *Toxicol Lett*. 2011;201(2):123–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.015>
81. Ramirez T, Daneshian M, Kamp H, Bois FY, Clench MR, Coen M et al. Metabolomics in toxicology and pre-clinical research. *ALTEX*. 2013;30(2):209–25. <https://doi.org/10.14573/altex.2013.2.209>
82. Cuykx M, Rodrigues RM, Laukens K, Vanhaecke T, Covaci A. *In vitro* assessment of hepatotoxicity by metabolomics: a review. *Arch Toxicol*. 2018;92(10):3007–29. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2286-9>
83. Ruiz-Aracama A, Peijnenburg A, Kleinjans J, Jennen D, van Delft J, Hellfrisch C, et al. An untargeted multi-technique metabolomics approach to studying intracellular metabolites of HepG2 cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *BMC Genomics*. 2011;12:251. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-251>
84. Krajnc E, Visentin M, Gai Z, Stieger B, Samodelov SL, Häusler S, Kullak-Ublick GA. Untargeted metabolomics reveals anaerobic glycolysis as a novel target of the hepatotoxic antidepressant nefazodone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;375(2):239–46. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000120>
85. Rodrigues RM, Kollipara L, Chaudhari U, Sachinidis A, Zahedi RP, Sickmann A, et al. Omics-based responses induced by bosentan in human hepatoma HepaRG cell cultures. *Arch Toxicol*. 2018;92(6):1939–52. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2214-z>

Вклад авторов. Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям ICMJE.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400082-4).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. The author confirms that she meets the ICMJE criteria for authorship.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400082-4).

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

Мазеркина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>
mazerkina@expmed.ru

Поступила 20.12.2022

После доработки 20.02.2023

Принята к публикации 10.03.2023

Online first 19.04.2023

Irina A. Mazerkina, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>
mazerkina@expmed.ru

Received 20 December 2022

Revised 20 February 2023

Accepted 10 March 2023

Online first 19 April 2023

УДК 615.015:57.084

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-145-154>

Научно-методическая статья | Scientific methodology article



Выбор высокой дозы для изучения общетоксического действия новых лекарственных средств

Г.Н. Енгальчева[✉], Р.Д. Сюбаев

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Енгальчева Галина Нинелевна engalycheva@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Выбор высокой дозы является ключевым элементом методологии изучения общетоксического действия лекарственных средств, от которого зависят информативность результатов, соблюдение принципов этического рационального использования экспериментальных животных и корректность прогноза безопасности применения нового лекарственного средства у человека. Согласно данным литературы и опыту экспертной оценки результатов доклинических исследований, неправильный выбор высокой дозы является весьма распространенной ошибкой планирования токсикологических исследований, которая значительно сокращает или полностью лишает их информативности и не позволяет использовать для оценки безопасности применения нового лекарственного средства у человека.

Цель работы: анализ актуальных регуляторных требований по выбору высокой дозы для исследований общетоксического действия лекарственных средств.

Проведенный анализ позволил предположить, что возможной причиной необоснованного выбора высокой дозы в токсикологических исследованиях является неоднозначность интерпретации методических рекомендаций в случае отсутствия в них конкретного указания на нормирование предела верхней границы исследуемых токсических доз или достаточной определенности критериев выбора дозы. Соблюдение требований регуляторной токсикологии в отношении выбора доз и применение обоснованного алгоритма принятия решений являются необходимыми условиями корректного планирования доклинических исследований безопасности новых лекарственных средств.

Ключевые слова: доклинические исследования; выбор высокой дозы; безопасность лекарственных средств; общетоксическое действие

Для цитирования: Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д. Выбор высокой дозы для изучения общетоксического действия новых лекарственных средств. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):145–154. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-145-154>

High Dose Selection for General Toxicity Studies of New Medicines

G.N. Engalycheva[✉], R.D. Syubaev

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Galina N. Engalycheva** engalycheva@expmed.ru

ABSTRACT

High dose selection is a key methodological element in general toxicity studies of medicines. It determines the informative value of study results, the compliance with the principles of ethical and rational use of experimental animals, and the accuracy of predicting the safety of new medicines for human use. The literature data and the regulatory experience in evaluating preclinical study results suggest that the selection of an inappropriate high dose is a very common error in planning toxicity studies. This error leads to a significant or complete loss of the informative value of study results; the results become useless for assessing the safety of new medicinal products for human use.

The aim of this study was to analyse the current regulatory requirements for high dose selection for general toxicity studies of medicines.

The analysis suggests that unreasonably high doses may be selected for toxicity studies because methodological recommendations are prone to interpretation errors. Their potential for ambiguity stems from the absence of specific standardised upper limits for toxic doses or sufficiently clear dose selection criteria. Prerequisites for properly planning preclinical safety studies of new medicines include compliance with dose selection requirements of regulatory toxicology and implementation of a clinically and toxicologically sound decision-making algorithm.

Key words: preclinical studies; high dose selection; drug safety; general toxicity

For citation: Engalycheva G.N., Syubaev R.D. High dose selection for general toxicity studies of new medicines. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):145–154. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-145-154>

Введение

Одним из ключевых элементов методологии доклинических исследований безопасности лекарственных средств (ЛС) является выбор высокой дозы (ВД) для исследований общей токсичности¹, от которого зависит корректность и информативность полученных результатов и, в конечном счете, корректность прогноза безопасности для первого применения ЛС у человека. Несмотря на кажущийся рутинный характер выбора доз, неправильно подобранная доза часто является причиной проведения бесполезных неэтичных или избыточных исследований, возникновения проблем при определении диапазона безопасных доз и оценке потенциальных токсических эффектов.

Оценка безопасности нового лекарственного средства-кандидата — это итеративный динамический процесс с непрерывной обратной связью между доклиническими и клиническими исследо-

ваниями. Первоначальная доклиническая оценка безопасности ЛС дополняется доклиническими и клиническими данными, а оценка безопасности ЛС для человека становится более взвешенной в ходе клинической разработки [1, 2].

Подходы к определению величины эквивалентной дозы для человека подробно обсуждаются в статье Е.В. Шекуновой и соавт. [3]. Однако, прежде чем приступить к экстраполяции полученных токсических и нетоксических доз от животных на человека, необходима уверенность, что проведенные исследования являлись достаточными для выявления токсических эффектов ЛС.

Цель работы — анализ регуляторных требований по выбору высокой дозы для исследований общетоксического действия лекарственных средств.

В настоящей статье рассмотрены методические рекомендации, относящиеся к разработке новых ЛС, представляющих собой малые

¹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

молекулы, поскольку методология доклинических исследований высокомолекулярных соединений, вследствие специфичности их биологических свойств и фармакологического действия, требует иных подходов и применения специальных рекомендаций. Актуальность обсуждаемого вопроса подтверждает опыт экспертизы доклинических исследований безопасности ЛС, проводимой в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, а также научные публикации [1, 4].

Основная часть

В соответствии с регуляторными требованиями и методическими рекомендациями² стандартные доклинические исследования безопасности ЛС проводятся *in vivo* в сочетании с исследованиями токсикокинетики или *in vitro* и включают исследования фармакологической безопасности, общетоксического действия при однократном и повторном введении, генотоксичности, канцерогенности, репродуктивной токсичности, местной переносимости, а также специфические исследования, выполняемые при необходимости (иммунотоксичность, иммуногенность, фототоксичность, гематологическая совместимость, общетоксическое действие на неполовозрелых животных и др.). Доклинические исследования безопасности (токсикологические исследования и исследования фармакологической безопасности) проводятся строго в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) для гарантированного обеспечения максимальной достоверности и воспроизводимости результатов. Целью исследований токсичности при повторном введении является выявление токсического влияния ЛС на органы-мишени, зависимости «доза–эффект», обратимости эффектов, связи токсических эффектов с системной экспозицией.

Исследования общетоксического действия в сочетании с исследованиями токсикокинетики являются базовыми, по результатам которых оценивают безопасность первого применения ЛС у человека. Эти исследования позволяют оценить потенциальные мишени токсического действия нового ЛС для клинического мониторинга потенциальных нежелательных явлений,

характер и динамику токсических эффектов, уровень токсических доз, диапазон нетоксических доз, определить безопасную стартовую дозу для первого применения ЛС у человека³.

Спектр биологических реакций, охватывающий ряд возрастающих доз, показан на *рисунке 1* [5]. Для выбора ВД используют диапазон, включающий дозы, оказывающие минимальное (Lowest Observed Effect Level, LOEL), умеренное (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL) или выраженное токсическое действие (Frank Effect Level, FEL). Основные принципы токсикологии указывают на то, что выбранная доза в краткосрочных токсикологических исследованиях должна быть выше, чем в долгосрочных исследованиях [1, 2]. Вместе с тем по мере накопления информации о переносимости ЛС и клинического подтверждения его перспективности становится оправданным повышение ВД малотоксичных ЛС до уровня максимальной переносимой (МПД; maximum tolerable dose, MTD) или максимальной достижимой дозы (МДД; maximum feasible dose, MFD). В этом случае использование допустимого максимального уровня ВД не рассматривается как избыточное и, напротив, свидетельствует о полноценности доклинической характеристики безопасности нового ЛС.

Общие токсические свойства изучают при однократном и повторных введениях. В исследованиях острой токсичности получают токсикометрические параметры летальных (LD_{50}) и максимальных переносимых доз (МПД), устанавливают причины гибели животных и оценивают характер и динамику симптомов интоксикации.

В методических документах содержатся вполне определенные практические рекомендации по планированию исследований общетоксического действия, которые, как правило, исключают их неверную интерпретацию. Так, например, в Руководстве по проведению доклинических исследований ЛС⁴ в разделе по исследованиям острой токсичности указано, что для малотоксичных веществ, при невозможности определения LD_{50} , максимальная используемая доза должна составлять не менее 2 г/кг. В соответствии с современными методическими подходами проведение отдельных

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

³ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

⁴ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

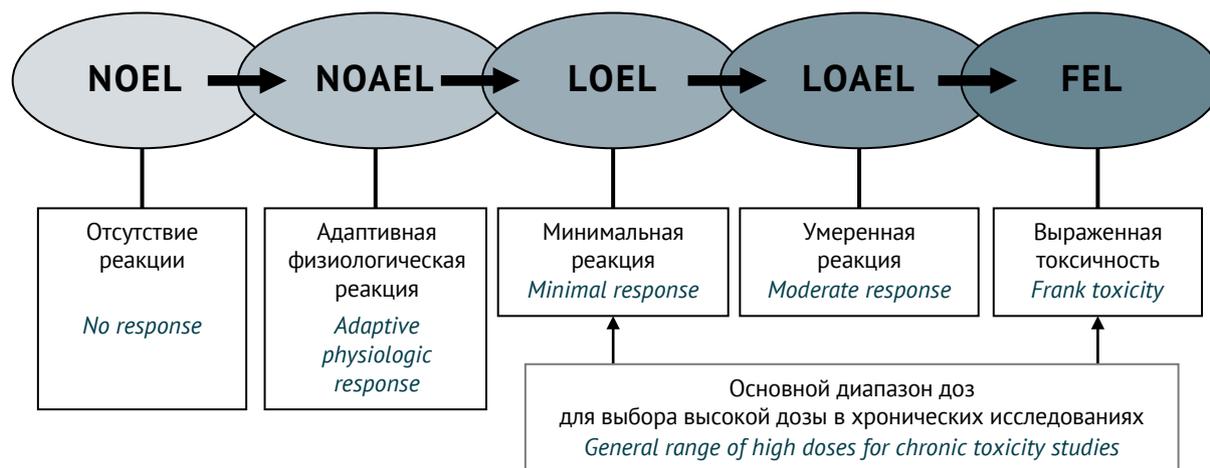


Рис. 1. Спектр ответа в неклинических исследованиях (по R.J. Kociba [5], с изменениями). NOEL – уровень доз отсутствия каких-либо наблюдаемых эффектов; NOAEL – уровень доз отсутствия наблюдаемых токсических эффектов; LOEL – уровень доз незначительных наблюдаемых токсических эффектов; LOAEL – уровень доз умеренных наблюдаемых токсических эффектов; FEL – уровень доз выраженных наблюдаемых токсических эффектов

Fig. 1. Range of responses in non-clinical studies (adapted from R.J. Kociba [5]). NOEL, No Observed Effect Level; NOAEL, No Observed Adverse Effect Level; LOEL, Low Observed Effect Level; LOAEL, Low Observed Adverse Effect Level; FEL, Frank Effect Level

исследований токсичности при однократном применении не является строго необходимым, а сведения о дозопонижающей токсичности при краткосрочном введении препарата могут быть получены из исследований токсичности при повторном введении или из исследований фармакодинамики, фармакокинетики или токсикокинетики⁵. Исследования острой токсичности, как правило, предоставляются к III фазе клинических исследований или раньше в случаях повышенного риска передозировки (если препарат разрабатывается для терапии боли, депрессии). Вместе с тем можно отметить меньшую определенность рекомендаций по выбору ВД для исследований хронической токсичности, которая может стать причиной неоднозначности их интерпретации. Так, например, в руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств указано что «введение максимальной дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов или гибель части животных. Эта доза может быть определена из данных по острой токсичности. Минимальная доза должна быть близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения, с учетом соответствующих коэффициентов. Третья доза является промежуточной»⁶.

Подобная оптимизация с целью получения максимальной пользы от исследований с меньшими затратами отражает общую тенденцию современной эволюции доклинических исследований и является одним из многочисленных примеров реализации концепции 3R (замена, сокращение, улучшение – Replacement, Reduction, Refinement) по рациональному этичному использованию экспериментальных животных.

Выбор ВД является весьма сложной задачей, поскольку требует соблюдения баланса между необходимостью максимального сохранения спектра потенциальных токсических эффектов и обеспечением выживаемости экспериментальных животных. Как показывает практика, в ходе проведения исследований хронической токсичности нередко требуется дополнительная корректировка ВД, чаще в сторону их снижения, вследствие избыточной токсичности и гибели животных. Примеры рекомендаций, которые могут иметь неоднозначную интерпретацию, представлены в *таблице 1*. Приведенные цитаты рекомендаций демонстрируют применение для выбора ВД критерия умеренной или минимальной ее токсичности. Подобный, кажущийся парадоксальным, подход, по-видимому, может оказаться одной из причин заниженного уровня ВД, которая

⁵ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

⁶ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

Таблица 1. Нормативные положения, касающиеся выбора высоких доз в исследованиях токсичности (цит. по L.A. Buckley и соавт. [2])**Table 1.** Regulatory positions regarding high dose selection in toxicity studies (from L.A. Buckley et al. [2])

Нормативный документ <i>Regulatory document</i>	Формулировка рекомендации, касающаяся выбора высоких доз <i>Recommendations on high dose selection quoted from the document</i>
ICH S1C (R2). Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. EMEA/CHMP/ICH/383/1995. EMA; 2008	Прогнозируемый минимальный токсический эффект в исследованиях хронической токсичности ... может быть оценен в 90-дневном исследовании подбора доз, в котором наблюдается минимальная токсичность, включающая снижение прироста массы тела $\leq 10\%$ по сравнению с контролем; токсичность для органов-мишеней; признаки клинической патологии. Максимальные дозы для исследований общей токсичности определяются по границам экспозиции или предельным дозам <i>Predicted to produce a minimum toxic effect over the course of the toxicity study ... may be predicted from a 90-day range-finding study in which minimal toxicity is observed ... factors to consider include: $\leq 10\%$ decrease in body weight gain relative to controls; target organ toxicity; significant alterations in clinical pathology. Maximum doses for general toxicity studies may be based on margins of exposure or limit doses</i>
Chemical carcinogens: a review of the science and its associated principles. U.S. Interagency Staff Group on Carcinogens. <i>Environ Health Perspect.</i> 1986;67:201–82	Наивысшая доза в исследовании хронической токсичности, достаточная для того, чтобы вызвать признаки минимальной токсичности без существенного изменения нормальной продолжительности жизни из-за эффектов, отличных от канцерогенности. Определяется в 90-дневном исследовании. При этом учитывают изменение массы тела и органов, клиническую патологию и наиболее отчетливые токсические, патологические или гистопатологические конечные точки <i>Highest dose in chronic study just high enough to elicit signs of minimal toxicity without significantly altering normal lifespan due to effects other than carcinogenicity. Determined in a 90-day study. Considers alteration in body and organ weight, clinical pathology and more definitive toxic, pathologic or histopathologic endpoints</i>
Toxicity test guideline for pharmaceuticals. Pp. 127 (Chapter 5). Japan Ministry of Health and Welfare; 1985	Наивысшей дозой для основного исследования канцерогенности является доза, которая в предварительном исследовании канцерогенности тормозит прирост массы тела не более чем на 10% и не вызывает ни летального исхода из-за токсических эффектов, ни заметных изменений общего состояния или лабораторных показателей <i>The dose in the preliminary carcinogenicity study that inhibits body weight gain $\leq 10\%$ and causes neither death due to toxic effects nor remarkable changes in the general signs or laboratory findings is the highest dose to be used in the full-scale carcinogenicity study</i>
Guideline on repeated dose toxicity. CPMP/SWP/1042/99. EMA; 2010	Высокая доза должна позволять идентифицировать токсичность для органов-мишеней или другую неспецифическую токсичность или соответствовать максимальной достижимой дозе. ... В идеале системная экспозиция препарата и/или основных метаболитов должна многократно превышать ожидаемую клиническую системную экспозицию. ... Корректировка дозы необходима при чрезмерной токсичности или отсутствии токсических эффектов <i>Should enable identification of target organ toxicity or other non-specific toxicity, or until limited by volume of dose ... Ideally, systemic exposure to the drug and/or principal metabolites should be a significant multiple of the anticipated clinical systemic exposure ... Need for adjustment if unexpected toxicity or lack thereof</i>
Rules governing medicinal products in the European Community. Vol. III. CHMP; 1987	Максимальная доза должна вызывать минимальный токсический эффект, например потерю веса на 10% или замедление роста или минимальную токсичность для органов-мишеней, ... о чем свидетельствует нарушение физиологических функций и, в конечном счете, патологические изменения <i>The top dose should produce a minimum toxic effect, for example a 10% weight loss or failure of growth, or minimal target organ toxicity ... as demonstrated by failure of physiologic functions and ultimately by pathological changes</i>

не дает полного представления о спектре потенциальных токсических эффектов ЛС.

Рекомендуемый алгоритм выбора ВД (рис. 2) предусматривает 4 случая признания дозы в качестве высокой: если она соответствует МПД, МДД, дозе, обеспечивающей насыщение экспозиции или превышает клиническую экспозицию в 50 и более раз⁷. Если не выполняются эти условия, применяются варианты других решений с использованием критериев

соотношения доз и экспозиции ЛС у человека и экспериментальных животных. В качестве достаточной ВД в исследованиях хронической токсичности при прочих равных условиях принимается доза 1000 мг/кг массы тела животного, обеспечивающая не менее чем 10-кратную клиническую экспозицию. Если не удастся достичь целевой экспозиции у животных, ВД может быть увеличена до 2000 мг/кг и более, вплоть до МДД.

⁷ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

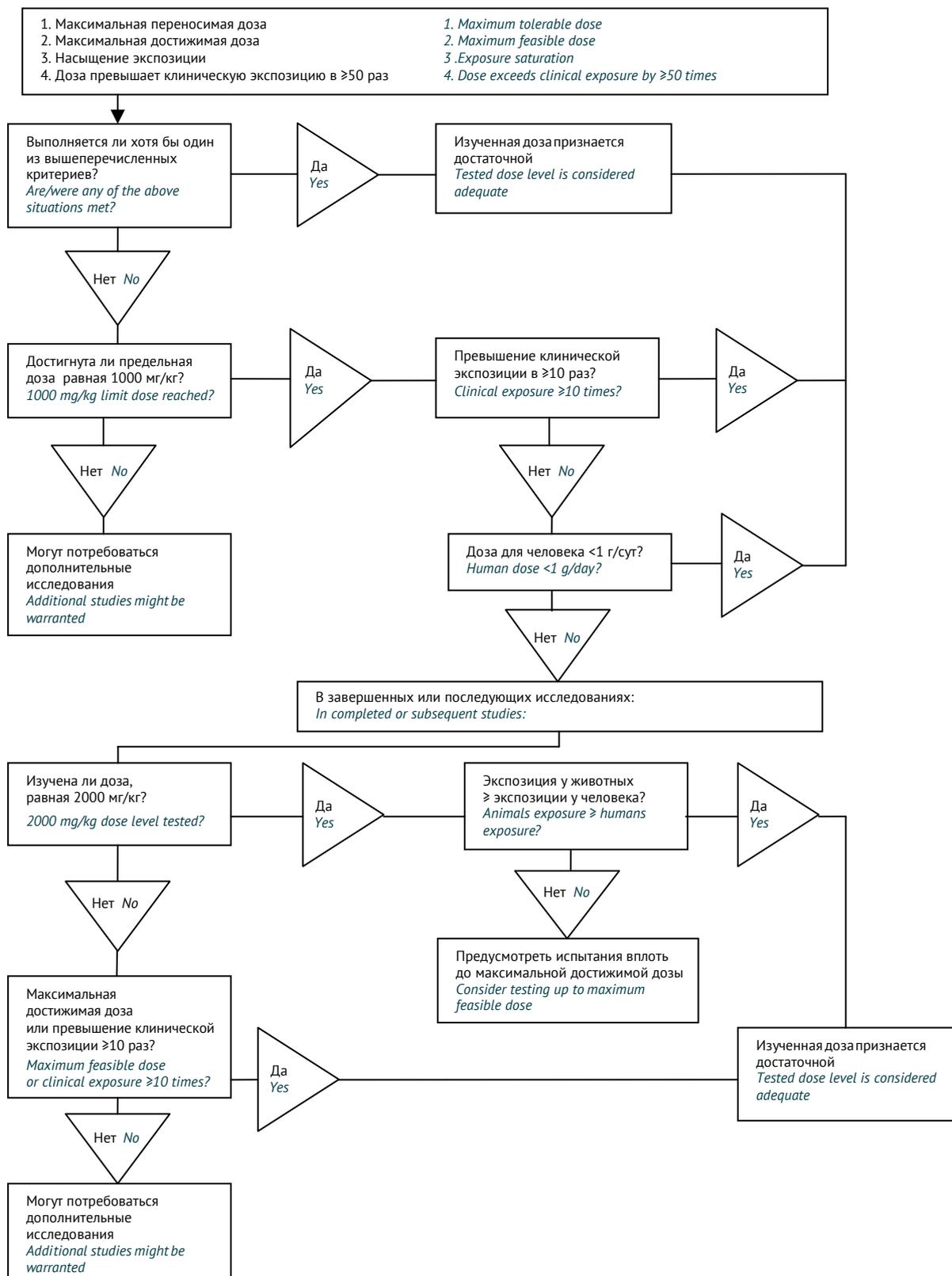


Рис. 2. Схема выбора высокой дозы для исследований общей токсичности

Fig. 2. Recommended high dose selection for general toxicity studies

Согласно руководству Евразийской экономической комиссии⁸, для обоснования проведения клинических исследований III фазы необходимо, как правило, определить дозопредельную токсичность в экспериментах с предельной дозой, обеспечивающей 50-кратное превышение экспозиции, с использованием как минимум одного вида животных. В руководстве⁹ МПД определена как самая ВД, которая будет переносима в течение всего периода исследования. Безусловно, длительность эксперимента может оказывать влияние на величину МПД. Так, однократное введение препарата возможно в более высоких дозах, чем при повторном введении в исследованиях субхронической и хронической токсичности. Согласно исследованию L.A. Buckley и соавт. [2], подходы к выбору дозы для доклинических исследований безопасности фармацевтических препаратов должны учитывать необходимость демонстрации всего диапазона зависимости «доза–эффект», соотноситься с терапевтическими дозами для человека, а также учитывать клинические показания и фазу клинического исследования.

Согласно руководству¹⁰, ВД должна обеспечить идентификацию токсичности для органов-мишеней или другой неспецифической токсичности или ограничиваться максимально возможным объемом введения.

Одним из критериев «достаточности» дозы является использование в эксперименте на животных МДД¹¹. Предельные дозы для исследований острой, субхронической и хронической токсичности в размере 1000 мг/кг/сут для грызунов и негрызунов считаются достаточными в большинстве случаев, за исключением случаев низкой экспозиции препарата у животных по данным токсикокинетики. Согласно руководству ЕМА¹², при применении ВД экспозиция ЛС и (или) основных метаболитов должно значительно превышать ожидаемую системную экспозицию у человека. Промежуточная доза может определяться как среднее геометрическое значение между высокой и низкой дозой.

В процессе доклинического изучения безопасности может потребоваться коррекция уровня доз при возникновении неожиданных токсических реакций или, наоборот, при отсутствии токсических эффектов.

Крайне важной является корректность дозирования ЛС у животных в исследованиях токсичности. Экспериментальные лекарственные формы, используемые в доклинических исследованиях, должны обеспечивать биодоступность, достаточный диапазон и точность дозирования действующего вещества, его стабильность и однородность распределения в препарате. Тестируемое ЛС, как правило, вводят в виде смеси, рецептура которой может варьировать от простых растворов или суспензий до сложных систем доставки. Для достижения ВД, соответствующей международным нормативным требованиям, часто необходимо использовать рецептуру, содержащую высокую концентрацию действующего вещества. При этом, в зависимости от класса ЛС и относительного уровня его экспозиции у человека и животных, ВД может достигать 1000 или 2000 мг/кг/сут¹³.

Для разных способов введения и разных видов животных определены допустимые максимальные объемы введения, поэтому этот фактор также может вызвать необходимость использования экспериментальной лекарственной формы с повышенным содержанием действующего вещества [6]. Как показывает опыт экспертизы доклинических исследований, разработчики достаточно часто уже на самых ранних этапах в токсикологических исследованиях используют лекарственную форму, предназначенную для клинического применения, вместо экспериментальных лекарственных форм. Однако низкая дозировка действующего вещества или большое количество вспомогательных веществ в клинической лекарственной форме могут препятствовать достижению уровня дозы, достаточного для проявления токсического действия у животных. Как следствие, при использовании лекарственной формы, предназначенной для клинического применения, не всегда

⁸ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

⁹ Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals. London: LASA/NC3Rs; 2009.

¹⁰ Guideline on repeated dose toxicity. CPMP/SWP/1042/99. Rev 1 Corr*. EMA; 2010.

¹¹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

¹² Guideline on repeated dose toxicity. CPMP/SWP/1042/99. Rev 1 Corr*. EMA; 2010.

¹³ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. EMA/CPMP/ICH/286/1995. EMA; 2009.

удаётся в полной мере охарактеризовать токсикологический профиль препарата.

В исследовании L.A. Buckley и соавт. [2] авторы отмечают, что остается дискуссионным вопрос о корректности интерпретации токсикологических данных и оценке пользы и риска применения препарата у человека в случаях, когда часть нежелательных эффектов обусловлена чрезмерным фармакологическим действием, которое превышает адаптационные возможности организма; в качестве примера приводят дозозависимый гипогликемический эффект инсулина. Кроме того, при оценке дозозависимости токсических эффектов предполагается, что вероятность их появления связана с увеличением дозы выше терапевтического диапазона, однако следует иметь в виду, что некоторые ЛС не вызывают токсических эффектов даже в 100-кратных клинических дозах. В таких случаях дозы, использованные в доклинических исследованиях, могут оказаться необоснованными с точки зрения клинической значимости. Если в ходе токсикологического эксперимента не удастся вызвать токсические эффекты, может встать вопрос о релевантности выбора вида экспериментальных животных. Данная проблема может быть решена проведением токсикокинетических исследований, которые должны подтвердить достаточный уровень системной экспозиции препарата у животных¹⁴.

При выборе ВД следует представлять структуру системы доклинических исследований в целом. Доклинические исследования представляют собой комплексную систему взаимосвязанных элементов, которая включает общие методологические подходы, стандартные экспериментальные методы и критерии оценки фармакодинамики, фармакокинетики и токсичности ЛС на тест-системах *in vitro*, *in vivo* и *in silico*, а также требования и нормативы, предъявляемые к организации и проведению исследований и оформлению их результатов. Доклинические исследования безопасности нового ЛС представляют условно обособленную часть общей системы, включающую полный комплекс исследований фармакологической и токсикологической безопасности нового фармакологически активного вещества-кандидата, результаты которой используют для прогнозирования риска первого применения ЛС у человека.

Уникальность роли выбора ВД заключается в наиболее полном выявлении спектра

потенциальных токсических эффектов и органов-мишеней токсического действия нового ЛС. Вместе с тем не менее важное значение для оценки безопасности нового ЛС имеет выбор низкой дозы и всего диапазона исследуемых доз для наиболее обоснованного определения уровня нетоксической дозы, не вызывающей нежелательных эффектов (NOAEL) или минимальной токсической дозы (LOEL), которые используются для вычисления безопасной стартовой дозы для первого применения ЛС у человека (рис. 1). Правильный выбор и своевременная корректировка диапазона доз базируется на результатах предварительных (оценочных) исследований по подбору доз. Изначально диапазон для наибольшей широты охвата, как правило, включает не менее 3 доз с логарифмическими интервалами между дозами (например, 0,1–1–10–100 усл. ед. или 0,1–0,3–1–3–10 усл. ед.), что позволяет с высокой вероятностью определить характер, динамику, дозозависимость токсических эффектов, а также их обратимость (в отставленных группах животных). Неудачно выбранный начальный диапазон и междозовый интервал нередко приводят к досадной для исследователя ситуации – невозможности определения максимального уровня нетоксической дозы и вынужденном использовании для этой цели более низкого уровня доз, невыгодного для положительной характеристики безопасности нового ЛС.

Наше предположение о возможной причине неправильного выбора ВД, связанной с неоднозначностью рекомендуемых критериев и их интерпретации, для специалистов лекарственной токсикологии может показаться необоснованным, что весьма ожидаемо, поскольку токсикологи на практике убеждаются в неэтичности и психологической пагубности экспериментов, сопровождающихся развитием тяжелых и терминальных состояний в исследованиях острой и хронической токсичности. В связи с этим использование максимальных доз в рассмотренном алгоритме и регуляторных требованиях по выбору ВД применимы исключительно для малотоксичных ЛС. Кроме того, использование в исследованиях чрезмерных токсических доз не дает полезной информации о безопасности ЛС для человека, поскольку развитие терминальных состояний является следствием необратимого повреждения гомеостаза, которое соответствует механизму клинических случаев фатальных отравлений. Напротив, для адекватной оценки клинической

¹⁴ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.12.2020 № 33 «О Руководстве по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов».

безопасности ЛС токсические эффекты у животных должны развиваться на фоне сохраненных адаптивных функций организма.

Безопасная стартовая доза рассчитывается на основании определения в исследованиях хронической токсичности дозы, не вызывающей развития нежелательных (токсических) эффектов с учетом дополнительных факторов риска, пропорционально снижающих величину стартовой дозы. Такими дополнительными факторами риска являются, в частности, использование LOEL вместо NOAEL, недостаточная продолжительность эксперимента, неустановленный механизм действия ЛС и др.

Релевантным видом животных для доклинических исследований считают вид, имеющий целевую мишень специфического фармакологического действия ЛС и наиболее чувствительный к его действию. В соответствии с рекомендациями Евразийской экономической комиссии¹⁵ в токсикологических исследованиях используют тот вид животных, на котором был продемонстрирован фармакологический эффект ЛС.

График проведения доклинических исследований безопасности зависит от их значимости для конкретной стадии клинической разработки. Так, результаты исследований острой токсичности в настоящее время могут быть представлены к III фазе клинических исследований, а результаты исследований подострой и субхронической токсичности представляются к I и II фазам. Полномасштабные исследования хронической токсичности (до 6 мес. на грызунах и до 9 мес. на негрызунах) представляются к III фазе или к моменту регистрации нового ЛС.

Тенденция будущей эволюции методологии доклинических исследований безопасности,

вытекающая из концепции 3R, выражается в сокращении и рациональности использования экспериментальных животных, исключении летальных экспериментов в токсикологических исследованиях *in vivo* наряду с внедрением альтернативных инновационных и высокотехнологичных методов *in vitro* и *in silico*.

Заключение

Проведенный анализ позволил предположить, что причиной необоснованного выбора ВД в токсикологических исследованиях является неоднозначность интерпретации методических рекомендаций в случае отсутствия в них нормирования предела верхней границы токсических доз и недостаточной определенности критериев выбора дозы по выраженности токсического действия, соотношению доз и экспозиции ЛС у экспериментальных животных и человека. При выборе ВД для изучения общетоксического действия ЛС необходимо пользоваться критериями и алгоритмом, приведенными в «Руководстве по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов»¹⁶.

Принципиальное значение для выбора ВД, обоснования релевантности доклинических исследований и интерпретации результатов имеют данные токсикокинетических исследований, подтверждающие достижение достаточной системной экспозиции препарата у животных. Соблюдение требований регуляторной токсикологии в отношении выбора доз является необходимым условием корректного планирования базовых доклинических исследований безопасности новых ЛС.

Литература / References

1. Sewell F, Corvaro M, Andrus A, Burke J, Daston G, Delaney B, et al. Recommendations on dose level selection for repeat dose toxicity studies. *Arch Toxicol*. 2022;96:1921–34. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03293-3>
2. Buckley LA, Dorato MA. High dose selection in general toxicity studies for drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009;54(3):301–7. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.05.015>
3. Шекунова ЕВ, Ковалева МА, Макарова МН, Макаров ВГ. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(1):19–28. Shekunova EV, Kovaleva MA, Makarova MN, Makarov VG. Dose selection in preclinical studies: cross-species dose conversion. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(1):19–28 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28>

¹⁵ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.05.2020 № 10 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

¹⁶ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

4. Woutersen M, Muller A, Pronk MEJ, Cnubben NHP, Hakkert BC. Regulating human safety: how dose selection in toxicity studies impacts human health hazard assessment and subsequent risk management options. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020;114:104660. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104660>
5. Kociba RJ. Issues in biochemical applications to risk assessment: how should the MTD be selected for chronic bioassays? *Environ Health Perspect.* 1987;76:169–74. <https://doi.org/10.1289/ehp.8776169>
6. Saunders MD. A review of the main considerations for formulation development in preclinical toxicology studies. *Int J Toxicol.* 2021;40(6):551–6. <https://doi.org/10.1177/10915818211043756>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Г.Н. Енгальчева – концепция статьи, написание текста рукописи; Р.Д. Сюбаев – написание текста рукописи, работа с графическим материалом.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Galina N. Engalycheva conceptualised the study and drafted the manuscript. Rashid D. Syubaev drafted the manuscript and worked with the graphical material.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project № 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Енгальчева Галина Нинелевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-0858>
Engalycheva@expmed.ru

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6729-2349>
Subaev@expmed.ru

Поступила 14.02.2023

После доработки 06.03.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Galina N. Engalycheva, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-0858>
Engalycheva@expmed.ru

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6729-2349>
Subaev@expmed.ru

Received 14 February 2023

Revised 6 March 2023

Accepted 6 June 2023

УДК 615.03:577.182.24:57.086.835
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-155-164>



Оригинальная статья | Original article



Сравнительное исследование чувствительности клеточных линий НЕК293 и RPTEC для оценки нефротоксического действия цефуроксима и цефепима

В.А. Евтеев^{1,✉}, И.С. Семенова¹, Н.Д. Бунятян^{1,2}, А.Б. Прокофьев^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

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

✉ Контактное лицо: Евтеев Владимир Александрович evteev@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Выявление нефротоксических свойств является актуальной задачей как на доклиническом этапе разработки новых препаратов, так и при изучении возможностей оптимизации фармакотерапии. Основной проблемой при этом является поиск экспериментальной модели для оценки нефротоксичности лекарственных средств, наиболее приближенной к условиям *in vivo*.

Цель работы: сравнение чувствительности клеточных линий НЕК293 и RPTEC, используемых в качестве экспериментальных моделей при оценке нефротоксического действия цефуроксима и цефепима.

Материалы и методы: в исследовании использовали клеточные линии НЕК293 и RPTEC, которые культивировали в планшетах с мембранными вставками диаметром пор 0,4 мкм. Для каждой клеточной линии проводили инкубацию с цефалоспорином цефуроксимом и цефепимом, преимущественно выводящимися через почки, в течение 3 сут. Препараты добавляли в базальный отдел лунки планшета 2 раза/сут в следующих концентрациях: цефуроксим – 50 и 150 мкг/мл, цефепим – 30 и 120 мкг/мл. Через 24, 48 и 72 ч инкубации с препаратами измеряли уровни экспрессии генов транспортеров органических анионов *SLC22A6* и *SLC22A8* методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Признаком нефротоксического действия цефалоспоринов считали активацию каспаз 3 и 7, которую оценивали с помощью флуориметрического теста, который проводили через 24, 48 и 72 ч после инкубации с препаратами.

Результаты: показано уменьшение экспрессии генов транспортеров органических анионов *SLC22A6* и *SLC22A8* в обеих клеточных линиях при транспорте цефалоспоринов, причем в клеточной линии RPTEC оно наступало раньше, чем в клеточной линии НЕК293. Активация каспаз 3 и 7 при инкубации клеток с цефуроксимом и цефепимом в низких концентрациях (50 и 30 мкг/мл соответственно) была отмечена только в клеточной линии RPTEC через 72 ч, а при инкубации с этими препаратами в высоких концентрациях (150 и 120 мкг/мл соответственно) в клетках линии RPTEC она наблюдалась уже через 24 ч.

Выводы: клеточная линия RPTEC является более чувствительной к токсическому действию цефуроксима и цефепима в связи с более высоким уровнем экспрессии генов транспортеров лекарственных средств. Повышение концентрации цефалоспоринов уменьшает время активации каспаз 3 и 7 в этой клеточной линии. Экспериментальная модель на основе клеточной линии RPTEC является перспективной для проведения анализа нефротоксических свойств различных препаратов.

© В.А. Евтеев, И.С. Семенова, Н.Д. Бунятян, А.Б. Прокофьев, 2023

Ключевые слова: лекарственные препараты; нефротоксичность; клеточные линии; HEK293; RPTEC; транспортеры органических анионов; цефалоспорины; цефуроксим; цефепим

Для цитирования: Евтеев В.А., Семенова И.С., Бунятян Н.Д., Прокофьев А.Б. Сравнительное исследование чувствительности клеточных линий HEK293 и RPTEC для оценки нефротоксического действия цефуроксима и цефепима. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):155–164. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-155-164>

Susceptibility of HEK293 and RPTEC Cell Lines to Nephrotoxic Effects of Cefuroxime and Cefepime: A Comparative Study

V.A. Evteev^{1,✉}, I.S. Semenova¹, N.D. Bunyatyan^{1,2}, A.B. Prokofiev^{1,2}

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Vladimir A. Evteev** evteev@expmed.ru

ABSTRACT

Researchers need to identify the nephrotoxic properties of medicinal products both during preclinical development and when exploring options to optimise pharmacotherapy. The main challenge is to find an experimental model for assessing drug-induced nephrotoxicity that reflects *in vivo* conditions as closely as possible.

The aim of the study was to compare the susceptibility of HEK293 and RPTEC cell lines used as experimental models for assessing the nephrotoxicity of cefuroxime and cefepime.

Materials and methods. The study investigated HEK293 and RPTEC cell lines cultured on plates with 0.4 µm pore membrane inserts. The cell lines were incubated for 3 days with cefuroxime and cefepime (cephalosporins excreted primarily by the kidneys). The medicinal products were added to the basal part of the well at concentrations of 50 and 150 µg/mL (cefuroxime) or 30 and 120 µg/mL (cefepime) twice a day. After incubating the cells with cefuroxime and cefepime for 24, 48, and 72 hours, the authors determined the expression levels of the *SLC22A6* and *SLC22A8* genes encoding organic anion transporters by a reverse transcription polymerase chain reaction. The authors considered caspase 3 and caspase 7 activation indicative of the nephrotoxic effect of cephalosporins; they evaluated this indicator by a fluorometric assay after 24, 48, and 72 hours of incubation.

Results. According to the study, the expression of the *SLC22A6* and *SLC22A8* genes decreased with cephalosporin transport in both cell lines. The decrease occurred in the RPTEC cell line earlier than in the HEK293 cell line. The authors observed caspase 3 and caspase 7 activation only in the RPTEC cell line after incubation with cefuroxime and cefepime at low concentrations (50 and 30 µg/mL, respectively) for 72 hours and at high concentrations (150 and 120 µg/mL, respectively) for 24 hours.

Conclusions. The RPTEC cell line exhibits higher susceptibility to cefuroxime and cefepime toxic effects than the HEK293 cell line due to higher transporter gene expression. Higher cephalosporin concentrations accelerate caspase 3 and caspase 7 activation in the RPTEC cell line. The experimental model based on the RPTEC cell line is a promising tool for the analysis of the nephrotoxic properties of a wide range of medicinal products.

Key words: medicinal products; nephrotoxicity; cell lines; HEK293; RPTEC; organic anion transporters; cephalosporins; cefuroxime; cefepime

For citation: Evteev V.A., Semenova I.S., Bunyatyan N.D., Prokofiev A.B. Susceptibility of HEK293 and RPTEC cell lines to nephrotoxic effects of cefuroxime and cefepime: a comparative study. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):155–164. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-155-164>

Введение

Для достоверного прогнозирования нефротоксичности потенциальных фармакологических агентов в исследованиях *in vitro* необходим научно обоснованный выбор конкретных клеточных мишеней, а также выявление надежных биомаркеров нефротоксичности [1]. Скрининг нефротоксических свойств лекарственных средств (ЛС) *in vitro* в настоящее время имеет низкий уровень связи с данными из клинической практики фармакотерапии. Проксимальные почечные каналцы не только реабсорбируют глюкозу, альбумин и различные электролиты посредством специальных транспортеров, но также участвуют в выведении ксенобиотиков (в том числе ЛС) в мочу, и именно этот сегмент нефрона является важной мишенью для нефротоксического повреждения. В связи с этим внимание исследователей нефротоксичности в последнее время привлечено к экспериментальным моделям на основе линий эпителиальных клеток проксимальных почечных каналцев [2].

Существует несколько возможных механизмов нефротоксического действия ксенобиотиков. Так, транспорт отрицательно заряженных молекул посредством транспортеров органических анионов (organic anion transporters, OAT) осуществляется в обмен на анион дикарбоновой кислоты, что замедляет функционирование цикла Кребса – важного компонента энергетического обмена клетки. Таким образом, при транспорте анионов клетками проксимальных каналцев возможно возникновение ишемических явлений, увеличивающих риск развития апоптоза [3]. Нефротоксическое действие ксенобиотиков нередко определяется активностью ферментов, участвующих в их метаболизме: в частности, нефротоксичность цисплатина зависит от активности фермента глутатион-S-трансферазы [4]. Основными протеазами, участвующими в процессе апоптоза, являются каспазы. Каспазы 3 и 7 – эффекторные каспазы митохондриального пути апоптоза, которые могут рассматриваться в качестве биомаркеров токсического действия ЛС [5].

Согласно рекомендациям по доклиническим исследованиям Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA)¹ и Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency,

EMA)², в случае, когда почечный клиренс исследуемого ЛС составляет более 25%, производитель обязан протестировать его на предмет сродства к почечным транспортерам. В качестве экспериментальных моделей для такого тестирования предлагается использовать клеточные линии HEK293, CHO, MDCK и др. Основной характеристикой клеточных линий, используемых в качестве моделей *in vitro*, является уровень экспрессии и функциональной активности транспортеров, ферментов и других функциональных белков, которые участвуют в транспорте ЛС. Несмотря на то что эти транспортеры и ферменты достаточно хорошо изучены, современные клеточные модели *in vitro* плохо воспроизводят как морфологию, так и функцию почечных каналцев и, следовательно, не могут в должной степени продемонстрировать реакцию на повреждение нефротоксичными лекарственными препаратами *in vivo*. В связи с этим в настоящее время исследователи нефротоксичности рассматривают в качестве перспективной клеточную линию RPTEC (renal proximal tubule epithelial cells), полученную из эпителия проксимальных почечных каналцев человека [6]. В отличие от вышеперечисленных клеточных линий, RPTEC имеет сходную морфологию с проксимальным эпителием *in vivo*, что позволяет ожидать более высокую корреляцию полученных результатов с данными клинических исследований [7].

Известно, что антибиотики семейства бета-лактамов, в частности цефалоспорины, преимущественно выводятся через почки, что обосновывает проведение исследований нефротоксичности для данной группы препаратов. Цефалоспорины цефуроксим (II поколение) и цефепим (IV поколение) широко применяются в клинике и в повышенных дозировках могут вызывать нефротоксические эффекты [8].

Цель работы – сравнение чувствительности клеточных линий HEK293 и RPTEC, используемых в качестве экспериментальных моделей при оценке нефротоксического действия цефуроксима и цефепима.

Задачи исследования:

1) изучить влияние концентрации и времени воздействия антибиотиков группы цефалоспоринов на уровень экспрессии генов транспортеров органических анионов (OAT) в клеточных линиях HEK293 и RPTEC;

¹ In vitro drug interaction studies – cytochrome p450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. FDA-2017-D-5961. FDA; 2020.

² ICH Guideline M12 on drug interaction studies. EMA/CHMP/ICH/652460/2022. EMA; 2022.

2) изучить активацию каспаз 3 и 7 в клеточных линиях НЕК293 и RPTEC;

3) провести сравнение полученных результатов для используемых клеточных линий.

Материалы и методы

Клеточная культура. Клеточная линия проксимальных почечных канальцев человека RPTEC, иммортализованная путем ретровирусной трансфекции гена *hTERT* (вектор *pLXSN*), была получена из банка культур клеток ATCC (код: CRL-4031). Культура клеток почек эмбриона человека НЕК293 была любезно предоставлена коллегами из НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Восстановление клеточной линии RPTEC производили по следующей методике: культуральный флакон 25 см², содержащий 10 мл культуральной среды DMEM/F12 (с добавлением следующих веществ: рекомбинантный человеческий фактор роста EGF – 10 нг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, инсулин – 5 мкг/мл, гидрокортизон – 25 нг/мл, селенит натрия – 8,65 нг/мл (Gibco, США)), помещали в инкубатор на 15–20 мин для достижения нейтрального значения pH (7,0–7,6), а также для предотвращения защелачивания среды в процессе восстановления клеток. Пробирку с клетками размораживали на водяной бане в течение 2 мин при температуре 37 °С. После размораживания флакон обрабатывали 70% этанолом и далее все действия проводили в асептических условиях. Содержимое переносили в центрифужную пробирку, содержащую 9,0 мл культуральной среды, и центрифугировали при 250 g в течение 5–7 мин. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в свежей среде. Полученную суспензию переносили в культуральный флакон. Условия культивирования стандартные: 37 °С и 5% CO₂. В эксперименте использовали клетки 14–15 пассажей.

Культивирование. Клеточную линию НЕК293 культивировали в 12-луночных планшетах с мембранными вставками с диаметром пор 0,4 мкм (Costar® 12 mm Transwell®, 0.4 µm Pore Polyester Membrane Inserts). В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 (Gibco, США), 50 ед./мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 0,1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz, США) при 37 °С, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста.

Клеточную линию RPTEC культивировали в 12-луночных планшетах с мембранными вставками с диаметром пор 0,4 мкм (Costar® 12 mm Transwell®, 0.4 µm Pore Polyester Membrane Inserts). Количество клеток в каждой лунке составляло примерно 0,5×10⁶. В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 (Gibco, США), 50 ед./мл гентамицина и 0,1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz, США) при 37 °С, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. В среду были добавлены: инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, селенит натрия – 5 мкг/мл (Insulin–Transferrin–Sodium Selenite Supplement; Sigma-Aldrich, кат. № I1884), hEGF (Sigma-Aldrich, кат. № E9644) – 10 нг/мл, гидрокортизон – 25 нг/мл (Sigma-Aldrich, кат. № H6909). Замена среды производилась через каждые 2–3 сут. Объем буфера для апикального и базолатерального отделов составил 0,5 и 1,5 мл соответственно (чтобы избежать разности гидростатических давлений).

Лекарственные препараты. Использовали субстанции цефалоспоринов: цефуроксим (USP Reference Standard, кат. № 1098209) и цефепим (USP Reference Standard, кат. № 1097636). Субстанции растворяли в культуральной среде, концентрация препаратов в рабочем растворе составляла 50 и 150 мкг/мл для цефуроксима, 30 и 120 мкг/мл – для цефепима. Рабочие растворы добавляли в культуральную среду 2 раза/сут на протяжении 3 сут таким образом, что концентрации конечных растворов составили 50 и 150 мкг/мл для цефуроксима, 30 и 120 мкг/мл – для цефепима. Выбранные концентрации цефалоспоринов примерно соответствуют минимальной и максимальной концентрации данных препаратов в крови в рамках применения их в терапевтических дозах³.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ПЦР). Выделение тотальной РНК из клеток проводили с использованием реагента PureZOL (BioRad, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе Biometra TOne 96G (Analytik Jena, Германия) в общем объеме 20 мкл по следующему протоколу: в пробирку, находящуюся на льду, добавляли последовательно: 2 мкл тотальной РНК, 0,2 мкг гекса-праймеров, воды, обработанной диэтилпиноксидом (DEPC-treated water; Fermentas) – до 12,5 мкл, затем перемешивали и далее добавляли: 4 мкл 5x ПЦР-буфера (Fermentas), 0,5 мкл (20 ед.) ингибитора

³ Цефуроксим. https://www.vidal.ru/drugs/cefuroksim_14802
Цефепим. https://www.vidal.ru/drugs/cefepime_22119

РНказы (RiboLock, Fermentas), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (Fermentas), 1 мкл обратной транскриптазы (RevertAid, Fermentas). После осторожного перемешивания инкубировали сначала 10 мин при 25 °С, а затем 60 мин при 42 °С. Для завершения реакции инкубировали 10 мин при 72 °С. Во всех экспериментах проводили контрольную реакцию с использованием воды вместо РНК.

Полимеразную цепную реакцию для всех изучаемых генов проводили в термоциклере C1000 CFX96 (BioRad, США) по следующей схеме: начальная денатурация при 94 °С в течение 2 мин; отжиг праймеров при 60 °С, 30 с; синтез продукта при 72 °С, 30 с; заключительная выдержка после прохождения циклов 5 мин при 72 °С. Количество циклов варьировало в пределах 25–30 с в зависимости от изучаемого гена. В качестве контроля использовали РНК вместо кДНК. Последовательности праймеров указаны в *таблице 1*. Нормирование экспрессии генов проводили по *GAPDH* в качестве гена «домашнего хозяйства», для анализа результатов количественной полимеразной реакции использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве отрицательного контроля использовали клеточную культуру без добавления препарата. Изменения активности генов в опытных образцах определяли относительно отрицательного контроля.

Флуориметрический тест на каспазы 3 и 7. Исследование проводили методом флуориметрии с использованием коммерческого набора «The EarlyTox™ Caspase-3/7 R110 Assay Kit» (Molecular Devices, США). Набор обеспечивает возможность проведения одноступенчатого анализа активности двух каспаз благодаря флуорогенному субстрату (Ac-DEVD)₂-R110, представляющему собой пептидный димер, который содержит сайты для гидролиза каспазами 3 и 7. При гидролизе данного димера под действием каспаз происходило высвобождение флуоресцентного красителя родамина 110, количество которого измеряли на планшетном флуориметре Cary Eclipse Fluorescence (Agilent Technologies).

Клетки высевали в количестве (20–25)×10³ (объем среды 0,1 мл) на лунку 96-луночного микропланшета для флуориметрии (Molecular Devices, США). Для прикрепления и роста клеток планшет инкубировали сутки при 37 °С и 5% CO₂. Затем к клеткам добавляли препараты по методике, изложенной выше.

Приготовление буфера для анализа (все компоненты включены в коммерческий набор): флуорогенный субстрат (Ac-DEVD)₂-R110 смешивали с лизирующим буфером в соотношении 1:20 до конечной концентрации субстрата 2 мМ. В каждую лунку добавляли по 100 мкл буфера для анализа. В результате объем раствора в каждой лунке составлял 200 мкл, а конечная концентрация субстрата – 50 мкмоль/л. Отрицательным контролем являлась культуральная среда в отсутствие препарата. В качестве холостой пробы использовали препараты с флуорогенным субстратом в отсутствие клеточной культуры. Далее образцы для анализа перемешивали на шейкере при 300 об/мин в течение 30 с и инкубировали 2 ч при комнатной температуре.

Измерение флуоресценции проводили на планшетном флуориметре при следующих параметрах: длина волны – 490 нм, длина волны эмиссии – 520 нм. Результаты представляли с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (Molecular Devices) в виде графика с использованием 4-параметрической аппроксимации кривой. Результаты люминесцентного анализа холостых проб использовали в качестве фоновых.

Для определения базовой активности каспаз в клетках использовали результат люминесцентного анализа проб отрицательного контроля. Положительным считали результат с флуоресценцией выше значений отрицательного контроля.

Статистическая обработка данных. Проводили с помощью пакета программ Statistica 13 (StatSoft, США). Различия в средних значениях опыта по отношению к контролю на каждой

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения полимеразной цепной реакции

Table 1. Primer sequences for the polymerase chain reaction

Ген <i>Gene</i>	Прямой праймер (5'→3') <i>Forward primer (5'→3')</i>	Обратный праймер (5'→3') <i>Reverse primer (5'→3')</i>
<i>OAT1</i>	TTGTCCGAACCTCTCTTGCT	CACAGGAACAGCACCGTAGA
<i>OAT3</i>	CTGAGCACCGTCATCTTGAA	AGACCAACCAGCGTATGGAC
<i>GAPDH</i>	GGATTTGGTCGTATTGGG	GGAAGATGGTGATGGGATT

временной точке рассчитывали с помощью ANOVA. Уровнем статистической значимости считали $p < 0,05$. Для каждой концентрации препарата проводили 3 независимых эксперимента. В рамках данной работы провести большее количество экспериментов не представлялось возможным, что являлось ограничением исследования. Полученные результаты могут рассматриваться в качестве предварительных.

Результаты и обсуждение

Влияние цефуроксима и цефепима

на экспрессию генов транспортеров OAT1 и OAT3 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC

Уровень экспрессии гена *SLC22A6* (OAT1) в клетках линий HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом в концентрациях 50 и 150 мкг/мл изменялся неравномерно (рис. 1). В клетках линии RPTEC экспрессия гена *SLC22A6* при инкубации с цефуроксимом в концентрации 50 мкг/мл снижалась в среднем на 24,75% каждые сутки, в то время как в клетках линии HEK293 наблюдалось снижение уровня экспрессии в среднем на 16,36% в сутки. Это можно объяснить, по-видимому, более активным транспортом цефуроксима в клеточной линии RPTEC. Представленные на рисунке данные также свидетельствуют о том, что динамика понижения уровня экспрессии

гена *SLC22A6* статистически значимо зависит от концентрации ЛС.

При транспорте цефепима в концентрациях 30 и 120 мкг/мл в обеих клеточных линиях наблюдалось относительно равномерное понижение уровня экспрессии гена *SLC22A6* (OAT1). При добавлении цефепима в концентрации 120 мкг/мл понижение экспрессии гена более значительно, чем в концентрации 30 мкг/мл (рис. 2).

При транспорте цефуроксима в концентрации 50 мкг/мл понижение экспрессии гена *SLC22A8* (OAT3) в клеточной линии RPTEC было более значительным, чем в HEK293 (рис. 3). При добавлении цефуроксима в концентрации 150 мкг/мл в клеточной линии HEK293 происходит резкое снижение экспрессии гена *SLC22A8* на вторые сутки.

При добавлении цефепима в концентрации 30 мкг/мл снижение уровня экспрессии гена *SLC22A8* (OAT3) в клеточных линиях HEK293 и RPTEC происходило на вторые сутки (рис. 4). При инкубации с цефепимом в концентрациях 30 и 120 мкг/мл в клеточной линии RPTEC понижение уровня экспрессии генов *SLC22A8* в среднем, соответственно, на 9,6 и 7,8% больше, чем в клеточной линии HEK293.

Как цефуроксим, так и цефепим вызывали статистически значимое снижение уровня

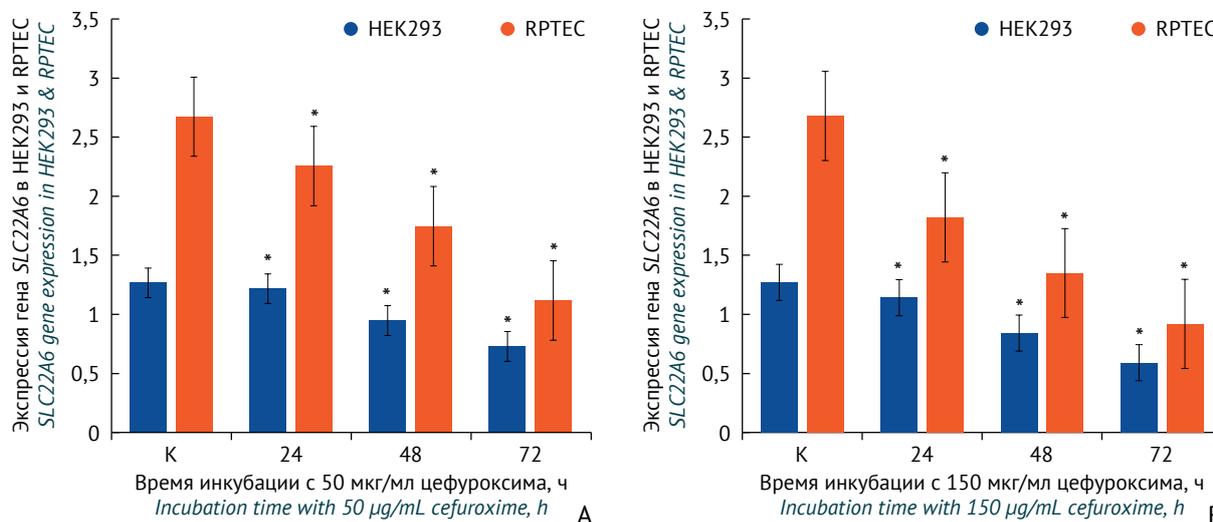


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *SLC22A6* (OAT1) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом в концентрациях 50 мкг/мл (А) и 150 мкг/мл (В). К — отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * — уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 1. *SLC22A6* (OAT1) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 50 µg/mL (A) and 150 µg/mL (B) of cefuroxime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

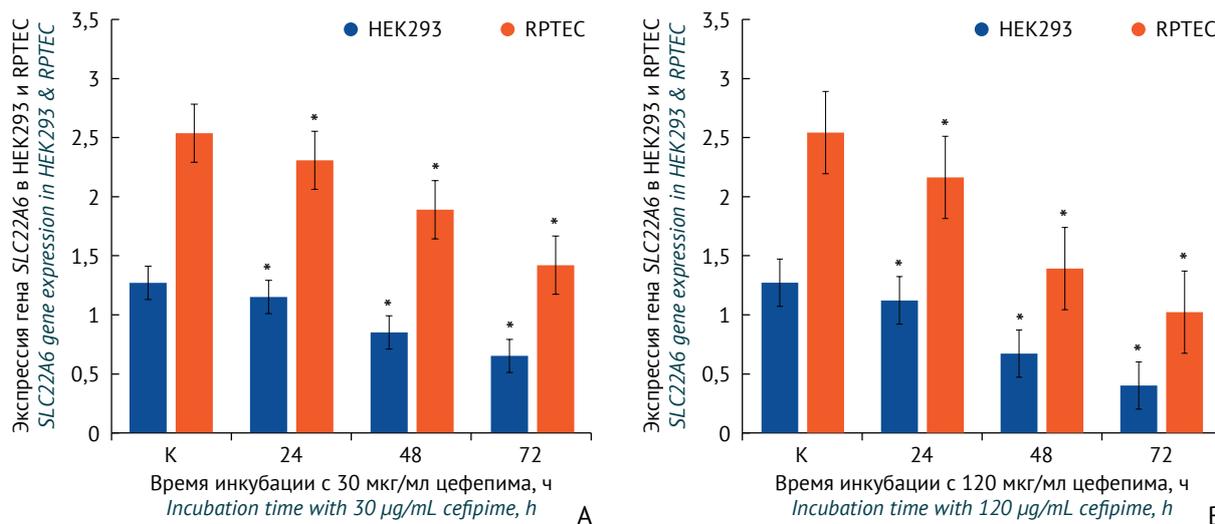


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *SLC22A6* (*OAT1*) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефепимом в концентрации 30 мкг/мл (А) и 120 мкг/мл (В). К – отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * – уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 2. *SLC22A6* (*OAT1*) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 30 µg/mL (A) and 120 µg/mL (B) of cefuroxime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

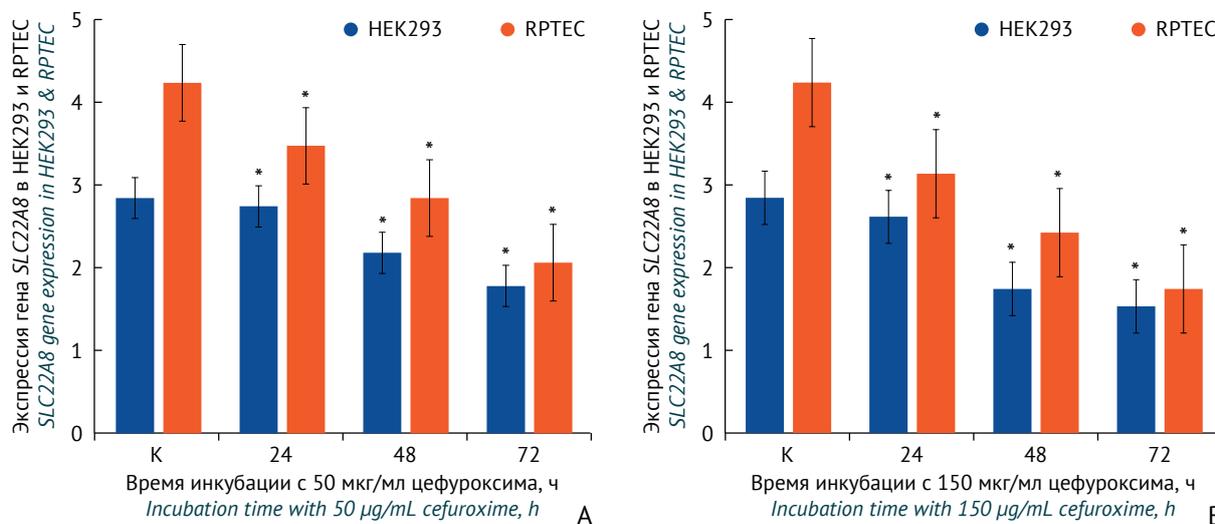


Рис. 3. Уровень экспрессии гена *SLC22A8* (*OAT3*) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом в концентрациях 50 мкг/мл (А) и 150 мкг/мл (В). К – отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * – уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 3. *SLC22A8* (*OAT3*) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 50 µg/mL (A) and 150 µg/mL (B) of cefuroxime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

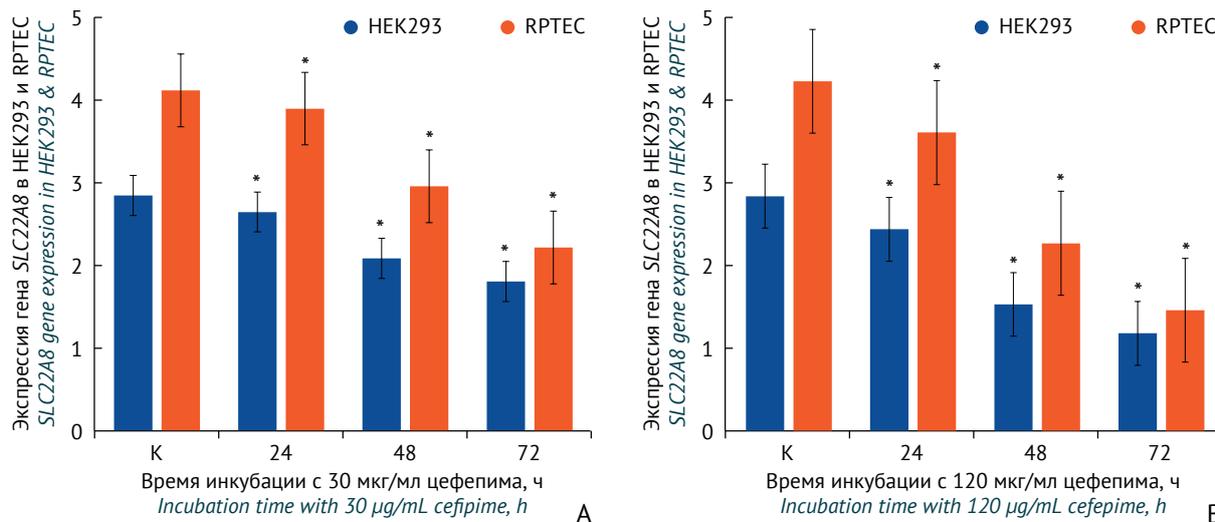


Рис. 4. Уровень экспрессии гена *SLC22A8* (OAT3) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефепимом в концентрациях 30 мкг/мл (А) и 120 мкг/мл (В). К – отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * – уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 4. *SLC22A8* (OAT3) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 30 µg/mL (A) and 120 µg/mL (B) of cefepime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

экспрессии генов транспортеров *SLC22A6* (OAT1) и *SLC22A8* (OAT3) в обеих клеточных линиях, причем для клеток линии RPTEC оно более выражено.

Влияние цефуроксима и цефепима на активность каспаз 3 и 7

Для оценки влияния цефалоспоринов на активацию каспаз в клеточных линиях HEK293

и RPTEC методом флуориметрии проводили качественное сравнение базового уровня флуоресценции в контрольных клетках с флуоресценцией в клетках, инкубированных с цефалоспоринами. Результаты флуориметрического теста на каспазы 3 и 7 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом (50 и 150 мкг/мл) и цефепимом (30 и 120 мкг/мл) представлены в *таблице 2*.

Таблица 2. Влияние концентрации и времени воздействия цефуроксима и цефепима на активность каспаз 3/7 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC

Table 2. Effects of cefuroxime and cefepime concentrations and exposure periods on caspase 3/7 activity in HEK293 and RPTEC cell lines

Название препарата <i>Name of the medicinal product</i>	Концентрация препарата, мкг/мл <i>Concentration of the medicinal product, mg/mL</i>	Клеточная линия HEK293 <i>HEK293 cell line</i>			Клеточная линия RPTEC <i>RPTEC cell line</i>		
		24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>	72 ч <i>72 h</i>	24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>	72 ч <i>72 h</i>
Цефуроксим <i>Cefuroxime</i>	50	-	-	+	-	-	-
	150	+	+	+	+	+	+
Цефепим <i>Cefepime</i>	30	-	-	-	-	-	+
	120	-	+	нет данных <i>no data</i>	+	+	+

Примечание. «-» – отсутствие активации каспаз 3/7; «+» – активация каспаз 3/7.
 Note. -, no caspase 3/7 activation observed; +, caspase 3/7 activation observed.

Результаты флуориметрического теста показывают, что при стандартных концентрациях цефуроксима и цефепима (50 и 30 мкг/мл) в клеточной линии HEK293 не было отмечено активации каспаз в течение 72 ч, а в клеточной линии RPTEC активация наблюдалась только на третьи сутки инкубации с цефепимом. При высокой концентрации цефуроксима (150 мкг/мл) активация каспаз наблюдалась уже через 24 ч в обеих клеточных линиях. При повышенной концентрации цефепима (120 мкг/мл) в клеточной линии HEK293 активация каспаз выявлена на вторые сутки, а в клеточной линии RPTEC — уже на первые сутки. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности клеточной линии RPTEC к токсическому действию цефалоспоринов по сравнению с клеточной линией HEK293. Время активации каспаз в обеих клеточных линиях зависело не только от периода инкубации с препаратом группы цефалоспоринов, но также от концентрации препаратов.

Выводы

1. Клеточная линия RPTEC является более чувствительной, чем клеточная линия HEK293,

к токсическому действию цефалоспоринов цефуроксима и цефепима, что коррелирует со статистически значимым повышенным уровнем экспрессии транспортеров OAT в клеточной линии RPTEC.

2. Активация каспаз 3/7, наблюдающаяся при инкубации в клеточных линиях HEK293 и RPTEC, подтверждает инициацию апоптоза по митохондриальному пути.

3. В обеих клеточных линиях инкубация с цефуроксимом и цефепимом в высоких дозах (150 и 120 мкг/мл соответственно) вызывает статистически значимое понижение уровня экспрессии генов транспортеров OAT1 и OAT3.

4. Инкубация с цефалоспоринами вызывает активацию каспаз 3 и 7 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC только при повышенных концентрациях препаратов.

Экспериментальная модель на основе клеточной линии RPTEC является перспективной для проведения анализа нефротоксических свойств различных препаратов.

Литература / References

- Huang JX, Kaeslin G, Ranall MV, Blaskovich MA, Becker B, Butler MS, et al. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacol Res Perspect*. 2015;3(3):e00148. <https://doi.org/10.1002/prp2.148>
- Aschauer L, Carta G, Vogelsang N, Schlatter E, Jennings P. Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt A):95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.003>
- Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(10):629–46. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>
- Zazuli Z, Otten LS, Drögemöller BI, Medeiros M, Monzon JG, Wright GEB, et al. Outcome definition influences the relationship between genetic polymorphisms of ERCC1, ERCC2, SLC22A2 and cisplatin nephrotoxicity in adult testicular cancer patients. *Genes (Basel)*. 2019;10(5):364. <https://doi.org/10.3390/genes10050364>
- Servais H, Ortiz A, Devuyt O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis*. 2008;13(1):11–32. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0151-z>
- Wilmer MJ, Saleem MA, Masereeuw R, Ni L, van der Velden TJ, Russel FG, et al. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res*. 2010;339(2):449–57. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0882-y>
- Fisel P, Renner O, Nies AT, Schwab M, Schaeffeler E. Solute carrier transporter and drug-related nephrotoxicity: the impact of proximal tubule cell models for preclinical research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(3):395–408. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.876990>
- Mac K, Chavada R, Paull S, Howlin K, Wong J. Cefepime induced acute interstitial nephritis – a case report. *BMC Nephrol*. 2015;16:15. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0004-x>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *В.А. Евтеев* – идея и дизайн эксперимента, измерение экспрессии генов, тест на каспазы, написание и редактирование текста рукописи; *И.С. Семенова* – культивирование клеточных линий HEK293 и RPTEC, инкубация клеток с цефалоспоринами; *Н.Д. Бунятян* и *А.Б. Прокофьев* – руководство и общий контроль над экспериментом, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400082-4).

Конфликт интересов. А.Б. Прокофьев является членом редколлегии журнала «Безопасность и риск фармакотерапии». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Vladimir A. Evteev* elaborated the study idea and experiment design, measured gene expression, conducted the caspase assay, drafted and edited the manuscript. *Irina S. Semenova* cultured HEK293 and RPTEC cell lines and incubated the cells with cephalosporins. *Natalya D. Bunyatyan* and *Alexey B. Prokofiev* provided guidance and general supervision for the experiment and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400082-4).

Conflict of interest. Alexey B. Prokofiev is a member of the Editorial Board of *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Евтеев Владимир Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>
evteev@expmed.ru

Семенова Ирина Семеновна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9026-0508>
semenovais@expmed.ru

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, профессор

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
bunyatyan@expmed.ru

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, профессор

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>
prokofiev@expmed.ru

Поступила 28.04.2022

После доработки 14.04.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Vladimir A. Evteev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>
evteev@expmed.ru

Irina S. Semenova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9026-0508>
semenovais@expmed.ru

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.),

Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
bunyatyan@expmed.ru

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.),

Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>
prokofiev@expmed.ru

Received 28 April 2022

Revised 14 April 2023

Accepted 6 June 2023

УДК 615.03:547.99

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-341>

Оригинальная статья | Original article



Производные тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов как потенциальные нейропротекторы

Н.А. Лозинская^{1,2,✉}, А.А. Морозов¹, Д.Р. Базанов¹, Е.Р. Милаева^{1,2}, Д.А. Арешидзе³,
П.Н. Шевцов², Л.Н. Петрова², Е.Ф. Шевцова²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация

² Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук» (ИФВ РАН), Северный проезд, д. 1, Московская область, г. Черноголовка, 142432, Российская Федерация

³ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», ул. Цюрупы, д. 3, Москва, 117418, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Лозинская Наталья Александровна natalylozinskaya@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Применяемые в клинической практике лекарственные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера, в основном обладают компенсаторным усиливающим нейротрансмиттерный сигнал механизмом действия. Поиск новых препаратов, сочетающих когнитивно-стимулирующий, нейропротекторный и болезнь-специфический эффекты благодаря мультитаргетному механизму действия, в частности включающему предотвращение глутамат-индуцированного захвата кальция нейронами и стабилизацию микротрубочек, представляется актуальной задачей.

Цель работы: поиск потенциальных лекарственных средств с нейропротекторным и корректирующим таупатию потенциалом в ряду новых тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов.

Материалы и методы: изучена способность тиурониевых солей, новых производных тиомочевин, блокировать глутамат-индуцированный захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ синапсосомами мозга крыс линии Wistar. Проведена оценка влияния новых соединений на полимеризацию препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков из мозга мышей линии C57bl в присутствии гуанозинтрифосфата по специфическому изменению светопоглощения при 355 нм, вызванному образованием микротрубочек (внутриклеточных структур, входящих в состав цитоскелета). Структуру образовавшихся микротрубочек анализировали после негативного контрастирования с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Определение IC_{50} новых соединений и статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартных программ (Excel и PRIZM GraphPad 6.02).

Результаты: разработан алгоритм скрининга ряда новых производных тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов и проведено изучение их биологической активности в тестах по влиянию на глутамат-индуцированный захват кальция синапсосомами и на процессы сборки микротрубочек. Выявлены соединения, способные подавлять глутамат-индуцированный захват кальция синапсосомами, то есть обладающие нейропротекторным потенциалом. Для ряда новых соединений обнаружена способность стимулировать процессы ГТФ-зависимой сборки микротрубочек. Обнаружено соединение – гидробромид изопропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилиמידотиокарбамата, – в присутствии которого наблюдается образование микротрубочек нормальной структуры, что делает его перспективной основой для дальнейшей структурной оптимизации.

© Н.А. Лозинская, А.А. Морозов, Д.Р. Базанов, Е.Р. Милаева, Д.А. Арешидзе, П.Н. Шевцов, Л.Н. Петрова, Е.Ф. Шевцова, 2023

Выводы: результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о перспективности химической модификации тиурониевых солей для создания эффективных нейропротекторов и стабилизаторов микро-трубочек.

Ключевые слова: тиурониевые соли; вицинальные диамины; микро-трубочки; эксайтотоксичность; нейро-протекция; таупатия; болезнь Альцгеймера; доклинические исследования

Для цитирования: Лозинская Н.А., Морозов А.А., Базанов Д.Р., Милаева Е.Р., Арешидзе Д.А., Шев-цов П.Н., Петрова Л.Н., Шевцова Е.Ф. Производные тиурониевых солей на основе вицинальных диами-нов как потенциальные нейропротекторы. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):165–175. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-341>

Thiouronium Salt Derivatives Based on Vicinal Diamines as Potential Neuroprotectors

N.A. Lozinskaya^{1,2,✉}, A.A. Morozov¹, D.R. Bazanov¹, E.R. Milaeva^{1,2}, D.A. Areshidze³, P.N. Shevtsov², L.N. Petrova², E.F. Shevtsova²

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University
1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

² Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences (IPAC RAS)
1 Severny Dr., Chernogolovka, Moscow Region 142432, Russian Federation

³ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery"
3 Tsyurupa St., Moscow 117418, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Natalia A. Lozinskaya** natalylozinskaya@mail.ru

ABSTRACT

Most of the medicinal products that are currently approved and used in clinical practice for neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, have a compensatory mechanism of action that enhances neurotransmitter signalling. It is an urgent need to develop new medicinal products combining cognitive-enhancing, neuroprotective, and disease-specific effects resulting from a multi-target mechanism of action including, in particular, prevention of glutamate-induced neuronal calcium uptake and stabilisation of microtubules.

The aim of this study was to search for potentially neuroprotective and tauopathy-alleviating medicines amongst new thiouronium salt derivatives based on vicinal diamines.

Materials and methods. The study investigated the ability of thiouronium salts to block glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by synaptosomes prepared from the brain of Wistar rats. The authors evaluated effects of these new compounds on polymerisation of a preparation of C57bl mouse brain tubulin and microtubule-associated proteins. The evaluation was carried out in the presence of guanosine triphosphate (GTP) and based on specific absorbance changes at 355 nm due to formation of microtubules. The authors analysed the structure of these microtubules, using negative staining followed by transmission electron microscopy. The IC_{50} determination and the statistical analysis were performed using standard software (Excel and PRISM 6.02).

Results. The authors developed a screening algorithm for a number of new thiouronium salt derivatives based on vicinal diamines and studied biological activity of these derivatives by the effects on glutamate-induced calcium uptake by synaptosomes and on microtubule assembly processes. The authors identified compounds suppressing glutamate-induced calcium uptake by synaptosomes, i.e. compounds with neuroprotective potential. In addition, a number of new compounds were able to stimulate GTP-dependent microtubule assembly processes. The authors observed formation of microtubules with a normal structure in the presence of isopropyl-*N'*-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-*N*-ethylimidothiocarbamate hydrobromide and considered the compound a promising scaffold for further optimisation.

Conclusions. Chemical modification of thiouronium salts is a promising direction for developing effective neuroprotectors and microtubule stabilisers.

Key words: thiouronium salts; thiourea; vicinal diamines; microtubules; excitotoxicity; neuroprotection; tauopathy; Alzheimer's disease; preclinical studies

For citation: Lozinskaya N.A., Morozov A.A., Bazanov D.R., Milaeva E.R., Areshidze D.A., Shevtsov P.N., Petrova L.N., Shevtsova E.F. Thiouronium salt derivatives based on vicinal diamines as potential neuroprotectors. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):165–175. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-341>

Введение

Ряд нейродегенеративных патологий, таких как мозговая ишемия, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, сопровождается избыточной выработкой эндогенного глутамата в пресинаптических окончаниях, что оказывает токсическое действие на нейроны. Механизм эксайтотоксичности, которую определяют как нарушение функционирования и гибель нейронов в результате пролонгированного или избыточного воздействия возбуждающих аминокислот, в частности глутамата, в значительной степени связан с нарушением гомеостаза кальция внутри нейронов, приводящего к развитию ряда патологических процессов в нервной клетке [1]. Поиск ингибиторов глутамат-стимулированного входа кальция в нейроны может рассматриваться как перспективный подход к разработке новых нейропротекторов.

В последнее время значительное внимание уделяется разработке так называемых «болезнь-модифицирующих» препаратов как перспективных лекарственных средств, в том числе при тяжелых неврологических заболеваниях [2]. Одним из таких направлений является создание стабилизаторов микротрубочек – внутриклеточных структур, входящих в состав цитоскелета, – способных компенсировать возрастающую при таупатии деполимеризацию микротрубочек. Агрегаты гиперфосфорилированного тау-белка являются основным компонентом характерных для болезни Альцгеймера нейрофибриллярных пучков. Компенсация лекарственными препаратами утраченной в результате патологического гиперфосфорилирования и агрегации способности тау-белка стабилизировать структуру микротрубочек может обеспечить нормализацию аксонального транспорта в нейронах, способствовать росту аксонов [3].

Тиурониевые и изотиурониевые соли (производные тиомочевин) представляют интерес как фармакологически активные соединения благодаря уникальной структуре, определяющей, с одной стороны, растворимость в воде за счет

полярной солевой структуры, а с другой – обеспечивающей биологическую активность за счет липофильных фармакофорных заместителей. Благодаря высокой вариативности структурных модификаций тиурониевые соли проявляют широкий спектр биологической активности [4]. Среди них можно выделить ингибиторы NO-синтазы [5, 6], соединения, обладающие антимикробным [6, 7], противоопухолевым действием [8–11], ингибиторы H₂- и H₃-гистаминных рецепторов [12, 13]. Производные тиомочевин способны образовывать стабильные комплексы с ионами различных металлов. Со способностью производных тиомочевин к комплексообразованию с щелочноземельными металлами, вероятно, связано их влияние на натрий-кальциевый обмен в клетках [14, 15]. Для ряда производных тетразамещенных тиурониевых солей была показана способность ингибировать активность NMDA-подтипа глутаматных рецепторов и одновременно активировать AMPA-подтип глутаматных рецепторов, что может обуславливать когнитивно-стимулирующие свойства таких соединений [16].

Цель работы – поиск потенциальных лекарственных средств с нейропротекторным и таупатия-корректирующим потенциалом в ряду новых производных тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов.

Материалы и методы

Синтез тиурониевых солей на основе производных вицинальных диаминов. Производные тиурониевых солей были синтезированы в четыре стадии в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1. Реакцией бензальдегида с ацетатом аммония с последующим кислотным гидролизом был получен N-(2-амино-1,2-дифенилэтил)бензамид в соответствии с методикой, описанной в работе [17]. Далее реакцией с этил- и фенилизоцианатами, выбранными в качестве модельных, синтезированы тиомочевинны, которые были проалкилированы с образованием тиурониевых солей¹. Соединения, исследованные в работе, представлены в таблице 1.

¹ Лозинская НА. Синтетический дизайн в реакции ароматических альдегидов с аммиаком: дис. ... канд. хим. наук. М.; 2003.

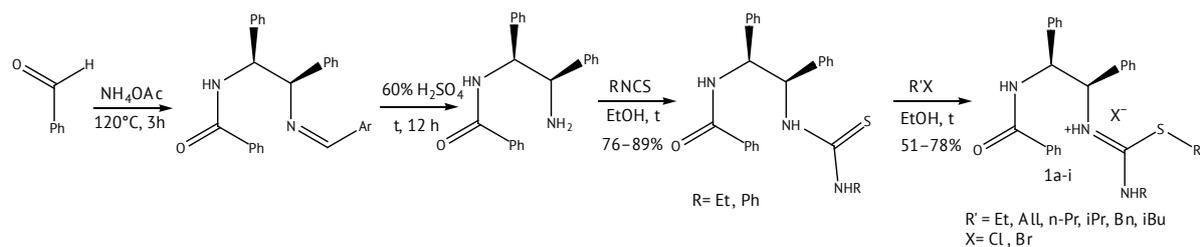


Рис. 1. Синтез новых производных тиурониевых солей на основе vicинальных диаминов. Ar – арил; Ph – фенил; Et – этил; All – аллил; Bn – бензил; nPr – n-пропил; iBu – изобутил; iPr – изопротил

Fig. 1. Synthesis of new thiuronium salt derivatives based on vicinal diamines. Ar, aryl; Ph, phenyl; Et, ethyl; All, allyl; Bn, benzyl; nPr, n-propyl; iBu, isobutyl; iPr, isopropyl

Таблица 1. Производные тиурониевых солей, исследованные в работе

Table 1. Thiuronium salt derivatives studied

Название соединения <i>Name of the compound</i>	Код соединения <i>Code of the compound</i>	Заместители <i>Substituents</i>
Этил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Ethyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1a	Ar = Ph, R = Et, R' = Et, X = Br
Аллил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Allyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1b	Ar = Ph, R = Et, R' = All, X = Br
Бензил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -этилимидотиокарбамат гидрохлорид <i>Benzyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrochloride</i>	1c	Ar = Ph, R = Et, R' = Bn, X = Cl
<i>n</i> -Пропил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -этилимидотиокарбамат гидробромид <i>n-Propyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1d	Ar = Ph, R = Et, R' = nPr, X = Br
Изобутил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Isobutyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1e	Ar = Ph, R = Et, R' = iBu, X = Br
Изопропил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Isopropyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1f	Ar = Ph, R = Et, R' = iPr, X = Br
Пропил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -фенилимидотиокарбамат гидробромид <i>Propyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-phenylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1g	Ar = Ph, R = Ph, R' = nPr, X = Br
Этил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -фенилимидотиокарбамат гидробромид <i>Ethyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-phenylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1h	Ar = Ph, R = Ph, R' = Et, X = Br
Изопропил- <i>N'</i> -[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]- <i>N</i> -фенилимидотиокарбамат гидробромид <i>Isopropyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-phenylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1i	Ar = Ph, R = Ph, R' = iPr, X = Br

Примечание. Ar – арил; Ph – фенил; Et – этил; All – аллил; Bn – бензил; nPr – *n*-пропил; iBu – изобутил; iPr – изопротил.

Note. Ar, aryl; Ph, phenyl; Et, ethyl; All, allyl; Bn, benzyl; nPr, *n*-propyl; iBu, isobutyl; iPr, isopropyl.

Лабораторные животные. В эксперименте были использованы 9–10-дневные новорожденные крысы линии Wistar и 2–3-месячные мыши линии C57bl, полученные из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА». Используемые в исследовании манипуляции

с животными были одобрены на заседании биоэтической комиссии ИФАВ РАН, протокол заседания от 29.11.2019 № 41.

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных,

используемых в научных целях, и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

Изучение влияния производных тиуониевых солей на глутамат-индуцируемый захват кальция синапсосомами. Р2-фракцию синапсосом выделяли из мозга 9–10-дневных новорожденных крыс линии Wistar по стандартной методике Хайоша [18]. Первичный скрининг влияния соединений на индуцированную 200 мкМ глутаминовой кислотой стимуляцию глутаматных рецепторов и последующий захват радиоизотопа кальция $^{45}\text{Ca}^{2+}$ синапсосомами проводили при стандартной концентрации тестируемого вещества 100 мкМ согласно описанному ранее методу [19].

Для соединений, которые при концентрации 100 мкМ ингибировали захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы коры мозга более чем на 50%, была изучена концентрационная зависимость их влияния на глутамат-индуцированный захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ синапсосомами и определена IC_{50} – концентрация вещества, при которой происходит 50%-ингибирование глутамат-индуцированного захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Расчет IC_{50} проводили с помощью программы Prism 6.02 (GraphPad, США).

Оценка влияния соединений на полимеризацию тубулина и микротубулоассоциированных белков (МАБ) и структуру полученных микротрубочек. Кору мозга мышей линии C57bl выделяли на холоде сразу после цервикальной транслокации. Свежий мозг помещали на лед, очищали от оболочек и кровеносных сосудов и промывали охлажденным буфером «А»: 50мМ Tris-HCl, (pH = 6,9), 2 мМ EGTA (этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота). Выделенную мозговую ткань гомогенизировали в том же буфере с использованием гомогенизатора Potter S (Sartorius, Германия). Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 г в течение 30 мин на центрифуге Avanti 25 (Beckman Coulter, США), ротор JA-14 для осаждения неразрушенных клеток. Полученный осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали повторно при 100000 г в течение 60 мин при температуре 4 °С на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman Coulter, США), ротор TLA-120.

Полученный супернатант, представляющий собой цитозольную фракцию, обогащенную тубулином и микротубулоассоциированными белками (Тб+МАБ), использовали для дальнейшей очистки путем проведения цикла сборки-разборки микротрубочек. Для этого суперна-

тант разбавляли буфером «А» до концентрации белка 30 мг/мл и полученный белковый раствор разбавляли в 2 раза буфером «Б»: 50 мМ Tris-HCl (pH = 6,9), 0,2 мМ GTP (гуанозинтрифосфат), 4 мМ MgCl_2 . Далее эту фракцию помещали в термостат при температуре 37 °С на 6 ч для формирования микротрубочек. После окончания срока инкубации супернатант центрифугировали на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор TLA-120, 100000 г, при температуре 28 °С в течение 1 ч для осаждения сформировавшихся микротрубочек. После центрифугирования супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в холодном буфере «А», объем которого в 10 раз меньше, чем объем экстракта при инкубации в термостате. Полученную взвесь инкубировали при температуре 0 °С в течение 30–60 мин для деполимеризации полученных микротрубочек. Суспензию, содержащую недеполимеризовавшиеся микротрубочки, растворенные тубулин и МАБ, центрифугировали на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор TLA-120, 100000 г в течение 60 мин при 2–4 °С. Осадок, содержащий недеполимеризовавшиеся микротрубочки, отбрасывали, в супернатанте грубого препарата тубулина и МАБ определяли концентрацию белка методом Бредфорда, используя набор фирмы Био-Рад (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad, США), в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя; аликвоты замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °С.

Влияние соединений на гуанозинтрифосфат-зависимую (ГТФ-зависимую) сборку микротрубочек из грубого препарата Тб+МАБ определяли в 384-луночных планшетах согласно методике². Процесс полимеризации исследовали спектрофотометрически, регистрируя изменения во времени светопоглощения суспензии при температуре 30 °С при длине волны $\lambda = 355$ нм на планшетном ридере Wallac 1420 Victor (Perkin Elmer, Финляндия). Значения максимальной скорости изменения светопоглощения (V_{\max}) на определенном отрезке времени определяли как производную изменения светопоглощения при длине волны 355 нм (A_{355}) во времени: $V_{\max} = (dA_{355}/dt)_{\max}$ (%) в отсутствие (контрольная проба) или в присутствии исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ. Затем эти значения нормализовали: значение 0 соответствовало нулевой скорости изменения светопоглощения, за 100% принимали скорость

² Методика оценки влияния соединений на полимеризацию тубулина. СТП-14.621.21.0008.01-2015. ИФАВ РАН; 2015. https://ipac.ac.ru/docs/ckp/metod_6.pdf

изменения светопоглощения в контрольных пробах, состав которых повторял состав опытных проб, но вместо соединений присутствовал равный объем растворителя диметилсульфоксида (ДМСО; ПанЭко, Россия). Все измерения проведены как минимум в трех повторах. Достоверность различий скоростей полимеризации в присутствии соединений от скоростей в контрольных пробах определяли по непараметрическому критерию Манна–Уитни с использованием программы Prism 6.02 (GraphPad, США). Электронно-микроскопическое исследование структуры образованных микротрубочек проводили методом негативного контрастирования [20] на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss Meditec AG, Германия).

В работе использовали оборудование исследовательской базы «Центр коллективного пользования ИФВ РАН» (FFSN-2021-0005).

Статистическая обработка результатов и определение IC_{50} методом нелинейной регрессии проведены с использованием программы Prism 6.02 (GraphPad, США).

Результаты и обсуждение

Биологическая активность тиурониевых солей **1a–1i** была изучена на моделях эксайтотоксичности и полимеризации тубулина.

Оценка влияния на глутамат-стимулированный захват ионов кальция в синапсомы. Для первичной оценки нейропротекторных свойств соединений была использована модель эксайтотоксичности *in vitro*, позволяющая оценить способность полученных производных тиурониевых солей ингибировать глута-

мат-стимулированный Ca^{2+} -захват по сравнению с контрольной пробой [18, 19]. В результате первичного скрининга были выделены активные соединения, которые при концентрации 100 мкМ ингибировали захват $^{45}Ca^{2+}$ в синапсомы коры мозга более чем на 50%, затем для этих соединений-лидеров была определена IC_{50} (табл. 2).

Тиурониевые соли **1a–1e**, содержащие этильный заместитель, являлись более эффективными ингибиторами глутамат-стимулированного захвата кальция синапсомы, чем фенильные производные **1g–1i**. Наибольшая биологическая активность была отмечена для соединений, содержащих 3–4 атома углерода в алкильной цепи. Дальнейшее увеличение длины цепи нецелесообразно, так как растворимость подобных производных в воде и буферных растворах резко снижается, что делает проблематичным изучение их биологической активности *in vitro*. Вероятно, с пониженной растворимостью в воде связана и более низкая активность соединений, содержащих повышенное количество ароматических заместителей. Отметим, что замена фенильного заместителя в вицинальном диамине на гетероциклический либо введение в структуру вицинального диамина дополнительных заместителей (например, метокси-групп) снижает активность полученных соединений. Этот факт позволяет предположить, что именно бензиламинный фрагмент играет существенную роль в процессе связывания с глутаматным рецептором и тем самым влияет на ингибирующую способность данных веществ.

Таким образом, было найдено пять соединений, обладающих выраженной способностью

Таблица 2. Влияние производных тиурониевых солей на глутамат-стимулированный захват ионов кальция синапсомы

Table 2. Effects of thiuronium salt derivatives on glutamate-stimulated uptake of calcium ions by synaptosomes

Код соединений <i>Code of the compound</i>	Заместители <i>Substituents</i>	IC_{50} , мкМ <i>IC₅₀, μM</i>
1a	Ar = Ph, R = Et, R' = Et, X = Br	128,8 ± 11,8
1b	Ar = Ph, R = Et, R' = All, X = Br	44,7 ± 7,2
1c	Ar = Ph, R = Et, R' = Bn, X = Cl	40,7 ± 9,4
1d	Ar = Ph, R = Et, R' = nPr, X = Br	24,5 ± 8,6
1e	Ar = Ph, R = Et, R' = iBu, X = Br	19,5 ± 8,1

Примечание. IC_{50} – концентрации вещества, при которой происходит 50%-ное ингибирование глутамат-стимулированного захвата Ca^{2+} , данные представлены как $M \pm SD$ (среднее значение ± стандартное отклонение); Ar – арил; Ph – фенил; Et – этил; All – аллил; Bn – бензил; nPr – *n*-пропил; iBu – изобутил.

Note. IC_{50} is the substance concentration required for 50% inhibition of glutamate-stimulated Ca^{2+} uptake; the data are presented as $M \pm SD$ (mean ± standard deviation). Ar, aryl; Ph, phenyl; Et, ethyl; All, allyl; Bn, benzyl; nPr, *n*-propyl; iBu, isobutyl.

ингибировать глутамат-стимулированный захват ионов кальция (табл. 2). Соединения **1d** и **1e**, IC₅₀ которых составила 24,5 и 19,5 мкМ соответственно, могут быть использованы для дальнейшей разработки новых нейропротекторов на их основе.

Оценка влияния производных тиурониевых солей на полимеризацию грубого препарата тубулина и МАБ, а также на структуру полученных микротрубочек. Первичный скрининг потенциальных стабилизаторов микротрубочек среди полученных соединений проводили *in vitro* в системе ГТФ-зависимой полимеризации препарата тубулина и МАБ согласно методике [20]. Была показана способность четырех производных тиурониевых солей этилендиаминов в концентрации 0,1 мМ стимулировать ГТФ-зависимую полимеризацию (рис. 2).

В контрольной пробе (1% раствор ДМСО в отсутствие добавок производных тиурониевых солей) наблюдался практически линейный рост светопоглощения при длине волны 355 нм в течение 2 ч (рис. 2, табл. 3), что является маркером процесса полимеризации. Такая же линейная зависимость наблюдалась и для пробы с соединением **1f**, содержащим три фенильных заместителя, но при этом максимальная скорость полимеризации превышала скорость полимеризации в контрольной пробе почти в 1,5 раза. В то же время для соединений **1g**, **1h** и **1i**, содержащих четыре фенильных заместителя, кинетика процесса полимеризации, наблюдаемая

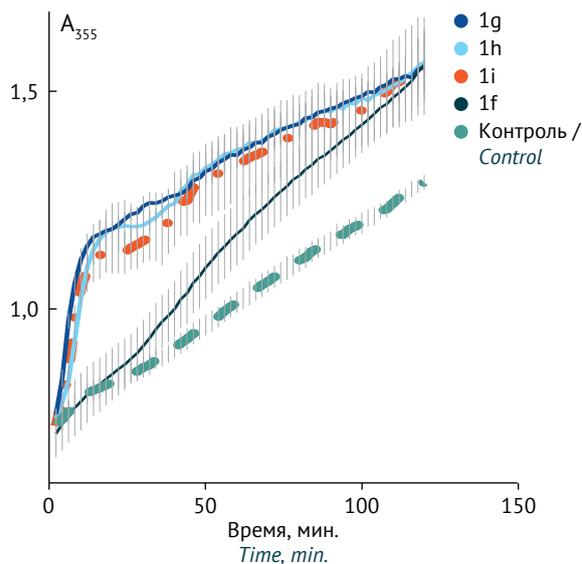


Рис. 2. Влияние производных тиурониевых солей **1f**, **1g**, **1h**, **1i** на полимеризацию препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков при концентрации соединений 100 мкМ. A₃₅₅ – светопоглощение при длине волны 355 нм; данные представлены как M ± SD (среднее значение ± стандартное отклонение), область стандартных отклонений обозначена штриховкой

Fig. 2. Effects of thiuronium salt derivatives **1f**, **1g**, **1h**, and **1i** (100 μM) on polymerisation of a preparation of tubulin and microtubule-associated proteins. A₃₅₅ denotes absorbance at 355 nm. The data are presented as M ± SD (mean ± standard deviation); the SD area is hatched

Таблица 3. Влияние активных производных тиурониевых солей **1f–1i** на скорость полимеризации препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков при концентрации соединений 100 мкМ

Table 3. Effects of active thiuronium salt derivatives **1f–1i** at 100 μM concentrations on the polymerisation rate of a preparation of tubulin and microtubule-associated proteins

Код соединения <i>Code of the compound</i>	Заместители <i>Substituents</i>	Скорость полимеризации, dA ₃₅₅ /dt (% от контроля) <i>Polymerisation rate, dA₃₅₅/dt (% of the control)</i>	
		2–12 мин <i>2–12 min</i>	50–70 мин <i>50–70 min</i>
1f	Ar = Ph, R = Et, R' = iPr, X = Br	118 ± 22	143 ± 10**
1g	Ar = Ph, R = Ph, R' = nPr, X = Br	574 ± 16***	75 ± 9*
1h	Ar = Ph, R = Ph, R' = Et, X = Br	484 ± 39***	67 ± 4**
1i	Ar = Ph, R = Ph, R' = iPr, X = Br	522 ± 106**	73 ± 9*

Примечание. Данные представлены как M ± SD (среднее значение ± стандартное отклонение, число измерений n = 3; Ar – арил; Ph – фенил; Et – этил; iPr – изопропил, nPr – n-пропил.

* уровень значимости p ≤ 0,05, тест Манна–Уитни; ** p ≤ 0,01, тест Манна–Уитни; *** p ≤ 0,001, тест Манна–Уитни.

Note. The data are presented as M ± SD (mean ± standard deviation); n = 3 (number of measurements). Ar, aryl substituent; Ph, phenyl; Et, ethyl; iPr, isopropyl; nPr, n-propyl.

* p ≤ 0.05 (probability level), Mann-Whitney test; ** p ≤ 0.01, Mann-Whitney test; *** p ≤ 0.001, Mann-Whitney test.

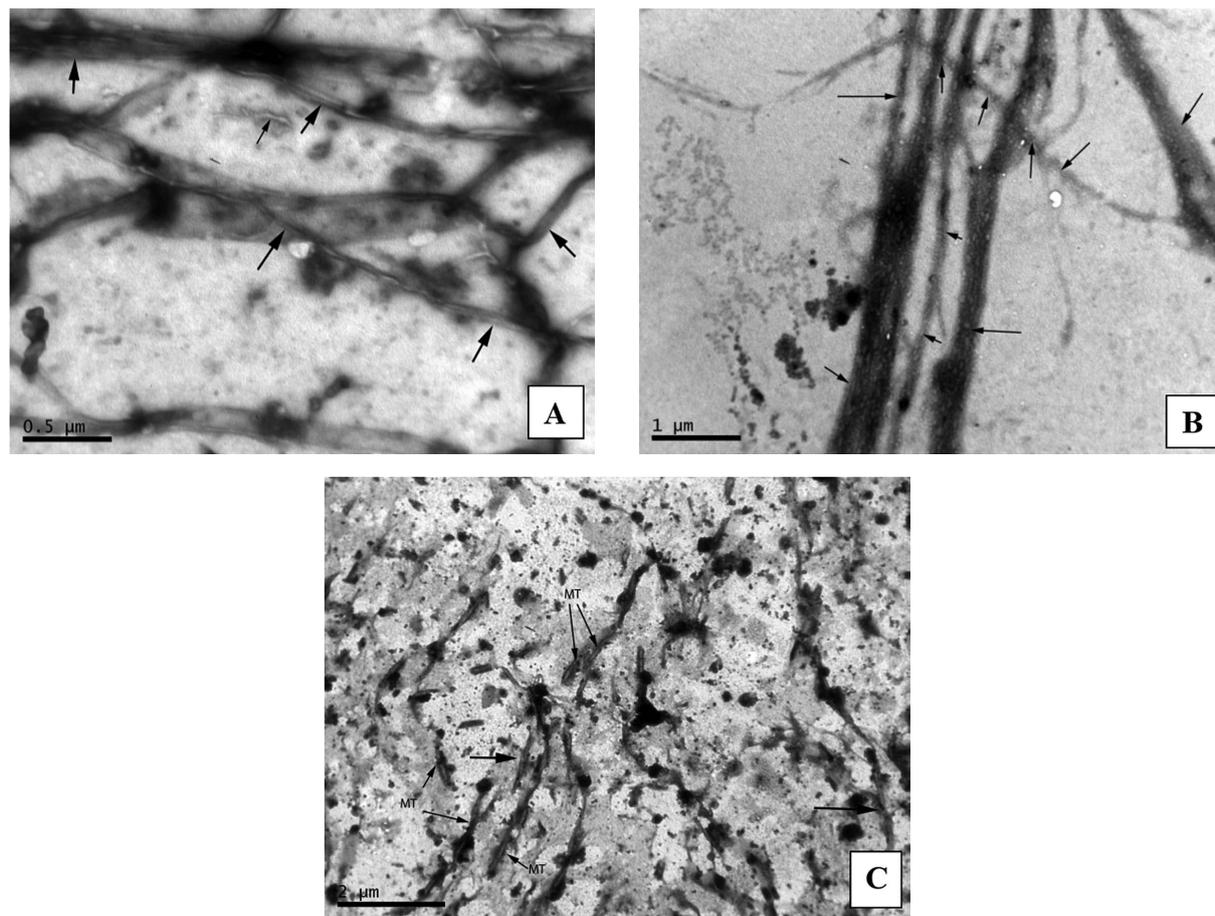


Рис. 3. Электронные микрофотографии структур, образованных в результате полимеризации *in vitro* препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков в контрольной пробе в отсутствие производных тиурониевых солей (A), в присутствии соединений **1f** (B) и **1g** (C) в концентрации 100 мкМ. Стрелками обозначены микротрубочки (MT). Трансмиссионную электронную микроскопию ($\times 10000$) проводили после полимеризации тубулина *in vitro*

Fig. 3. Electron micrographs of structures formed as a result of *in vitro* polymerisation of a preparation of tubulin and microtubule-associated proteins in a control sample (A) and in the presence of 100 μM of **1f** (B) or **1g** (C). Microtubules (MT) are indicated with arrows. Transmission electron microscopy ($\times 10,000$) was performed after *in vitro* tubulin polymerisation

на временном промежутке 2 ч, происходила в два этапа: на начальном этапе (до 12 мин) скорость полимеризации более чем в 5 раз превышала контроль, на втором этапе скорость полимеризации была незначительно ниже таковой в контрольной пробе.

Важным этапом работы явилось электронно-микроскопическое исследование с использованием негативного контрастирования [21] структур, образованных в результате полимеризации препарата тубулина и МАБ агрегатов (рис. 3). В контрольной пробе (рис. 3A) видны длинные, достаточно ровные и местами заметно лежащие попарно микротрубочки. Это соответствует нормальной структуре

микротрубочек. В пробе с этильным производным **1f** с линейным нарастанием агрегатов (рис. 3B) наряду с нормальными микротрубочками видны спутанные (перекрученные) пучки нормальных по длине микротрубочек. В пробе с соединением **1g** (рис. 3C) видны короткие фрагменты микротрубочек, некоторые микротрубочки скручены попарно (на рисунке показаны толстыми стрелками). Таким образом, при введении соединения **1g** наблюдается грубое нарушение стандартной структуры микротрубочек. При введении в пробу соединений **1h**, **1i** также отмечено образование аномальных структур – пучков, sheet-структур, сетеподобных структур.

Таким образом, в ряду синтезированных нами производных тиурониевых солей выделены соединения, обладающие способностью стимулировать полимеризацию тубулина. Электронно-микроскопическое исследование методом негативного контрастирования получаемых в результате ГТФ-зависимой полимеризации структур показало, что при введении в пробу соединений **1g**, **1h**, **1i** с четырьмя фенильными заместителями образуются структуры микротрубочек аномального строения. Это не позволяет однозначно считать такие соединения перспективными для дальнейшей разработки на их основе лекарственных препаратов для лечения таупатий. В то же время в пробе с соединением **1f** (изопропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилимидотиокарбамат гидробромид) формируются микротрубочки нормальной структуры наряду с образованием агрегатов в виде пучков. Можно предположить, что это соединения или его производные могут быть потенциальными стабилизаторами микротрубочек в условиях таупатии.

Заключение

Проведено изучение биологической активности новых производных тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов в тестах повлиянию на глутамат-индуцированный захват кальция синапсомы и на процессы сборки микротрубочек. Показано, что гидробромиды аллил-, бензил-, изобутил- и *n*-пропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилимидотиокарбаматов способны подавлять глутамат-индуцированный захват кальция синапсомы, то есть обладают нейропротекторным потенциалом. Для ряда новых соединений обнаружена способность стимулировать процессы ГТФ-зависимой сборки микротрубочек. Выделено соединение-хит (изопропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилимидотиокарбамат гидробромид), в присутствии которого наблюдалось образование микротрубочек нормальной структуры, что делает его перспективной основой для дальнейшей оптимизации.

Литература / References

- Binvignat O, Olloquequi J. Excitotoxicity as a target against neurodegenerative processes. *Curr Pharm Des.* 2020;26(12):1251–62. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200113162641>
- Bachurin SO, Bovina EV, Ustyugov AA. Current trends in the development of drugs for the treatment of Alzheimer's disease and their clinical trials. *Biomedical Chemistry: Research and Methods.* 2018;1(3):e00015. <https://doi.org/10.18097/BMCRM00015>
- Tan CC, Zhang XY, Tan L, Yu JT. Tauopathies: mechanisms and therapeutic strategies. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(2):487–508. <https://doi.org/10.3233/JAD-170187>
- Valeeva FG, Karimova TR, Pavlov RV, Bakhtiyarov DI, Sapunova AS, Ivshin KA, et al. Introduction of isothiuronium surfactant series: synthesis, structure-dependent aggregation overview and biological activity. *J Mol Liq.* 2021;324(15):114721–31. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114721>
- Jang D, Szabo C, Murrell GA. S-substituted isothiouras are potent inhibitors of nitric oxide biosynthesis in cartilage. *Eur J Pharmacol.* 1996;312(3):341–7. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00369-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00369-X)
- Kazimierczuk Z, Chalimoniuk M, Laudy AE, Mopuc R, Cedillo-Rivera R, Starosciak BJ, Chrapusta SJ. Synthesis and antimicrobial and nitric oxide synthase inhibitory activities of novel isothiouras derivatives. *Arch Pharm Res.* 2010;33(6):821–30. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0604-8>
- Galkina IV, Bakhtiyarov DI, Usupova LM, Gerasimov AV, Shulaeva MP, Pozdeev OK, et al. Antimicrobial activity of novel isothiuronium salts with 7-chloro-4,6-dinitrobenzofuroxan-5-olate anion. *Mendeleev Communications.* 2021;31(3):365–7. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.04.027>
- Ferreira M, Assunção LS, Silva AH, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB, Sá MM. Allylic isothiuronium salts: the discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017;129:151–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.013>
- Sun J, Wang J, Ma L, Jiang T, Li X, Guo Q, Li X, Sui Z. Determination and pharmacokinetic study of isothiuronium-modified pyrimidine-substituted curcumin analog (1G), a novel antitumor agent, in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):1505–12. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1602537>
- El-Henawy AA, Khowdiary MM, Badawi AB, Soliman HM. In vivo anti-leukemia, quantum chemical calculations and ADMET investigations of some quaternary and isothiuronium surfactants. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013;6(5):634–49. <https://doi.org/10.3390/ph6050634>
- Li ZH, Ma JL, Liu GZ, Zhang XH, Qin TT, Ren WH, et al. [1,2,3]Triazolo[4,5-d]pyrimidine derivatives incorporating (thio)urea moiety as a novel scaffold for LSD1 inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2020;187:111989. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111989>
- Fechner GA, Jacobs JJ, Parsons PG. Inhibition of melanogenesis in human melanoma cells by novel analogues of the partial histamine (H₂) agonist nordimaprit. *Biochem Pharmacol.* 1993;46(1):47–54. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90346-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90346-x)

13. Barnes JC, Brown JD, Clarke NP, Clapham J, Evans DJ, O'Shaughnessy CT. Pharmacological activity of VUF 9153, an isothiourea histamine H₃ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1993;250(1):147–52. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90632-R](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90632-R)
14. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22391–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22391>
15. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol.* 1996;119(3):555–63. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15708.x>
16. Прошин АН, Григорьев ВВ, Тихонова ИГ, Палюлин ВА, Бачурин СО. Тетразамещенные соли изотиуруния как мультитаргетные соединения, действующие на NMDA- и AMPA-рецепторы мозга. *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2015;(9):2189–94. Proshin AN, Grigor'ev VV, Tikhonova IG, Palyulin VA, Bachurin SO. Tetrasubstituted thiuronium salts as multitarget compounds affecting brain NMDA and AMPA receptors. *Russ Chem Bull.* 2015;64(9):2189–94. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1137-6>
17. Proskurnina MV, Lozinskaya NA, Tkachenko SE, Zefirov NS. Reaction of aromatic aldehydes with ammonium acetate. *Russian Journal of Organic Chemistry.* 2002;38(8):1149–53. <https://doi.org/10.1023/A:1020997325550>
18. Hajós F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 1975;93(3):485–9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90186-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90186-9)
19. Petrova LN, Bachurin SO. Specificity of glutamate receptors in P₂ synaptosomal fraction from rat brain cortex. *Bull Exp Biol Med.* 2006;142(1):43–6. <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0287-9>
20. Bachurin SO, Makhaeva GF, Shevtsova EF, Aksinenko AY, Grigoriev VV, Shevtsov PN, et al. Conjugation of aminoadamantane and γ -carboline pharmacophores gives rise to unexpected properties of multifunctional ligands. *Molecules.* 2021;26(18):5527. <https://doi.org/10.3390/molecules26185527>
21. Shevtsov PN, Shevtsova EF, Burbaeva GSh, Bachurin SO. Effects of anti-Alzheimer drugs on phosphorylation and assembly of microtubules from brain microtubular proteins. *Bull Exp Biol Med.* 2014;156(6):768–72. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2445-9>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.А. Лозинская – разработка стратегии исследования, контроль выполнения синтетической части исследования, редактирование текста рукописи; А.А. Морозов – синтез, аналитические исследования соединений, написание текста рукописи; Д.Р. Базанов – синтез и аналитические исследования соединений, написание и редактирование текста рукописи; Е.Р. Милаева – анализ и интерпретация результатов работы; Д.А. Арешидзе – проведение электронной микроскопии и анализ полученных результатов; П.Н. Шевцов – проведение тестов по сборке микротрубочек, проведение электронной микроскопии, написание соответствующих разделов рукописи; Л.Н. Петрова – проведение исследования по глутамат-индуцированному захвату кальция, написание текста рукописи; Е.Ф. Шевцова – разработка стратегии исследования, контроль выполнения исследования биологической активности, редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Используемые в данном исследовании манипуляции с животными были одобрены на заседании биоэтической комиссии ИФАВ РАН, протокол заседания от 29.11.2019 № 41.

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-13-00228.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Natalia A. Lozinskaya developed the research strategy, supervised the synthetic part of the study, and edited the manuscript. Alexey A. Morozov synthesised and analysed the compounds and drafted the manuscript. Daniil R. Bazanov synthesised and analysed the compounds, drafted and edited the manuscript. Elena R. Milaeva analysed and interpreted the study results. David A. Areshidze performed electron microscopy and analysed its results. Pavel N. Shevtsov conducted microtubule assembly tests and electron microscopy and wrote the corresponding part of the manuscript. Ludmila N. Petrova studied glutamate-induced calcium uptake and drafted the manuscript. Elena F. Shevtsova developed the research strategy, supervised biological activity testing in the study, and edited the manuscript.

Ethics approval. The animal manipulations reported in this study were approved at the meeting of the bioethics commission of the IPAC RAS, Protocol dated 29.11.2019 No. 41.

Acknowledgements. The study was carried out within the framework of the Russian Science Foundation's grant No. 22-13-00228.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Лозинская Наталья Александровна, канд. хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2518-3694>

natalylozinskaya@mail.ru

Морозов Алексей Андреевич.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5428-4641>

lexsusmoroz@gmail.com

Базанов Даниил Романович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9525-3275>

daniil_bazanov@mail.ru

Милаева Елена Рудольфовна, д-р хим. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5489-3866>

milaeva@org.chem.msu.ru

Арешидзе Давид Александрович, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>

labcelpat@mail.ru

Шевцов Павел Николаевич, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5960-3680>

shevt@dio.ru

Петрова Людмила Николаевна.

plv@chph.ras.ru

Шевцова Елена Феофановна, д-р хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2887-1185>

e.f.shevtsova@gmail.com

Natalia A. Lozinskaya, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2518-3694>

natalylozinskaya@mail.ru

Alexey A. Morozov.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5428-4641>

lexsusmoroz@gmail.com

Daniil R. Bazanov.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9525-3275>

daniil_bazanov@mail.ru

Elena R. Milaeva, Dr. Sci. (Chem.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5489-3866>

milaeva@org.chem.msu.ru

David A. Areshidze, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>

labcelpat@mail.ru

Pavel N. Shevtsov, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5960-3680>

shevt@dio.ru

Ludmila N. Petrova.

plv@chph.ras.ru

Elena F. Shevtsova, Dr. Sci. (Chem.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2887-1185>

e.f.shevtsova@gmail.com

Поступила 20.10.2022

После доработки 06.12.2022

Принята к публикации 13.02.2023

Online first 17.02.2023

Received 20 October 2022

Revised 6 December 2022

Accepted 13 February 2023

Online first 17 February 2023

УДК 615.243.4:615.076.9
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342>



Оригинальная статья | Original article



Изучение безопасности и токсикокинетики препарата эзомепразол в доклинических исследованиях

В.М. Косман¹✉, М.В. Карлина¹, Е.В. Мазукина¹, А.А. Глобенко², Е.А. Джайн²,
М.Н. Макарова¹, В.Г. Макаров¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», ул. Заводская, д. 3, к. 245, Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский, Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

² Акционерное общество «Валента Фарм», ул. Фабричная, д. 2, г. Щелково, Московская область, 141108, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Косман Вера Михайловна kosman.vm@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

Препараты эзомепразола, S-изомера омепразола, относят ко второму поколению ингибиторов протонной помпы и широко применяют в терапии кислотозависимых заболеваний пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки (язвенная болезнь, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь и др.). Для расширения ассортимента отечественных препаратов эзомепразола с модифицированным высвобождением актуально изучение их безопасности и токсикокинетики.

Цель работы: сравнительное изучение безопасности и токсикокинетики нового лекарственного препарата эзомепразол, капсулы с модифицированным высвобождением, 40 мг (АО «Валента Фарм», Россия) в сравнении с препаратом Нексиум®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг (АстраЗенека АБ, Швеция).

Материалы и методы: при изучении токсических свойств препарата эзомепразол, капсулы с модифицированным высвобождением, 40 мг (АО «Валента Фарм», Россия), в сравнении с препаратом Нексиум®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг (АстраЗенека АБ, Швеция), препараты вводили кроликам перорально (5 групп животных, по 8 самцов и 8 самок в каждой) в течение 28 сут в дозе 1 и 3 капсулы (таблетки) на животное (около 4,8 и 14,3 высших терапевтических доз (ВТД) соответственно). Проводили сравнительную оценку общетоксических свойств, местнораздражающего действия, фармакологической безопасности, влияния на иммунокомпетентные органы, генеративной токсичности, а также основных токсикокинетических параметров (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-24} , MRT , $T_{1/2}$).

Результаты: препарат эзомепразол не оказывал токсического влияния, в том числе местнораздражающего и иммунотоксического действия. Подтверждена его фармакологическая безопасность при многократном пероральном введении в отношении сердечно-сосудистой, выделительной и дыхательной систем, печени. Исследуемый препарат не оказывал влияния на репродуктивную систему самцов и самок кроликов. Установлена доза, не оказывающая видимого нежелательного эффекта (NOAEL) – 14,3 ВТД. Сравнительная оценка токсикокинетических параметров после однократного и многократного перорального введения продемонстрировала сопоставимость токсикокинетических профилей препарата эзомепразол с препаратом Нексиум®.

Выводы: полученные данные свидетельствуют о наличии у исследуемого препарата эзомепразол благоприятного профиля безопасности. Все оцениваемые в ходе исследований параметры препарата эзомепразол были сопоставимы с таковыми препарата Нексиум®. Учитывая положительный опыт применения препарата Нексиум® в клинической практике, данные, полученные относительно нового препарата эзомепразола, позволяют прогнозировать его аналогичную безопасность.

Ключевые слова: эзомепразол; некسيوم; ингибиторы протонной помпы; безопасность; токсикокинетика; доклинические исследования

Для цитирования: Kosman V.M., Karlina M.V., Mazukina E.V., Globenko A.A., Джайн Е.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Изучение безопасности и токсикокинетики препарата эзомепразол в доклинических исследованиях. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):176–190. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342>

Preclinical Evaluation of Esomeprazole Safety and Toxicokinetics

V.M. Kosman¹✉, M.V. Karlina¹, E.V. Mazukina¹, A.A. Globenko², E.A. Jain², M.N. Makarova¹, V.G. Makarov¹

¹ Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district,
Leningrad region 188663, Russian Federation

² Valenta Pharm JSC,
2 Fabrichnaya St., Shchyolkovo, Moscow region 141108, Russian Federation

✉ Corresponding author: Vera M. Kosman kosman.vm@doclinika.ru

ABSTRACT

Esomeprazole, the S-isomer of omeprazole, is a second-generation proton pump inhibitor widely used for acid-related diseases of the oesophagus, stomach, and duodenum (peptic ulcer, gastro-oesophageal reflux disease, etc.). Studies on esomeprazole safety and toxicokinetics (TK) are essential for increasing the number of modified-release esomeprazole products manufactured in Russia.

The aim of the study was to compare the safety and toxicokinetics of a new esomeprazole product, 40 mg modified-release capsules (Valenta Pharm JSC, Russia), and Nexium® 40 mg film-coated tablets (AstraZeneca AB, Sweden).

Materials and methods. This toxicity study involved oral administration of esomeprazole 40 mg modified-release capsules (Valenta Pharm JSC, Russia) and Nexium® 40 mg film-coated tablets (AstraZeneca AB, Sweden) to 5 groups of rabbits (8 males and 8 females per group) for 28 days at a dose of 1 or 3 capsules, or tablets, corresponding to approximately 4.8 or 14.3 maximum human therapeutic doses (MHTDs), respectively. Comparisons included general toxicity, local tolerance, safety pharmacology, effects on immune system organs, reproductive toxicity, and basic TK parameters (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-24} , MRT , and $T_{1/2}$).

Results. No toxic effects, including local irritation and immunotoxicity, were observed for the test product. The safety pharmacology testing demonstrated the safety of repeated oral administration of the test product for the cardiovascular, excretory, respiratory systems and the liver. The test product did not affect the reproductive system of male and female rabbits. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was determined to be 14.3 MHTDs. According to the TK parameters evaluated after single and repeated oral administration, the test product and Nexium® demonstrated comparable TK profiles.

Conclusions. The study demonstrated a favourable safety profile for the test product. All the test product parameters studied were comparable with those of Nexium®. Positive clinical experience with Nexium® supports the data obtained for the new esomeprazole product. The safety of these medicinal products may be considered similar.

Key words: esomeprazole; Nexium; proton pump inhibitors; safety; toxicokinetics; preclinical studies

For citation: Kosman V.M., Karlina M.V., Mazukina E.V., Globenko A.A., Jain E.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Preclinical evaluation of esomeprazole safety and toxicokinetics. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342>

Введение

Ингибиторы протонной помпы (ИПП) являются современными мощными и эффективными средствами для лечения кислотозависимых заболеваний [1–3]. Препараты этой фармакологической группы снижают секрецию соляной кислоты в желудке за счет ингибирования фермента H^+/K^+ -АТФазы (протонной помпы) в париетальных клетках желудка [1, 4, 5]. К препаратам первого поколения ИПП, представляющим собой рацемические смеси, относят омепразол, пантопразол, рабепразол, лансопразол. Эзомепразол, являющийся S-изомером омепразола, относят к ИПП второго поколения¹ [3]. Разделение стереоизомеров позволило повысить антисекреторную активность и биодоступность эзомепразола по сравнению с омепразолом [6], что связывают с особенностями метаболизма стереоизомеров в печени с участием ферментных систем цитохрома P450 [2, 7]. По мнению С.А. Курилович [8], эзомепразол обладает улучшенной биодоступностью, замедленным выведением, способностью создавать более высокие концентрации в крови и секреторных канальцах, обеспечивать более глубокое и продолжительное подавление секреции, а его меньшая подверженность метаболизму с помощью цитохрома P450 CYP2C19 обуславливает более стойкий и прогнозируемый клинический эффект по сравнению с ИПП первого поколения. В ряде исследований авторы подчеркивают преимущества применения эзомепразола в терапии различных кислотостойчивых заболеваний как у взрослых, так и у детей [4, 5, 8, 9], отмечают его дозозависимую антисекреторную активность [8] и сравнивают особенности фармакокинетики у здоровых добровольцев и при патологии, а также у пациентов различных возрастных групп [7, 10].

Распространенность кислотозависимых заболеваний пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки (язвенная болезнь, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь и др.) сохраняется на достаточно высоком уровне как в Российской Федерации, так и за рубежом [11]. Дополнительным фактором риска развития таких заболеваний является широкое применение нестероидных противовоспалительных препаратов, на фоне которых возможно возникновение симптоматических язв желудка и двенадцатиперстной кишки, их кровотечения

и перфорации. Лечение этих заболеваний ассоциировано со значительными экономическими затратами. Применение эзомепразола является не только эффективным, но и экономически обоснованным с точки зрения фармакоэкономической оценки [11].

Первым зарегистрированным за рубежом, а затем и в Российской Федерации препаратом эзомепразола является Нексиум® («АстраЗенека АБ», Швеция), выпускаемый в виде гранул для приготовления суспензии для приема внутрь; лиофилизата для приготовления раствора для внутривенного введения и в виде таблеток, покрытых оболочкой². Особенностью этого препарата является мультипартикулярная система доставки (multiunit particulate system, MUPS) – таблетка содержит более 1000 спрессованных микропеллет с эзомепразолом, покрытых кислотоустойчивой оболочкой³. В Российской Федерации зарегистрированы и другие препараты эзомепразола отечественных и зарубежных производителей в виде готовых лекарственных форм для перорального применения: капсулы кишечнорастворимые и таблетки кишечнорастворимые, покрытые (пленочной) оболочкой⁴. Преимущество применения препаратов эзомепразола в виде капсул состоит в удобстве их проглатывания, обуславливающим предпочтения пациентов по отношению к этой лекарственной форме [12, 13]. Расширение ассортимента отечественных препаратов эзомепразола с модифицированным высвобождением представляется актуальной задачей.

Цель работы – сравнительное изучение безопасности и токсикокинетики нового лекарственного препарата эзомепразол, капсулы с модифицированным высвобождением, 40 мг (АО «Валента Фарм», Россия) в сравнении с препаратом Нексиум®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг («АстраЗенека АБ», Швеция).

Задачи исследования:

- провести сравнительный анализ токсических свойств тестируемого препарата и препарата сравнения при многократном применении;
- выявить возможные органы – мишени токсического действия;
- установить возможность обратимости вызываемых повреждений;

¹ Оптимальная терапия кислотозависимых заболеваний. Lvrach.ru. 04.06.2021. <https://www.lvrach.ru/2036/partners/15437973>
² https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=76fb29b1-d5a9-4f1c-a194-8a2b55197a0a

³ Оптимальная терапия кислотозависимых заболеваний. Lvrach.ru. 04.06.2021. <https://www.lvrach.ru/2036/partners/15437973>

⁴ <https://grls.rosminzdrav.ru>

- провести сравнительную оценку местнораздражающего действия;
- провести сравнительное изучение иммунотоксических свойств;
- провести сравнительное изучение фармакологической безопасности;
- провести сравнительное изучение потенциального токсического влияния препаратов на генеративную функцию;
- провести сравнительную оценку токсикокинетики препаратов при однократном и многократном пероральном введении в двух дозах.

Материалы и методы

Животные. В эксперименте были использованы кролики новозеландской породы обоих полов (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Возраст животных к началу эксперимента составил 19–21 нед. Проведение исследований было одобрено на заседании биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол БЭК от 16.01.2019 № 4.4/19).

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

Кроликов содержали в индивидуальных боксах с решетчатым полом без подстила, с зоной для отдыха (сплошной пол), снабженных автоматической nippleной системой поения. Минимальная площадь пола на одно животное соответствовала нормативной документации⁵. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (16–22 °С и относительной влажности воздуха 30–70%, $\text{NH}_3 \leq 10$ мг/м³, $\text{CO}_2 \leq 0,15$ об.%). Световой режим составил 12 ч света и 12 ч темноты. Был установлен режим воздухообмена, обеспечивающий смену около 15 объемов помещения в час.

Стандартный корм животные получали *ad libitum*, за исключением лишения корма на 4 ч перед эвтаназией и забором крови. Воду кролики получали без ограничений.

Исследуемые препараты. Тестируемый препарат эзомепразол, капсулы с модифицированным высвобождением, 40 мг, производства АО «Валента Фарм», Россия (серия SF18000389).

Препарат сравнения – Нексиум®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг производства «АстраЗенека АБ», Швеция, зарегистрирован в Российской Федерации (серия ZKRX). Плацебо тестируемого препарата – капсулы Vcaps® производства «Капсугель», Франция (серия 53496191).

Способ введения и выбор доз. Согласно инструкции по медицинскому применению препарата Нексиум®, высшая терапевтическая доза (ВТД) для человека составляет 40 мг/сут, или 0,67 мг/кг при средней массе тела человека 60 кг. В пересчете на организм кролика с учетом разницы в площади поверхности тела ВТД составила⁶: $0,67 \text{ мг/кг} \times 3,1$ (коэффициент пересчета для кролика) = 2,1 мг/кг. Соответственно, ВТД для кроликов составляет 2,1 мг/кг, или 8,4 мг на кролика массой тела 4000 г.

Введение препарата осуществляли без нарушения целостности его лекарственной формы, поскольку действующее вещество исследуемого препарата разрушается в агрессивной среде желудка, и поэтому оно заключено в кислотоустойчивую капсулу. Таким образом, в исследовании не представлялось возможным вводить экспериментальным животным препарат с нарушенной целостностью лекарственной формы. Соответственно, при введении 1 капсулы (таблетки) 40 мг кролик массой тела 4 кг получал дозу, превышающую ВТД приблизительно в 4,8 раза. Данная доза была использована как минимальная тестируемая. В максимальной дозе кролики получали 3 капсулы (или таблетки), что соответствует примерно 14,3 ВТД. Группа контроля получала плацебо: 3 капсулы на животное. Препараты вводили животным в неизменном виде, перорально, один раз в день с помощью таблеткодавателей.

Дизайн исследования по оценке безопасности. Дизайн исследования был построен с учетом современных норм биоэтики и соблюдения основных принципов 3R (Replacement, Reduction, Refinement – замена, сокращение, улучшение) с использованием минимального количества животных [14].

В ходе исследования кроме сравнительной оценки общетоксических свойств и местнораздражающего действия исследуемых препаратов были изучены фармакологическая безопасность

⁵ Белозерцева ИВ, Блинов ДВ, Красильщикова МС, ред. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. М.: ИРБИС; 2017.

⁶ Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2005.

(в отношении выделительной, сердечно-сосудистой, дыхательной системы, печени), влияние на иммунокомпетентные органы с целью выявления возможного иммунотоксического действия⁷, возможная генеративная токсичность, а также был проведен забор образцов крови для изучения основных токсикокинетических параметров.

В исследование было включено пять групп животных, по 8 самцов и 8 самок в каждой. Животные 1-й группы получали плацебо тестируемого препарата, 2-й группы – тестируемый препарат эзомерпазол в дозе 1 капс./животное, 3-й группы – тестируемый препарат эзомерпазол в дозе 3 капс./животное, 4-й группы – препарат сравнения Нексиум® в дозе 1 табл./животное, 5-й группы – препарат сравнения Нексиум® в дозе 3 табл./животное.

Препараты вводили перорально, 1 раз/сут в течение 28 сут ежедневно. Период отсроченного наблюдения – 28 сут. На протяжении всего эксперимента осуществляли еженедельный осмотр животных, взвешивание.

На 27 и 56 сут эксперимента проводили клинический анализ крови на гематологическом анализаторе Mythic 18 Vet (Orphee SA, Швейцария). Определяли количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов, лейкоцитарную формулу. Измерение параметров гемостаза проводили на коагулометре АПГ4-02-П (ООО «ЭМКО», Россия). На 27 и 56 сут определяли протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ).

Биохимические показатели крови определяли (28 и 56 сут) на биохимическом анализаторе Random Access A-25 (BioSystems, Испания) с использованием реагентов фирмы BioSystems (Испания) и в соответствии с инструкциями производителя. Оцениваемые параметры в сыворотке крови: трансаминазы (аланиновая (АЛТ) и аспарагиновая (АСТ) (Ед/л)), креатинин (мкмоль/л), мочевины (ммоль/л), альбумин (г/л), щелочная фосфатаза (Ед/л), общий белок (г/л), триглицериды (ммоль/л), холестерин (ммоль/л), отношение альбумины/глобулины (расчетные значения), общий билирубин (мкмоль/л), глобулин (расчетные значения), глюкоза (ммоль/л), креатинкиназа (Ед/л), лактатдегидрогеназа (Ед/л).

На 27 и 56 сут было проведено исследование физико-химического состава мочи с помощью диагностических тест-полосок (West Medica Produktions- und Handels- GmbH) и мочевого анализатора DocUReader2 (77 Elektronika Kft., Венгрия). Оценивали следующие параметры: глюкоза, pH, билирубин, уробилиноген, белок, удельный вес, лейкоциты, кровь, кетоны, нитриты.

Биохимический анализ мочи производили на 27 и 56 сут на биохимическом анализаторе Random Access A-25 (BioSystems, Испания) с использованием реагентов компании BioSystems (Испания) и в соответствии с инструкциями производителя. Оценивали креатинин (мкмоль/л) и мочевины (ммоль/л).

Регистрацию параметров электрокардиограммы (ЭКГ), частоту сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление (АД) и частоту дыхательных движений (ЧДД) проводили на 27 и 56 сут. Для регистрации ЭКГ животное было предварительно наркотизировано. Регистрацию ЭКГ проводили с помощью компьютерного электрокардиографа для ветеринарии «Поли-спектр-8В» (ООО «Нейрософт», Россия). ЭКГ проанализирована в отведении II. Оценивались следующие показатели: ЧСС, RR (мс), P (мс), PQ (мс), QRS (мс), QT (мс). Регистрацию АД и ЧДД проводили с помощью прибора «Монитор пациента IM-10» производства ЗАО «Ист Медикал», Москва.

Эвтаназию животных осуществляли посредством передозировки анестетика (Золетил® 50, внутривенно). Четыре самца и четыре самки из каждой группы были подвергнуты эвтаназии на 29 сут эксперимента, оставшиеся – на 57 сут эксперимента.

Патоморфологическое исследование. После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет внешних патологических признаков. Органы, извлеченные при некропии, были взвешены. Проведено гистологическое исследование следующих органов: аорта, сердце, трахея, легкие с бронхами, тимус, желудок, тонкая кишка, толстая кишка, поджелудочная железа, печень, селезенка, почки, мочевой пузырь, надпочечники, семенники (самцы), придатки семенника (самцы), яичники (самки), матка (самки), подчелюстные и желудочные лимфатические узлы, щитовидная железа, головной мозг.

Для оценки местнораздражающего действия препаратов при проведении процедуры

⁷ OECD (2008) Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents No 407.

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

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

некропии были визуально оценены отклонения во внешнем виде органов желудочно-кишечного тракта, а также проведена гистологическая оценка тканей, непосредственно контактировавших с исследуемыми объектами.

Для изучения возможного иммунотоксического действия у всех животных оценивали общее количество лейкоцитов в крови, лейкоформулу, абсолютные дифференциальные показатели лейкоцитов, уровень глобулинов, проводили патоморфологическое исследование лимфоидных органов (тимус, селезенка, подчелюстные и желудочные лимфатические узлы), анализировали массовые коэффициенты органов (тимус, селезенка)⁸.

В рамках изучения общетоксических свойств исследуемых препаратов произведена оценка фармакологической безопасности:

- в отношении выделительной системы (почки): анализ мочи (общий и биохимический); массовые коэффициенты и гистологический анализ почек;
- в отношении печени: биохимический анализ крови – АЛТ, АСТ, билирубин, щелочная фосфатаза, креатинин, мочевины, общий белок, альбумины, глобулины, холестерин, коагулограмма – ПВ и АЧТВ; массовые коэффициенты и гистологический анализ печени;
- в отношении сердечно-сосудистой системы: биохимический анализ крови (креатининкиназа, АСТ, АЛТ, ЛДГ), ЭКГ, ЧСС, АД; массовые коэффициенты и гистологический анализ сердца;
- в отношении дыхательной системы: ЧДД; массовые коэффициенты и гистологический анализ легких.

Для изучения генеративной токсичности у животных, подлежащих эвтаназии на 29 сут эксперимента, и у животных, подлежащих эвтаназии на 57 сут эксперимента, были проведены: патоморфологическое исследование органов репродуктивной системы (семенники, придатки семенников, яичники, матка); оценка массовых коэффициентов семенников и яичников; оценка морфофункционального состояния сперматозоидов⁹.

При проведении некропии у животных извлекали придатки семенников (эпидидимисы),

максимально отделяя их от брыжейки. Далее эпидидимис левого семенника помещали на предметное стекло и, зажав браншами пинцета, надрезали обе его доли, после чего придаток (с надрезанными долями) помещали в пробирку и заливали 3 мл PBS (фосфатно-солевой буфер, температура 37 °С). Затем производили инкубацию при 37 °С и 5% содержания CO₂ в течение 15 мин в CO₂-инкубаторе Shellab 3517-2 (Sheldon Manufacturing, США). После чего производили оценку спермограммы по следующим показателям: концентрация сперматозоидов ($\times 10^6$ /мл), характер движения (доля подвижных и неподвижных сперматозоидов), жизнеспособность и зрелость: соотношение живых, мертвых и незрелых сперматозоидов (по результатам гипоосмотического теста).

Токсикокинетическое исследование. Кровь забирали у 4 самцов и 4 самок из каждой группы № 2–5 на 1–2, 14–15 и 28–29 сут эксперимента на следующих временных точках: до введения препаратов, через 30 мин, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 24 ч после введения препаратов.

Определение содержания эзомепразола в биологических образцах (плазме крови кроликов) выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) с помощью предварительно разработанной методики. Анализ выполнен с использованием колонки Luna C₁₈ (2) 4,6×150 мм, размер частиц сорбента 5 мкм (Phenomenex, США) в градиентном режиме элюирования смесью 0,03% раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила (от 10 до 50% ацетонитрила в составе элюента за 10 мин), скорость подачи элюента 1 мл/мин, дозируемый объем проб 20 мкл, длина волны детектирования 300 нм, температура термостата колонок комнатная. Подготовка проб к анализу включала осаждение белков плазмы крови ацетонитрилом (в объемном соотношении 1:3) с последующей заменой растворителя. Биоаналитическая методика была валидирована в соответствии с рекомендациями¹⁰ в диапазоне концентраций 50–30000 нг/мл по показателям: селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, точность и прецизионность. По всем валидационным

⁸ ICH S8. Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. CHMP/167235/2004. EMA; 2006.

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

⁹ ICH S5 (R3). Guideline on reproductive toxicology: detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2020.

¹⁰ ICH Q2A. Text on validation of analytical procedures. ICH harmonised tripartite guideline. Geneva; 1994.

ICH Q2B. Validation of analytical procedures: methodology. Geneva; 1996.

Bioanalytical method validation. Guidance for industry. FDA; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. EMA; 2011.

параметрам получены удовлетворительные результаты, что свидетельствовало о возможности дальнейшего использования методики для изучения токсикокинетики препаратов на кроликах.

Анализ данных. Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения (по критерию Шапиро–Уилка), рассчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) или медиана и квартильный размах ($Me(Q_1; Q_3)$). Для оценки межгрупповых различий данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением с использованием теста Тьюки (*post-hoc* Tukey's test). Для оценки данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, был применен критерий Краскела–Уоллиса. Различия были определены при уровне значимости $p=0,05$. Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Токсикокинетические параметры (максимальная концентрация C_{max} , время достижения максимальной концентрации T_{max} , площадь под кривой «концентрация–время» AUC , среднее время удерживания MRT , период полувыведения $T_{1/2}$ и показатель скорости всасывания C_{max}/AUC) рассчитаны внемоделным методом статистических моментов [15] с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel.

Результаты

Токсические свойства

Средняя масса тела кроликов на начало эксперимента составляла: 4092 ± 28 г (самцы) и 3976 ± 87 г (самки). На протяжении периода введения препаратов и плацебо регистрировали физиологический прирост массы тела у самцов и самок кроликов всех групп. Влияния препаратов на динамику массы тела не установлено. Клиническая картина интоксикации отсутствовала на протяжении всего периода наблюдения.

Результаты биохимического и клинического анализов крови не выявили клинически значимого влияния препаратов на все исследуемые параметры. Показатели гемостаза

находились в границах физиологических норм для всех групп экспериментальных животных. По результатам общего и биохимического анализа мочи отклонений от нормы не выявлено. Исследуемые препараты не оказали влияния на ЭКГ, ЧСС, а также на АД и ЧДД. Наиболее значимые параметры представлены в *таблице 1* «Основные показатели клинического и биохимического анализов крови и мочи кроликов, получавших препараты эзомерпазола» (опубликована на сайте журнала¹¹) и в *таблице 2* «Основные параметры электрокардиограммы и артериального давления кроликов, получавших препараты эзомерпазола» (опубликована на сайте журнала¹²).

На 29 и на 57 сут эксперимента при патологоанатомическом исследовании у всех животных в исследованных органах макроскопически видимых изменений не обнаружено. Гистологическое строение этих органов также соответствовало норме. При анализе массовых коэффициентов органов кроликов (*табл. 3* «Массовые коэффициенты основных органов кроликов, получавших препараты эзомерпазола», опубликована на сайте журнала¹³) было установлено, что исследуемые препараты не оказали влияния на оцениваемые показатели ни на 29, ни на 57 сут эксперимента.

Местнораздражающее действие. На 29 и на 57 сут эксперимента у всех животных в месте введения (желудок) и в кишечнике макроскопически видимых изменений не обнаружено. Гистологическое строение желудка, тонкой и толстой кишки соответствовало норме.

Иммунотоксические свойства. Отличий от контроля по параметрам клинического и биохимического анализа крови (*табл. 1*, опубликована на сайте журнала¹⁴), массовым коэффициентам тимуса и селезенки (*табл. 3*, опубликована на сайте журнала¹⁵) выявлено не было. Гистологическое строение лимфоидных органов (тимус, селезенка, околушные лимфатические узлы) у всех животных соответствовало норме. По совокупности полученных данных был сделан вывод об отсутствии иммунотоксического действия при курсовом введении препаратов в исследуемом диапазоне доз ни после окончания введения, ни после окончания отсроченного наблюдения.

¹¹ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl1>

¹² <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl2>

¹³ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl3>

¹⁴ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl1>

¹⁵ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl3>

Результаты оценки **фармакологической безопасности** исследуемых препаратов при многократном пероральном введении свидетельствуют об отсутствии нефротоксического, гепатотоксического, кардиотоксического действий и влияния на дыхательную систему самцов и самок кроликов (наиболее значимые результаты представлены в *таблицах 1 и 2*, опубликованы на сайте журнала¹⁶).

Генеративная токсичность. Исследуемые препараты не оказали влияния на репродуктивную систему самцов и самок кроликов. Морфофункциональное состояние сперматозоидов самцов, получавших исследуемые препараты, не отличалось от данных контрольной группы животных (*табл. 4* «Морфофункциональное состояние сперматозоидов кроликов, получавших препараты эзомепразола», опубликована на сайте журнала¹⁷).

Таким образом, данные, полученные в ходе оценки общетоксических свойств препаратов эзомепразола, свидетельствовали об отсутствии нежелательных реакций при многократном применении препаратов в дозе, превышающей ВТД приблизительно в 14,3 раза.

Исследование токсикокинетики

Разработка и валидация биоаналитической методики. Эзомепразол – (S)-5-Метокси-2-[(4-метокси-3,5-диметилпиридин-2-ил)метилсульфинил]бензимидазол (*рис. 1*), ингибитор протонного насоса.

На основании данных литературы [16–18] для определения эзомепразола в плазме крови кроликов был выбран метод обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ. С учетом экспериментальных возможностей конкретной лаборатории были подобраны оптимальные хроматографические условия и процедура пробоподготовки. Основные валидационные параметры разработанной методики представлены в *таблице 5*.

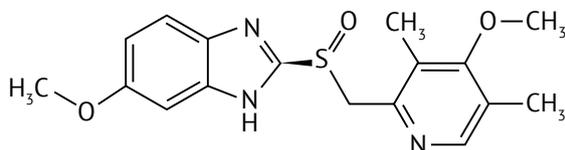


Рис. 1. Структурная формула эзомепразола

Fig. 1. Structural formula of esomeprazole

¹⁶ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl1>

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl2>

¹⁷ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-342-tabl4>

По всем критериям получены результаты, свидетельствующие о специфичности, линейности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности разработанной методики, что подтвердило возможность ее дальнейшего использования для изучения токсикокинетики препаратов эзомепразола.

Оценка токсикокинетики. Кинетика эзомепразола в плазме крови после однократного и многократного (в течение 14 и 28 сут) введения препаратов в двух дозах имела форму кривой, характерную для лекарственных форм, применяемых перорально (*рис. 2–4*). В нулевой точке (перед введением препаратов) исследование проб плазмы крови всех кроликов не выявило наличия определяемого соединения; значения концентраций аналита ниже НПКО принимали равными нулю.

Содержание эзомепразола в плазме крови после перорального введения тестируемого

Таблица 5. Валидационные параметры методики определения эзомепразола в плазме крови кроликов

Table 5. Validation parameters for esomeprazole assay in rabbit plasma

Параметр Parameter	Значение Value
Калибровочный диапазон, нг/мл Calibration range, ng/mL	50–30000
Уравнение регрессии* Regression equation*	Y=13,819X–105
Коэффициент корреляции r Correlation coefficient r	0,995
НПКО, нг/мл LLOQ, ng/mL	50
Точность / Accuracy, % 30000 нг/мл (ng/mL) 12000 нг/мл (ng/mL) 150 нг/мл (ng/mL) 50 нг/мл (ng/mL)	0,1 1,8 5,5 19,0
Прецизионность / Precision, % 30000 нг/мл (ng/mL) 12000 нг/мл (ng/mL) 150 нг/мл (ng/mL) 50 нг/мл (ng/mL)	0,4 0,2 9,0 5,7

Примечание. НПКО – нижний предел количественного определения.

* Y – площадь пика эзомепразола, X – концентрация эзомепразола, нг/мл.

Note. LLOQ, lower limit of quantification.

* Y, esomeprazole peak area; X, esomeprazole concentration (ng/mL).

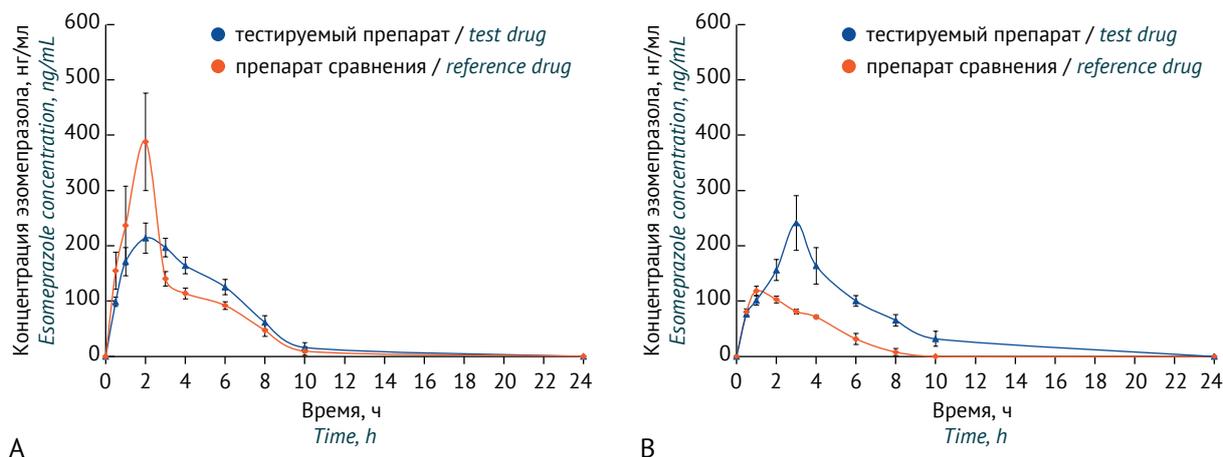


Рис. 2. Кривые «концентрация–время» изменения содержания эзомепразола в плазме крови после однократного перорального введения тестируемого препарата эзомепразол и препарата сравнения Нексиум® в дозах 1 капс. (табл.) на животное (А) и 3 капс. (табл.) на животное (В) в линейных координатах (количество животных $n=8$, среднее значение и стандартная ошибка среднего $M \pm SEM$)

Fig. 2. Concentration–time curves of esomeprazole in rabbit plasma after single oral administration of the test product esomeprazole and the reference product Nexium® in a dose of 1 capsule/tablet (A) and 3 capsules/tablets (B) per animal in linear coordinates ($n=8$ animals; $M \pm SEM$, mean and standard error of the mean)

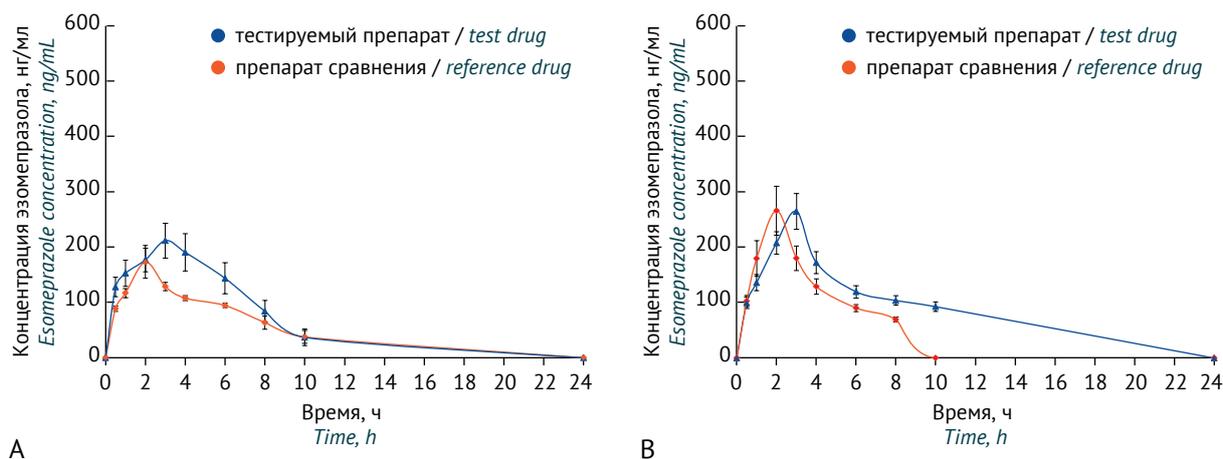


Рис. 3. Кривые «концентрация–время» изменения содержания эзомепразола в плазме крови после многократного (на 14 сут) перорального введения тестируемого препарата эзомепразол и препарата сравнения Нексиум® в дозах 1 капс. (табл.) на животное (А) и 3 капс. (табл.) на животное (В) в линейных координатах (количество животных $n=8$, среднее значение и стандартная ошибка среднего $M \pm SEM$)

Fig. 3. Concentration–time curves of esomeprazole in rabbit plasma after repeated oral administration (Day 14) of the test product esomeprazole and the reference product Nexium® in a dose of 1 capsule/tablet (A) and 3 capsules/tablets (B) per animal in linear coordinates ($n=8$ animals; $M \pm SEM$, mean and standard error of the mean)

препарата достигало максимума через 3–4 ч после введения как в дозе 1 капс./животное, так и в дозе 3 капс./животное. Для препарата сравнения максимальное содержание аналита в плазме крови кроликов наблюдали через 1–2 ч после введения. Затем концентрация постепенно снижалась. Через 10 ч после введения содержание

действующего вещества в плазме крови составило около 8–13% (после однократного введения), 8–35% (после многократного введения в течение 14 сут) и 23–24% (после многократного введения в течение 28 сут) от его максимального уровня; через 24 ч после введения аналит не был обнаружен ни в одной пробе.

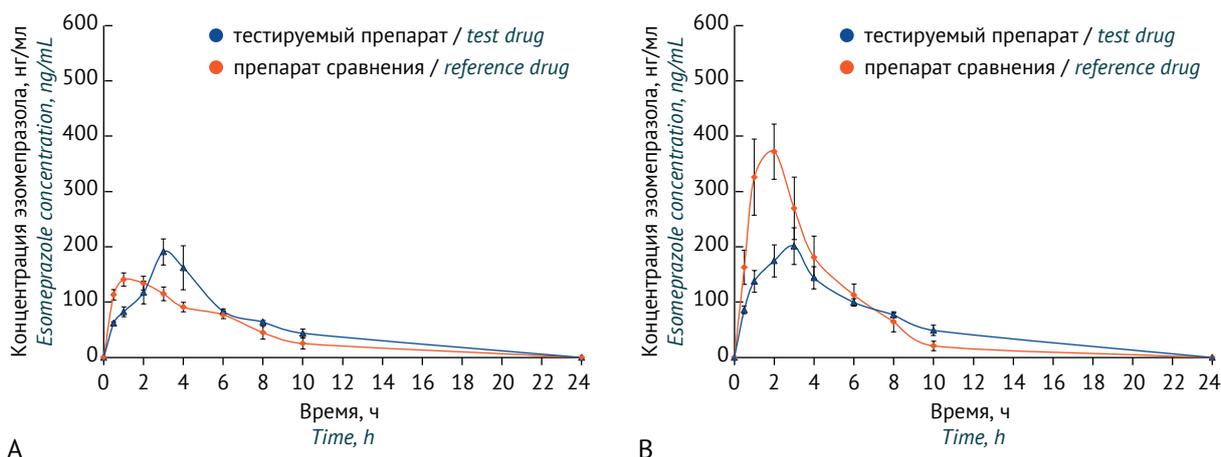


Рис. 4. Кривые «концентрация–время» изменения содержания эзомепразола в плазме крови после многократного (на 28 сут) перорального введения тестируемого препарата эзомепразол и препарата сравнения Нексимум® в дозах 1 капс. (табл.) на животное (А) и 3 капс. (табл.) на животное (Б) в линейных координатах (количество животных $n=8$, среднее значение и стандартная ошибка среднего $M \pm SEM$)

Fig. 4. Concentration–time curves of esomeprazole in rabbit plasma after repeated oral administration (Day 28) of the test product esomeprazole and the reference product Nexium® in a dose of 1 capsule/tablet (A) and 3 capsules/tablets (B) per animal in linear coordinates ($n=8$ animals; $M \pm SEM$, mean and standard error of the mean)

Обобщенные данные по токсикокинетическим параметрам, полученным для исследованных препаратов за весь период эксперимента, представлены в *таблице 6*.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о сопоставимости профиля безопасности и токсикокинетических параметров воспроизведенного лекарственного препарата эзомепразол и препарата Нексимум®. Результаты оценки токсических свойств показали, что исследуемые препараты при многократном пероральном введении в течение 28 сут в дозе, которая многократно превышала терапевтическую, не оказали токсического действия на организм лабораторных животных. Не было выявлено местнораздражающего действия исследуемых препаратов на слизистую оболочку желудка и кишечника. По данным проведенного исследования установлена доза, не оказывающая видимого нежелательного эффекта (по observed adverse effect level, NOAEL) – 14,3 ВТД.

В ходе проведенного исследования кроме сравнительной оценки общетоксических свойств и местнораздражающего действия было изучено влияние воспроизведенного препарата эзомепразол и препарата сравнения Нексимум® на иммунокомпетентные органы с целью

выявления возможного иммунотоксического действия¹⁸. Полученные результаты позволили заключить, что при введении в дозах, соответствующих примерно 4,8 и 14,3 ВТД в течение 28 сут, препараты не оказали иммунотоксического действия.

Результаты оценки фармакологической безопасности исследуемых препаратов при многократном пероральном введении свидетельствовали об отсутствии нефротоксического, гепатотоксического, кардиотоксического действий и влияния на дыхательную систему кроликов. Исследуемые препараты не оказали влияния на репродуктивную систему самцов и самок кроликов.

По результатам сравнительной оценки токсикокинетики после однократного и многократного (в течение 14 и 28 сут) введения исследуемых препаратов не выявлено зависимости токсикокинетических параметров от пола животных. В целом, полученные данные не позволили установить закономерностей, свидетельствующих о накоплении действующего вещества при длительном приеме как тестируемого препарата, так и препарата сравнения.

Наиболее устойчивые различия выявлены для параметра T_{max} – в большинстве случаев различия этого параметра для тестируемого препарата и препарата сравнения статистически

¹⁸ ICH S8 Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. CHMP/167235/2004. EMA; 2006.

Таблица 6. Сводная таблица основных токсикокинетических параметров (количество животных $n=8$, самцы + самки)

Table 6. Summary table of the main toxicokinetic parameters ($n=8$ animals, males and females)

Сutki введения Day of administration	Препарат Medicinal product	Доза, на животное Dose per animal	Значения токсикокинетических параметров Values of pharmacokinetic parameters					
			C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/mL	T_{max} , ч T_{max} , h	AUC_{0-24} , ч*нг/мл AUC_{0-24} , h*ng/mL	MRT , ч MRT , h	$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	C_{max}/AUC_{0-24}
1	Эзомепразол Esomeprazole	1 капс. 1 capsule	264,38±55,19 ^{&}	2,88±0,23 ^{&}	1081,69±147,54 ^{&}	10,96±2,19	7,23±1,68	0,24±0,03
		3 капс. 3 capsules	261,25±31,01	2,63±0,38 ^{&}	1154,75±80,30	9,51±1,91	7,60±1,73	0,23±0,02
	Нексиум® Nexium®	1 табл. 1 tablet	125,00±8,70*	1,25±0,16	433,56±33,74*	11,28±2,59	7,62±1,86	0,30±0,03
		3 табл. 3 tablets	436,25±106,15	1,75±0,25	1177,22±143,67	9,62±2,80	7,26±2,63	0,35±0,07
14	Эзомепразол Esomeprazole	1 капс. 1 capsule	278,38±31,81	3,00±0,53	1299,63±202,87	7,51±1,28* ^{&}	4,39±0,99*	0,23±0,02
		3 капс. 3 capsules	281,00±37,00	2,75±0,25 ^{&}	1402,66±134,25	15,19±3,38 ^{&}	10,16±2,63	0,20±0,02
	Нексиум® Nexium®	1 табл. 1 tablet	180,38±35,04	2,00±0,27	912,69±101,73*	13,39±1,81*	7,85±1,48	0,20±0,02
		3 табл. 3 tablets	285,63±50,95	2,00±0,33	1076,38±114,10	6,69±0,82	4,10±0,65	0,25±0,03
28	Эзомепразол Esomeprazole	1 капс. 1 capsule	244,38±45,19	3,13±0,23 ^{&}	968,91±82,00	10,15±0,89	6,42±0,90	0,24±0,03
		3 капс. 3 capsules	238,63±37,88 ^{&}	2,75±0,25 ^{&}	1123,91±106,04 [§]	9,50±1,28 ^{&} , [§]	6,27±0,96 [§]	0,21±0,02 ^{&}
	Нексиум® Nexium®	1 табл. 1 tablet	154,25±13,55* [#]	1,38±0,18 [§]	780,16±117,02* [#]	10,48±1,72*	6,41±1,45	0,21±0,02*
		3 табл. 3 tablets	453,00±69,06* [§]	2,00±0,33	1578,97±261,26 [§]	5,60±0,79	3,73±1,04	0,30±0,04

Примечание. Данные представлены в формате $M \pm SEM$ – среднее значение и стандартная ошибка среднего; C_{max} – максимальная концентрация; AUC – площадь под кривой «концентрация–время» в интервале дозирования 0–24 ч; MRT – среднее время удерживания; $T_{1/2}$ – период полувыведения.

[&] Статистически значимые отличия от групп, получавших препарат сравнения в эквивалентных дозах, в один день введения, уровень значимости $p < 0,05$, t -критерий Стьюдента.

* Статистически значимые отличия минимальной дозы от максимальной при сравнении одного препарата в один день введения, $p < 0,05$, t -критерий Стьюдента.

[#] Статистически значимые отличия при сравнении одного препарата в одной дозе на сроках введения (14 и 28 сут) по сравнению с 1 сут введения, $p < 0,05$, t -критерий Стьюдента.

[§] Статистически значимые отличия на 28 сут при сравнении одного препарата в одной дозе с данными на 14 сут, $p < 0,05$, t -критерий Стьюдента.

Note. Data are presented as $M \pm SEM$ (mean and standard error of the mean). C_{max} , maximum concentration; AUC , area under the curve from 0 to 24 hours; MRT , mean retention time; $T_{1/2}$, half-life time.

[&] Statistically significant differences from the groups receiving the reference product in equivalent doses on the same day of administration, probability level $p < 0.05$, Student's t -test.

* Statistically significant differences between the groups receiving the minimum dose and the maximum dose of the same medicinal product on the same day of administration, $p < 0.05$, Student's t -test.

[#] Statistically significant differences between the groups after single and repeated administration (days 14 and 28 versus day 1) of the same medicinal product in the same dose, $p < 0.05$, Student's t -test.

[§] Statistically significant differences between the groups receiving the same dose of the same medicinal product on day 28 versus day 14, $p < 0.05$, Student's t -test.

значимы и имели одинаковое направление изменения: для тестируемого препарата характерно увеличение времени достижения максимальной концентрации по сравнению с препаратом сравнения. Известно, что характерной особенностью пищевого поведения кроликов является копрофагия [19], проявляющаяся в существенных колебаниях значений pH желудочного сока (примерно от 1,9–2,0 до 4,0–5,0 и выше) [20]. Это может приводить к неодинаковому высвобождению действующего вещества из готовых лекарственных форм исследуемых препаратов в желудочно-кишечном тракте кроликов в связи с особенностями поведения вспомогательных веществ в условиях изменения pH и, как следствие, обуславливать выявленные различия токсикокинетических параметров. В ряде случаев выявлены также достоверные отличия параметров C_{max} и AUC_{0-24} при сопоставлении данных для препарата сравнения в двух исследованных дозах. Различия в расчетных параметрах (MRT , $T_{1/2}$ и др.), выявленные для некоторых пар данных, носили разнонаправленный характер, не коррелировали с изменением введенной дозы исследованных препаратов и не позволили выявить устойчивых закономерностей на разных сроках введения. Можно предположить случайный характер таких различий, связанных, в том числе, с индивидуальными особенностями животных.

В целом полученные данные сопоставимы с результатами, известными для человека, согласно которым эзомепразол достаточно быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта – T_{max} составляет примерно 0,5–2,5 ч после приема, при ежедневном приеме 1 раз/сут эзомепразол полностью выводится из плазмы крови во время интервала между приемами и не кумулирует [10, 16, 17, 20–23]. Схожие данные получены для некоторых видов лабораторных животных – собак и крыс [18, 24, 25].

При однократном введении тестируемого препарата и препарата сравнения в исследованном диапазоне доз средние максимальные концентрации эзомепразола в плазме крови кроликов составили около 125–440 нг/мл, при многократном введении в течение 14 сут – 180–280 нг/мл, при многократном введении в течение 28 сут – 150–450 нг/мл. Уровни концентраций эзомепразола в плазме крови не являются токсичными, поскольку проявлений токсических эффектов препаратов не наблюдали. Данные уровни концентраций сопоставимы, но не превышали концентрации, которые

достигались у человека при приеме терапевтических доз (по различным данным, после приема 5–40 мг эзомепразола значения C_{max} составляли примерно от 100 нг/мл до 1,6–1,8 мкг/мл [7, 10, 16, 17, 21–23]), что может быть связано с различиями пищеварительных систем и метаболизма человека и кроликов. Также этот факт может свидетельствовать об ограниченной системной доступности эзомепразола и преимущественной реализации его действия в париетальных клетках желудка, что в конечном итоге обуславливает низкую токсичность препарата при приеме высоких доз.

Заключение

Проведенное экспериментальное исследование безопасности и токсикокинетики нового лекарственного препарата эзомепразол, капсулы с модифицированным высвобождением, 40 мг (АО «Валента Фарм», Россия), в сравнении с препаратом Нексиум®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг («АстраЗенека АБ», Швеция), позволило сделать следующие выводы.

1. При многократном пероральном введении кроликам в дозах 1 и 3 капс./животное (примерно 4,8 и 14,3 ВТД соответственно) тестируемый препарат и препарат сравнения не оказали токсического влияния и местно-раздражающего действия, не было обнаружено признаков, свидетельствующих о наличии иммунотоксических реакций. По результатам оценки фармакологической безопасности исследуемых препаратов установлено отсутствие нефротоксического, гепатотоксического, кардиотоксического действий и влияния на дыхательную систему экспериментальных животных. Показано отсутствие влияния исследуемых препаратов на репродуктивную систему самцов и самок кроликов. По данным проведенного исследования установлена NOAEL – 14,3 ВТД.

2. Сравнительная оценка токсикокинетических параметров тестируемого препарата и препарата сравнения после однократного и многократного перорального введения в дозах 1 и 3 капс. (табл.)/животное (примерно 4,8 и 14,3 ВТД соответственно) продемонстрировала сопоставимость их токсикокинетических профилей.

Полученные данные свидетельствуют о наличии у тестируемого препарата благоприятного профиля безопасности. Все оцениваемые в ходе исследований параметры препарата эзомепразол (АО «Валента Фарм», Россия) были сопоставимы с таковыми препарата Нексиум®

(«АстраЗенека АБ», Швеция). Учитывая положительный опыт применения препарата Нексиум® в клинической практике, данные, полученные

относительно нового воспроизведенного препарата эзомепразола, позволяют прогнозировать его аналогичную безопасность.

Литература / References

1. Белоусов СС, Муратов СВ, Ахмад АМ. *Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь и дуоденогастральный рефлюкс*. Н. Новгород: Изд-во Нижегородской гос. мед. академии; 2005.
Belousov SS, Muratov SV, Ahmad AM. *Gastroesophageal reflux disease and duodenogastric reflux*. Nizhny Novgorod; 2005 (In Russ.). EDN: [QLJTPJ](#)
2. Скороходова М. Одинаковые и разные. *Российские аптеки*. 2017;(11):20–5.
Skorokhodova M. Same and different. *Rossijskie apteki*. 2017;(11):20–5 (In Russ.).
3. Ткач СМ, Дорофеев АЭ. Эволюция лечения кислотозависимой патологии. *Гастроэнтерология*. 2015;4(58):94–100.
Tkach SM, Dorofiev AE. The evolution of the treatment of acid-related diseases. *Gastroenterology*. 2015;4(58):94–100 (In Russ.). EDN: [VSNXYZ](#)
4. Звягин АА, Щербakov ПЛ, Почивалов АВ, Кашников ВВ. Эзомепразол (нексиум) в лечении функциональной диспепсии у детей по данным суточного рН-мониторирования. *Бюллетень сибирской медицины*. 2005;4:80–5.
Zvyagin AA, Tsherbakov PL, Potchivalov AV, Kashnikov VV. Ezomeprazol (nexium) in treatment of functional dispersion among children according to data of daily pH-monitoring. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2005;4:80–5 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2005-0-80-85>
5. Звягин АА, Щербakov ПЛ, Почивалов АВ. Эффективность антисекреторного действия второго поколения ингибиторов протонной помпы при функциональной диспепсии у детей. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2008;87(6):42–4.
Zvyagin AA, Tsherbakov PL, Potchivalov AV. Antisecretory efficacy of proton pump inhibitors of the second generation in children with functional dyspepsia. *Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*. 2008;87(6):42–4 (In Russ.). EDN: [LHPSXP](#)
6. Asghar W, Pittman E, Jamali F. Comparative efficacy of esomeprazole and omeprazole: racemate to single enantiomer switch. *Daru*. 2015;23:50.
<https://doi.org/10.1186/s40199-015-0133-6>
7. Сереброва СЮ, Стародубцев АК, Писарев ВВ, Кондратенко СН, Василенко ГФ, Добровольский ОВ. Фармакокинетика, продолжительность антисекреторного эффекта омепразола и эзомепразола, вероятные причины их изменения при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2009;4:86–92.
Serebrova SYu, Starodubtsev AK, Pisarev VV, Kondratenko SN, Vasilenko GF, Doborovol'sky OV. Omeprazol and ezomeprazol pharmacokinetics, duration of antisecretory effect, and reasons for their probable changes in duodenal ulcer. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2009;4:86–92 (In Russ.). EDN: [MVAHNL](#)
8. Курилович СА, Чекалина ЕА, Белковец АВ, Щербакoва ЛВ. Дозозависимая антисекреторная активность эзомепразола: результаты длительного мониторинга внутрижелудочно рН. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016;3:33–40.
Kurilovich SA, Chekalina YA, Belkovets AV, Scherbakova LV. Dose-dependent esomeprazole antisecretory effect: results of long-term intragastric pH monitoring. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2016;26(3):33–40 (In Russ.). EDN: [YIYGNT](#)
9. Кучерявый ЮА. Опыт использования эзомепразола в комплексной терапии обострения хронического панкреатита. *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*. 2005;(6):35–41.
Kucheriavyi YuA. Experience with using esomeprazole in combination therapy of chronic pancreatitis exacerbations. *Clinical Perspectives of Gastroenterology, Hepatology*. 2005;(6):35–41 (In Russ.).
10. Goirand F, Le Ray I, Bardou M. Pharmacokinetic evaluation of esomeprazole for the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(9):1301–11.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2014.939627>
11. Сереброва СЮ, Стародубцев АК, Белякова ГА, Добровольский ОВ, Дамбаева АД. Фармакоэкономическая оценка применения Нексиума при кислотозависимых заболеваниях пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки. *Интернист*. 29.03.2011.
Serebrova SYu, Starodubtsev AK, Belyakova GA, Dobrovolsky OV, Dambaeva AD. Pharmacoeconomic evaluation of the use of Nexium in acid-related diseases of the esophagus, stomach and duodenum. *Internist*. 29.11.2011 (In Russ.).
<https://internist.ru/publications/detail/farmakoeconomicheskaya-ocenka-primeneniya-nexiuma-pri-kislotozavisimyh-zabolevaniyah-pisheвода,-zheludka-i-dvenadcatiperstnoy-kishki/>
12. Евсютина ЮВ. Эффективность омепразола при лечении пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2017;27(1):44–9.
Evsyutina YuV. Efficacy of esomeprazole at treatment of patients with a gastroesophageal reflux disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2017;27(1):44–9 (In Russ.). EDN: [ZIPAXN](#)

13. Евсютина ЮВ, Трухманов АС. Ведение пациентов с рефрактерной ГЭРБ. *PMЖ*. 2015;23(28):1684–8. Evsytina YuV, Trukhmanov AS. Refractory GERD management. *RMJ*. 2015;23(28):1684–8. (In Russ.). EDN: [VLCICZ](#)
14. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen and Co; 1959. 238 p.
15. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: an add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010;99(3):306–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>
16. Hassan-Alin M, Andersson T, Bredberg E, Röhss K. Pharmacokinetics of esomeprazole after oral and intravenous administration of single and repeated doses to healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;56(9–10):665–70. <https://doi.org/10.1007/s002280000206>
17. Sarker UK, Misbahuddin M, Ripon MSH, Islam MR. Randomized, open-label, two-way crossover study to compare the bioequivalence of two formulations of esomeprazole in healthy male volunteers. *KYAMC Journal*. 2017;4(1):326–30. <https://doi.org/10.3329/kyamcj.v4i1.32254>
18. Cook EK, Satake N, Sykes BW, Bennett EL, Mills PC. Pharmacokinetics of esomeprazole following intravenous and oral administration in healthy dogs. *Vet Med (Auckl)*. 2016;7:123–31. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S112643>
19. Макарова МН, Рыбакова АВ, Гушин ЯА, Шедько ВВ, Мужикян АА, Макаров ВГ. Анатомо-физиологическая характеристика пищеварительного тракта у человека и лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;(1):82–104. Makarova MN, Rybakova AV, Guschin YaA, Shedko VV, Muzhikyan AA, Makarov VG. Anatomical and physiological characteristics of the digestive tract in humans and laboratory animals. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2016;(1):82–104 (In Russ.). EDN: [VPPVST](#)
20. Лактионов КС, Айвазова ДС. Прецекальное симбионтное пищеварение у кроликов. *Образование и наука в России и за рубежом*. 2019;(14):155–65. Laktionov KS, Ajvazova DS. Fecal symbiotic digestion in rabbits. *Education and Science in Russia and Abroad*. 2019;(14):155–65 (In Russ.). EDN: [CYCGFX](#)
21. Andersson T, Röhss K, Bredberg E, Hassan-Alin M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of esomeprazole, the S-isomer of omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15(10):1563–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2001.01087.x>
22. Andersson T, Hassan-Alin M, Hasselgren G, Röhss K, Weidolf L. Pharmacokinetic studies with esomeprazole, the (S)-isomer of omeprazole. *Clin Pharmacokinetics*. 2001;40(6):411–26. <https://doi.org/10.2165/00003088-200140060-00003>
23. Liu ZZ, Ren Q, Zhou YN, Yang HM. Bioequivalence of two esomeprazole magnesium enteric-coated formulations in healthy Chinese subjects. *World J Clin Cases*. 2020;8(22):5518–28. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i22.5518>
24. Hwang JH, Jeong JW, Song GH, Koo TS, Seo KW. Pharmacokinetics and acid suppressant efficacy of esomeprazole after intravenous, oral, and subcutaneous administration to healthy beagle dogs. *J Vet Intern Med*. 2017;31(3):743–50. <https://doi.org/10.1111/jvim.14713>
25. Kim TH, Thapa SK, Lee DY, Chung SE, Lim JY, Jeong HM, et al. Pharmacokinetics and anti-gastric ulceration activity of oral administration of aceclofenac and esomeprazole in rats. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):152–67. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030152>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *В.М. Косман* – проведение анализа токсикокинетических параметров, написание текста рукописи; *М.В. Карлина* – обсуждение результатов оценки токсикокинетики; *Е.В. Мазукина* – координация планирования и выполнения исследовательской работы, сбор, анализ и интерпретация данных, обсуждение результатов оценки токсических свойств и местно-раздражающего действия; *А.А. Глобенко* – критический анализ дизайна исследования; *Е.А. Джайн* – согласование итоговой версии рукописи для публикации; *М.Н. Макарова* – критический пересмотр содержания рукописи, *В.Г. Макаров* – критический пересмотр содержания и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Vera M. Kosman* analysed toxicokinetic parameters and drafted the manuscript. *Marina V. Karlina* discussed the results of the toxicokinetic study. *Elizaveta V. Mazukina* coordinated research planning and activities; collected, analysed, and interpreted the data; discussed the results of toxicity and local tolerance tests. *Alexander A. Globenko* critically analysed the study design. *Ekaterina A. Jain* approved the final version of the manuscript for publication. *Marina N. Makarova* critically revised the manuscript. *Valery G. Makarov* critically revised the manuscript and approved the final version for publication.

Соответствие принципам этики. Все исследования были выполнены в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследований было одобрено на заседании биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», протокол заседания БЭК от 16.01.2019 № 4.4/19.

Благодарности. Работа выполнена без государственного бюджетного финансирования при финансовой поддержке АО «Валента Фарм», Россия.

Конфликт интересов. Существует потенциальный конфликт интересов в силу финансирования данной научной работы компанией АО «Валента Фарм». Однако при написании статьи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The study was approved by the Bioethics Committee of the research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" (Approval No. 4.4/19 of 16.01.2019).

Acknowledgements. The study received no government budget funding; the work was supported by Valenta Pharm JSC, Russia.

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Косман Вера Михайловна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>
kosman.vm@doclinika.ru

Карлина Марина Валерьевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
karlina.mv@doclinika.ru

Мазукина Елизавета Владимировна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1448-921X>
mazukina.ev@doclinika.ru

Глобенко Александр Александрович, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
aleksandr.globenko@valentapharm.com

Джайн Екатерина Александровна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>
ekaterina.korsakova@valentapharm.com

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Поступила 24.10.2022

После доработки 03.03.2023

Принята к публикации 10.03.2023

Online first 17.05.2023

Vera M. Kosman, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>
kosman.vm@doclinika.ru

Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
karlina.mv@doclinika.ru

Elizaveta V. Mazukina
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1448-921X>
mazukina.ev@doclinika.ru

Alexander A. Globenko, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
aleksandr.globenko@valentapharm.com

Ekaterina A. Jain, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>
ekaterina.korsakova@valentapharm.com

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Received 24 October 2022

Revised 3 March 2023

Accepted 10 March 2023

Online first 17 May 2023

УДК 615.076.9:616.24-002.5:615.281
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-191-204>



Оригинальная статья | Original article



Изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия нового противотуберкулезного препарата тиозонид у беременных кроликов

А.Ю. Бородина^{1,✉}, К.Л. Крышень¹, А.Ю. Савченко², М.Н. Макарова¹, В.Г. Макаров¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», ул. Заводская, д. 3, к. 245, Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», пос. Светлые Горы, влд. 1, Красногорский р-н, Московская обл., 143442, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Бородина Антонина Юрьевна borodina.ay@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

Для лечения туберкулеза используют различные схемы лечения с применением противотуберкулезных препаратов. Разработано новое оригинальное противомикробное средство тиозонид, оказывающее бактериостатическое действие на штаммы *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, CN-37, CN-40 и MS-115.

Цель работы: изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия препарата тиозонид у беременных кроликов.

Материалы и методы: исследование проведено на 66 беременных самках кроликов (4 группы по 16–17 животных). Тиозонид вводили кроликам перорально с 6 по 19 сут беременности в дозах 20,6 мг/кг (терапевтическая доза, ТД), 103 мг/кг (5 ТД), 206 мг/кг (10 ТД). В качестве контрольного вещества использовали 1% раствор крахмала. После проведения плановой эвтаназии у беременных самок оценивали макроскопически органы репродуктивной системы, проводили гистологическое исследование плаценты. Живые плоды осматривали на наличие аномалий развития, определяли развитие скелета по модифицированной методике Доусона и проводили гистологическое исследование внутренних органов.

Результаты: у беременных самок на фоне применения тиозонида во всех исследуемых дозах признаков интоксикации не выявлено, гибель животных отсутствовала. Результаты макроскопического и гистологического исследований свидетельствовали об отсутствии патологических изменений репродуктивных органов самок. При оценке показателей эмбриотоксического и фетотоксического действия отличий между плодами в группах животных, получавших препарат в различных дозах, и в контрольной группе не выявлено. Аномалий развития у плодов не зарегистрировано. При исследовании развития скелета и состояния внутренних органов плодов отличий от нормы и межгрупповых отличий не обнаружено. У одной беременной самки, получавшей тиозонид в дозе 206 мг/кг, была обнаружена гибель всех плодов с поздней резорбцией. С учетом данного факта дозой, не оказывающей видимых побочных эффектов (NOAEL), целесообразно считать 103 мг/кг (5 ТД).

Выводы: препарат тиозонид не оказывает эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия.

Ключевые слова: туберкулез; тиозонид; противотуберкулезный препарат; кролики; беременность; эмбриотоксичность; фетотоксичность, тератогенность

Для цитирования: Бородина А.Ю., Крышень К.Л., Савченко А.Ю., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия нового противотуберкулезного препарата тиозонид у беременных кроликов. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):191–204. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-191-204>

A Study of Embryotoxic, Foetotoxic, and Teratogenic Effects of the Original Antituberculosis Agent Thiozonide in Pregnant Rabbits

A.Yu. Borodina^{1,✉}, K.L. Kryshen¹, A.Yu. Savchenko², M.N. Makarova¹, V.G. Makarov¹

¹ Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district,
Leningrad region 188663, Russian Federation

² Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia,
1 Svetlye Gory settlement, Krasnogorsk district, Moscow region 143442, Russian Federation

✉ Corresponding author: Antonina Yu. Borodina borodina.ay@doclinika.ru

ABSTRACT

Several treatment regimens with antituberculosis medicinal products are available for tuberculosis. Thiozonide is a newly developed original antimicrobial agent that exhibits bacteriostatic activity against *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv, CN-37, CN-40, and MS-115.

The aim of the study was to investigate the embryotoxic, foetotoxic, and teratogenic effects of thiozonide in pregnant rabbits.

Materials and methods. The study involved 66 pregnant rabbits (4 groups of 16–17 animals each). The rabbits received oral thiozonide from day 6 to day 19 of gestation at doses of 20.6 mg/kg (1 TD (therapeutic dose)), 103 mg/kg (5 TDs), and 206 mg/kg (10 TDs). The control group received a 1% starch solution. The authors conducted a macroscopic examination of the reproductive organs and a histological evaluation of the placenta in euthanised pregnant rabbits. Live foetuses underwent a check for developmental abnormalities, a skeletal development evaluation with a modified Dawson's method, and a histologic examination of the internal organs.

Results. The study showed no clinical signs of toxicity and no mortality associated with thiozonide in pregnant rabbits across all dose groups. Macroscopic and histological examinations revealed no pathological changes in the reproductive organs of pregnant rabbits. The evaluation of embryotoxic and foetotoxic effects did not identify any differences between the foetuses of the animals assigned to different doses of thiozonide and the control group. The authors found no developmental abnormalities in the foetuses. Examinations of foetal skeleton development and internal organ condition identified no differences between the groups and no abnormalities. The authors registered the death of all foetuses (late resorption) in one rabbit from the 206 mg/kg group. Therefore, the 103 mg/kg dose (5 TDs) was selected as a reasonable No Observed Adverse Effect Level (NOAEL).

Conclusions. Thiozonide has no embryotoxic, foetotoxic, or teratogenic effects.

Key words: tuberculosis; thiozonide; antituberculosis medicinal product; rabbits; pregnancy; embryotoxicity; foetotoxicity; teratogenicity

For citation: Borodina A.Yu., Kryshen K.L., Savchenko A.Yu., Makarova M.N., Makarov V.G. A study of embryotoxic, foetotoxic, and teratogenic effects of the original antituberculosis agent thiozonide in pregnant rabbits. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):191–204. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-191-204>

Введение

Туберкулез (ТБ) занимает второе место по смертности в мире среди инфекционных заболеваний. С 2020 г. смертность от туберкулеза начала расти впервые за долгое время¹. С 2020 по 2021 г. увеличилось число случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ)². Однако, по данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, к концу 2019 г. смертность от ТБ снизилась до национального минимума (5,1%), в то время как в Советском Союзе этот показатель составлял 7,7%³. Ожидается дальнейшее снижение смертности от ТБ при выполнении условия преждевременного выявления случаев заболевания [1]. Тем не менее Россия находится в первой тройке стран с ростом числа больных с МЛУ-ТБ⁴.

Проблема формирования МЛУ-ТБ, остро стоящая во всем мире, обусловлена длительностью лечения ТБ (до двух лет), высокой стоимостью лекарственных препаратов, низкой переносимостью противотуберкулезных препаратов резервного ряда, а также необходимостью проведения интенсивной химиотерапии [2]. Поэтому разработка, исследования и внедрение новых противотуберкулезных препаратов с высокой активностью и низкой токсичностью остается актуальной задачей. Перспективным кандидатом для лечения ТБ является оригинальный препарат тиозонид (АО «Фарм-Синтез», Россия) химическое название {{1R,2S + 1S,2R}-1-(6-бром-2-хлор-хинолил-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(нафталин-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол), синтетическое противомикробное средство для перорального применения [3]. Оказывает бактериостатическое действие на чувствительные штаммы *Mycobacterium tuberculosis* типа H37Rv и на штаммы CN-37, CN-40 и MS-115, резистентные к препаратам первой линии [4]. Предполагается, что под воздействием тиозонида блокируется специфический бактериальный фермент, отвечающий за синтез АТФ в клетке *M. tuberculosis* [5].

Особое внимание на этапе доклинических и клинических исследований уделяется влиянию исследуемого препарата на организм

беременных и плода. Многие антибактериальные препараты, применяемые в том числе для лечения туберкулеза, могут оказывать тератогенное действие. Их применение у беременных в клинической практике ограничено или запрещено [6]. Лекарственные препараты в зависимости от их тератогенных свойств ранее подразделялись на категории в соответствии с правилами маркировки препаратов, отпускаемых по рецепту, установленных Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA)⁵:

- категория А – отсутствие риска в исследованиях на людях, исследования не показали риска для плода в первом триместре беременности и в более поздних триместрах;
- категория В – исследования на животных не показали риска для плода, адекватных исследований у беременных женщин нет;
- категория С – исследования на животных показали негативное воздействие на плод, хорошо контролируемых исследований на людях нет, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин;
- категория D – имеются риски для плода человека, основанные на данных исследований на людях, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин;
- категория X – противопоказан при беременности, исследования на животных и людях продемонстрировали аномалии плода.

В 2014 г. вступили в силу новые рекомендации FDA по маркировке лекарственных средств, упраздняющие буквенную систему классификации оценки потенциального риска для беременных и кормящих женщин⁶. Тем не менее представленная классификация удобна для сравнительной оценки рисков клинического применения отдельных лекарственных средств.

В *таблице 1* представлены примеры принадлежности ряда антибиотиков к перечисленным категориям [6].

Проявление тератогенных эффектов может быть различным. Например, в исследовании

¹ Всемирный день борьбы с туберкулезом 2022 г. <https://www.who.int/ru/campaigns/world-tb-day/2022>

² Туберкулез. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>

³ Туберкулез. <https://zdrav.expert/index.php/Статья:Туберкулез>

⁴ Там же.

⁵ Labeling and prescription drug advertising: content and format for labeling for human prescription drugs. FDA; 1979.

⁶ Content and Format of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products; Requirements for Pregnancy and Lactation Labeling. FDA-2006-N-0515 (formerly Docket No. 2006N-0467). FDA; 2014.

Таблица 1. Категории антибактериальных препаратов в зависимости от тератогенных свойств (адаптировано из [6])

Table 1. Categories of antibacterial medicinal products according to teratogenic properties (adapted from [6])

Название группы препаратов или препарата <i>Antibacterial medicinal products (group of products)</i>	Категория в зависимости от тератогенных свойств* <i>Category according to teratogenic properties*</i>
Аминогликозиды / <i>Aminoglycosides</i>	D
Бедаквилин / <i>Bedaquiline</i>	B
Изониазид / <i>Isoniazid</i>	C
Клиндамицин / <i>Clindamycin</i>	B
Пиразинамид / <i>Pyrazinamide</i>	C
Рифампицин / <i>Rifampicin</i>	C
Тетрациклины / <i>Tetracyclines</i>	D
Тигециклин / <i>Tigecycline</i>	D
Цефалоспорины / <i>Cephalosporins</i>	B
Этамбутол / <i>Ethambutol</i>	B

Примечание. В – исследования на животных не показали риска для плода, адекватных исследований у беременных женщин нет; С – исследования на животных показали негативное воздействие на плод, хорошо контролируемых исследований на людях нет, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин; D – имеются риски для плода человека, основанные на данных исследований на людях, потенциальная польза может оправдывать применение препарата у беременных женщин.

* В соответствии с классификацией Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration)⁷.

Note. B: animal reproduction studies have failed to demonstrate a risk to the foetus, and there are no adequate and well-controlled studies in pregnant women. C: animal reproduction studies have shown an adverse effect on the foetus, and there are no adequate and well-controlled studies in humans, but potential benefits may warrant use of the medicinal product in pregnant women despite potential risks. D: there is positive evidence of human foetal risk based on adverse reaction data from investigational or marketing experience or studies in humans, but potential benefits may warrant use of the medicinal product in pregnant women.

* According to the Food and Drug Administration classification⁷.

J.S. Steen и соавт. [7] введение рифампицина крысам и мышам в период с 1 по 12 сут беременности в дозе, в 15 раз превышающей дозу для человека, приводило к анэнцефалии, расщеплению позвоночника и неба, тогда как у кроликов доза, в 20 раз превышающая дозу для человека, которую вводили с 6 по 15 сут беременности, не повлияла на развитие плода. Описана связь между применением рифампицина в период беременности и кровотечением у новорожденных [8]. Препараты группы тетрациклинов проникают через гематоплацентарный барьер и при использовании матерью в третьем триместре беременности могут вызывать необратимые изменения цвета костей и зубов у ребенка. Препараты группы аминогликозидов при применении во время беременности могут вызывать необратимую двустороннюю врожденную глухоту у ребенка [6, 9].

⁷ Labeling and prescription drug advertising: content and format for labeling for human prescription drugs. FDA; 1979.

⁸ ICH S5 (R3) Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2020.

Вышеперечисленные примеры подчеркивают важность и необходимость исследования новых противотуберкулезных средств на предмет их тератогенного действия. Исследования эмбрио- и фетотоксичности являются неотъемлемой частью общей программы доклинических исследований новых лекарственных средств. Согласно современным требованиям в качестве тест-системы необходимо использовать не менее двух видов животных, как правило, крыс и кроликов⁸.

Цель работы – изучение эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного действия препарата тиозонид у беременных кроликов.

Материалы и методы

Животные. Для проведения эксперимента использовали 80 половозрелых ранее нерожавших самок (4 группы по 20 самок) и 40 самцов

кроликов породы Советская шиншилла в возрасте 6 мес. (ФГУП ОПХ «Манихино», Московская область). Самцы использовались только для оплодотворения самок. По результатам диагностики беременности и патоморфологического исследования животных беременность наступила у 66 самок: в группе 1 – у 17 самок, в группе 2 – у 16 самок, в группе 3 – у 17 самок и в группе 4 – у 16 самок. Самки, у которых беременность не наступила, были исключены из статистического анализа. Проведение исследования было одобрено на заседании биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол заседания БЭК от 12.01.2022 № 2.1/22). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных⁹ и Директивой 2010/63/EU¹⁰. Кроликов размещали индивидуально в решетчатых клетках со сплошным дном и индивидуальной кормушкой и поилкой, в качестве подстилки использовались древесные гранулы. Температура в помещении вивария 15–22 °С, влажность >45%, световой режим 12 ч темноты и 12 ч света. Кролики получали полнорационный комбикорм и воду *ad libitum*.

Исследуемый препарат. Тестируемый препарат тиозонид, капсулы, 100 мг для перорального применения (производитель АО «Фарм-Синтез», Россия; серия 7010721). В качестве контрольного вещества использовали 1% раствор крахмала (носитель для тестируемого препарата).

Выбор доз и способ введения. Терапевтическая доза (ТД) препарата для человека составляет 400 мг/сут (4 капсулы по 100 мг) или 400 мг/60 кг ≈ 6,7 мг/кг массы тела. ТД для кролика с учетом метаболических коэффициентов¹¹ составила:

$$\text{ТД для кролика} = (6,7 \times 37) / 12 \approx 20,6 \text{ мг/кг, (1)}$$

где 6,7 мг/кг – ТД в сутки для человека; 37 – метаболический коэффициент для человека; 12 – метаболический коэффициент для кролика.

В данном исследовании был изучен следующий диапазон доз: 20,6 мг/кг (ТД),

103 мг/кг (5 ТД), 206 мг/кг (10 ТД). Препарат вводили самкам в виде суспензии капсульной массы в носителе (1% раствор крахмала) 1 раз/сут перорально шприцом без иглы в объемах от 0,6 до 5,6 мл/кг. Контрольное вещество вводили животным в объеме 5,6 мл/кг.

Дизайн исследования. Дизайн исследования был подготовлен в соответствии с рекомендациями ICH S5 (R3)¹² и Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств¹³. Всего было сформировано 4 группы по 20 самок: животные группы 1 получали контрольное вещество (1% раствор крахмала), животные групп 2–4 – тестируемый препарат тиозонид в дозах 20,6, 103 и 206 мг/кг соответственно.

Первым этапом эксперимента являлось оплодотворение самок для получения не менее 16 беременных самок на группу¹⁴. После регистрации спаривания и определения 1 сут беременности (день садки), самкам с 6 сут (имплантация яйцеклетки) по 19 сут беременности перорально вводили исследуемый препарат и контрольное вещество. На протяжении всего эксперимента ежедневно осуществляли клиническое наблюдение за животными, массу тела регистрировали 2 раза в неделю. В интервале с 15 по 19 сут после спаривания проводили оценку наличия беременности, включающую в себя пальпацию брюшной полости и проведение ультразвукового исследования с помощью аппарата Mindray DP-50 (Mindray, Китай).

Эвтаназию беременных самок всех групп осуществляли на 28–29 сут беременности с помощью передозировки анестетиков (пропофол в дозе 9 мг/кг внутривенно, затем Риделат®-С 4 мг/кг внутривенно) с последующим извлечением жизненно важных органов. Выбранный способ эвтаназии соответствует указаниям Директивы 2010/63/EU.

Патоморфологическое и гистологическое исследование. После проведения плановой эвтаназии проводили макроскопическое исследование органов репродуктивной системы самок,

⁹ Белозерцева ИВ, Блинова ДВ, Красильщикова МС, ред. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. М.: ИРБИС, 2017.

¹⁰ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.

¹¹ Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Guidance for Industry. FDA; 2005.

¹² ICH S5 (R3) Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2020.

¹³ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. М: Гриф и К; 2012.

¹⁴ ICH S5 (R3) Guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2020.

выполняли подсчет количества желтых тел в обоих яичниках, количества мест имплантации, количества живых и мертвых плодов с определением ранней или поздней резорбции. Все живые плоды осматривали с целью выявления возможных аномалий развития, определяли пол, массу тела, краниокаудальный размер. По завершении осмотра плоды были эвтаназированы путем внутримышечного введения препарата Риделат®-С в дозе 4 мг/кг с последующим извлечением внутренних органов.

У половины плодов определяли состояние и уровень развития скелета по методике Доусона, модифицированной в отделе эмбриологии НИИЭМ АМН СССР¹⁵ [10]. Для макроскопического исследования скелета были выполнены цифровые фотографии тотальных препаратов плодов в режиме макросъемки в двух проекциях на фотоаппарате Canon Power Shot SX260HS (Canon, Япония) с разрешением 12,1 Мпикс. Отмечали степень развития, фиксировали возможные аномалии скелета (сращенные, удвоенные, дефектные позвонки и ребра), задержку/снижение оксификации, число точек окостенения в различных костных образованиях. Уровень оксификации оценивали по глубине окраски отделов: костей черепа, грудного отдела, грудных и тазовых конечностей, включая кости поясных конечностей. Оценивали наличие/отсутствие оксификации подъязычной кости и костей грудины; фиксировали число оксифицированных позвонков хвоста, пястных костей и костей плюсны, проксимальных и дистальных фаланг каждой конечности.

У оставшихся плодов изучали состояние внутренних органов (головной мозг, сердце, легкие, желудок, кишечник, печень, почки, семенники, яичники) путем гистологического исследования препаратов по методике Вильсона в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР¹⁶. Извлеченные органы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч [11]. Материал проходил стандартную обработку с целью изготовления гистологических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 5–7 мкм [12]. Для макроскопического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Кроме того, гистологическому исследованию была подвергнута плацента самок. Анализ гистологических препаратов проводили при помощи светооптического

микроскопа Accu-Scope® 3000-LED Microscope Series (Accu-Scope, США) при увеличении 40, 100 и 400. Микрофотографирование проводилось при помощи цифровой фотокамеры Toupcam UCMOS05100KPA (Китай) и программного обеспечения ToupView 3.7.7892 (Китай).

Анализ данных. Статистический анализ данных выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения Prism 9.1.1 (GraphPad Software, США). Для оценки данных с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ – тест Брауна–Форсайта и однофакторный тест ANOVA по Уэлчу (Brown–Forsythe and Welch’s ANOVA tests), post-hoc тест Даннета (post-hoc Dunnett’s test) – и двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA tests) с последующим post-hoc тестом Даннета. Для анализа данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали критерий Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test) с дальнейшим применением post-hoc теста Данна (Dunn’s test). Оценку распределения по полу у живых плодов проводили с помощью точного критерия Фишера. Различия определяли при уровне значимости $p < 0,05$ ¹⁷.

Результаты и обсуждение

Результаты клинического наблюдения и анализа данных массы тела беременных самок показали, что на всех сроках беременности, в том числе в дни перорального введения исследуемых препаратов, клинических признаков развития интоксикации отмечено не было, наблюдался равномерный прирост массы тела во всех группах. Гибель животных в эксперименте отсутствовала.

При анализе данных, полученных после плановой эвтаназии на 28–29 сут эксперимента, у беременных самок, которым вводили препарат тиозонид во всех исследуемых дозах, не было выявлено статистически значимых отличий от животных контрольной группы по количеству желтых тел, количеству мест имплантации, количеству живых и мертвых плодов с ранней и поздней резорбцией. При оценке показателей эмбриотоксического действия (разность между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке) и фетотоксического действия (разность между количеством мест имплантации в матке и количеством живых плодов) статистически значимых отличий между

¹⁵ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

¹⁶ Там же.

¹⁷ Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.

животными в исследуемых группах также не выявлено. Во всех группах у плодов не зарегистрировано аномалий развития (табл. 2). Целостность всех плодов была сохранена, анатомическое строение соответствовало норме. Голова, хвост, грудные и тазовые конечности полностью сформированы, по 4 пальца на каждой тазовой конечности и по 5 пальцев на каждой грудной конечности с зачатками когтей. Волосьяной покров отсутствовал, веки сомкнуты плотно, наружный слуховой проход закрыт ушной раковиной. Соотношение самцов и самок среди исследованных плодов во всех группах было практически идентично и составило примерно 1:1, показатели массы тела и краниокаудальный размер статистически не отличались между группами (табл. 3).

Необходимо отметить, что после эвтаназии была обнаружена гибель всех плодов с поздней

резорбцией у одной беременной самки из группы 4, получавшей тиозонид в дозе 206 мг/кг. Это не повлияло на результаты статистического анализа, тем не менее данный факт может являться биологически значимым эффектом. Клиническое наблюдение за самкой не выявило отклонений от нормы ни по одному из регистрируемых показателей на протяжении всего эксперимента. Причиной пренатальной смертности могли явиться эндокринные факторы, такие как низкий уровень прогестерона и эстрадиола [13], определение которых не предусмотрено в стандартных протоколах исследований. Важным фактором, влияющим на течение беременности и смертность плодов, является стресс, который нельзя исключить у лабораторных животных в связи с проводимыми с ними манипуляциями [14]. Поскольку данный случай был выявлен у животного из группы, получавшей максимальную

Таблица 2. Показатели эмбрио- и фетотоксического действия препарата тиозонид в исследовании на беременных кроликах

Table 2. Embryotoxic and foetotoxic effects of thiozonide observed in pregnant rabbits

Показатель <i>Parameter</i>	Характеристика групп <i>Characteristics of groups</i>			
	Группа 1 <i>Group 1</i> <i>n=17</i>	Группа 2 <i>Group 2</i> <i>n=16</i>	Группа 3 <i>Group 3</i> <i>n=17</i>	Группа 4 <i>Group 4</i> <i>n=16</i>
	1% раствор крахмала <i>1% starch solution</i>	Тиозонид 20,6 мг/кг <i>Thiozonide, 20.6 mg/kg</i>	Тиозонид 103 мг/кг <i>Thiozonide, 103 mg/kg</i>	Тиозонид 206 мг/кг <i>Thiozonide, 206 mg/kg</i>
Количество желтых тел <i>Corpora lutea</i>	9,0 (7,5;10,0)	8,5 (7,25;9,75)	8,0 (4,50;9,0)	9,0 (8,0;10,75)
Количество мест имплантации <i>Implantation sites</i>	8,0 (7,00;9,0)	8,0 (6,0;8,0)	7,0 (6,0;8,0)	7,5 (6,0;9,0)
Количество живых плодов <i>Live foetuses</i>	8,0 (6,5;9,0)	8,0 (6,0;8,0)	7,0 (4,50;8,0)	7,0 (2,75;8,75)
Количество погибших плодов <i>Dead foetuses</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,75)
Количество ранних резорбций <i>Early resorptions</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)
Количество поздних резорбций <i>Late resorptions</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)
Предимплантационная смертность <i>Pre-implantation mortality</i>	1,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;2,0)	1,0 (0,0;1,0)	2,0 (0,0;3,0)
Постимплантационная смертность <i>Postimplantation mortality</i>	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)
Количество плодов с внешними аномалиями <i>Foetuses with external abnormalities</i>	0	0	0	0

Примечание. Данные представлены в формате *Me (Q1;Q3)* – медиана и квартильный размах; *n* – количество животных в группе.

Note. Results are presented as the median and quartile range (*Me (Q1;Q3)*). *n*, number of animals per group.

Таблица 3. Масса тела, краниокаудальный размер, распределение по полу плодов кроликов (после плановой эвтаназии самок кроликов на 28–29 сут беременности)

Table 3. Foetal body weight, craniocaudal size, and sex (after scheduled euthanasia of pregnant rabbits on gestation day 28–29)

Показатель <i>Parameter</i>	Характеристика групп <i>Characteristics of groups</i>			
	Группа 1 <i>Group 1</i> n=130	Группа 2 <i>Group 2</i> n=116	Группа 3 <i>Group 3</i> n=105	Группа 4 <i>Group 4</i> n=99
	1% раствор крахмала <i>1% starch solution</i>	Тиозонид 20,6 мг/кг <i>Thiozonide, 20.6 mg/kg</i>	Тиозонид 103 мг/кг <i>Thiozonide, 103 mg/kg</i>	Тиозонид 206 мг/кг <i>Thiozonide, 206 mg/kg</i>
Масса тела*, г <i>Body weight*, g</i>	32,35 (29,740;35,923)	30,77 (27,075;34,995)	33,73 (29,365;37,505)	31,50 (27,600;34,080)
Краниокаудальный размер*, мм <i>Craniocaudal size*, mm</i>	84 (80,0;90,0)	85 (80,0; 87,8)	84 (79,0;88,5)	85 (82,0;89,0)
Распределение плодов по полу, самцы/самки <i>Foetal sex ratio, male/female</i>	61/69	60/56	54/51	47/52

Примечание. n – количество животных в группе.

* Данные представлены в формате *Me (Q1;Q3)* – медиана и квартильный размах.

Note. n, number of animals per group.

* Results are presented as the median and quartile range (*Me (Q1;Q3)*).

дозу, нельзя исключить и негативное влияние тестируемого препарата. С учетом обнаруженного факта дозой, не оказывающей видимых побочных эффектов (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL), в данном исследовании целесообразно считать 103 мг/кг, что эквивалентно 5 ТД. На основании полученных данных препарат тиозонид по тератогенным свойствам может быть отнесен к категории В¹⁸.

При макроскопическом исследовании патологических изменений в матке и яичниках не отмечали, анатомия и физиология половых органов самок соответствовали стадии беременности. Матка была значительно увеличена в объеме, хорошо прощупывались развитые плоды. Эндометрий был утолщен, гиперемирован, маточные железы увеличены. Просматривалась хорошо развитая сосудистая сеть. Яичники были без патологических изменений.

Гистологическое строение плаценты соответствовало сроку беременности и не отличалось от нормы у самок всех групп. Децидуальная зона была представлена обширными участками некроза, очагами кальцификации, массивными кровоизлияниями и тромбами в мелких сосудах (рис. 1). Таким образом, введение тестируемого препарата тиозонид во всех исследуемых

дозах не приводило к патологическим изменениям репродуктивных органов самок кролика.

При исследовании скелета плодов отличий от нормы и межгрупповых отличий не обнаружено. Развитие костных тканей нормальное. В черепе отчетливо просматривались лобные и теменные кости, решетчатая кость, кости нижней челюсти. Затылочная, клиновидная и чешуйчатые кости находились на начальных стадиях окостенения и были плохо различимы. Большинство костей лицевой части черепа и верхняя челюсть на этом этапе развития не кальцифицированы и при данной окраске не выявлялись.

Позвоночник плодов не окостеневший, за исключением поперечных отростков позвонков в шейном, грудном и поясничном отделах. Позвонки крестца и хвостового отдела полностью хрящевые. Ребра – частично окостеневшие, частично хрящевые. Грудина – полностью хрящевая.

Пояс грудных конечностей был представлен хорошо сформированными лопаткой и ключицей. В поясе тазовых конечностей просматривалась только подвздошная кость. Отчетливо просматривались кости конечностей (рис. 2).

При гистологическом исследовании головного мозга и внутренних органов плодов

¹⁸ Labeling and prescription drug advertising: content and format for labeling for human prescription drugs. FDA; 1979.

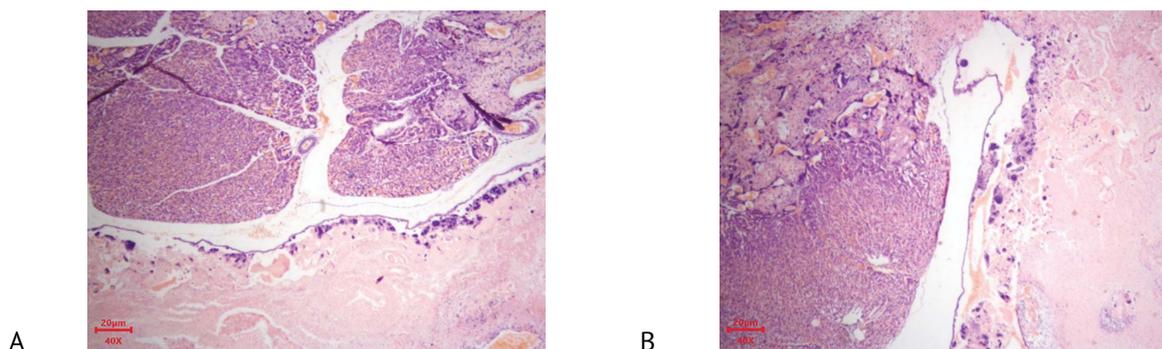


Рис. 1. Гистологическое исследование плаценты. (А) Плацента самки кролика из контрольной группы животных. (В) Плацента самки кролика из группы животных, получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 1. Placental histology: (A) the placenta of a rabbit from the control group; (B) the placenta of a rabbit from the 206 mg/kg thiozonide group. Haematoxylin and eosin staining

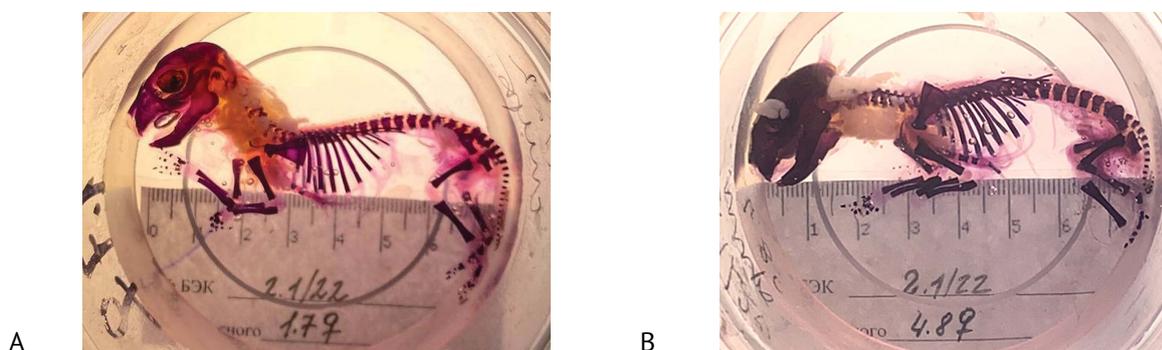


Рис. 2. Макроскопическое исследование развития скелета. (А) Скелет плода кролика из контрольной группы животных. (В) Скелет плода кролика из группы животных, получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг

Fig. 2. Macroscopic study of skeletal development: (A) a foetal skeleton from the control group; (B) a foetal skeleton from the 206 mg/kg thiozonide group

животных (сердца, легких, желудка, кишечника, печени, почек, семенников и яичников) во всех изученных группах патологических изменений морфологии органов и тканей не выявлено. Репрезентативные микрофотографии органов плодов контрольной группы животных и группы животных, получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг, представлены на *рисунке 3*.

Анализ данных патоморфологического исследования плодов кроликов показал, что в группах животных, получавших тиозонид во всех исследуемых дозах, и у животных контрольной группы патологические изменения архитектоники органов отсутствовали.

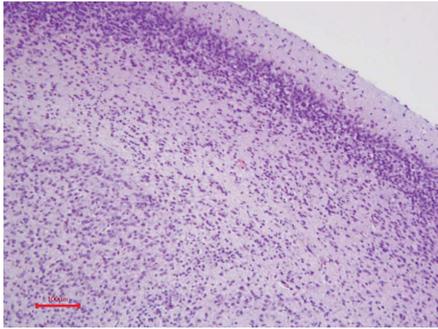
Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что тестируемый препарат тиозонид (АО «Фарм-Синтез», Россия) при многократном пероральном введении

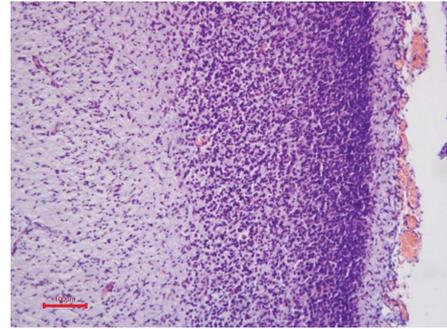
в диапазоне доз 20,6–103 мг/кг беременным самкам кроликов не оказывает эмбрио-, фетотоксического и тератогенного действия. В группе животных, получавшей тиозонид в максимальной исследуемой дозе 206 мг/кг, у одной самки во время эвтаназии была обнаружена гибель всех плодов с поздней резорбцией. Клиническое наблюдение за самкой не выявило отклонений от нормы на протяжении всего эксперимента, тем не менее нельзя исключить негативного влияния на организм беременных тестируемого препарата в высокой дозе. С учетом обнаруженного факта дозой, не оказывающей видимых побочных эффектов (NOAEL), в данном исследовании целесообразно считать 103 мг/кг, что эквивалентно 5 ТД.

На основании полученных данных препарат тиозонид по действию, оказываемому на организм беременных самок кролика, может быть отнесен к категории В

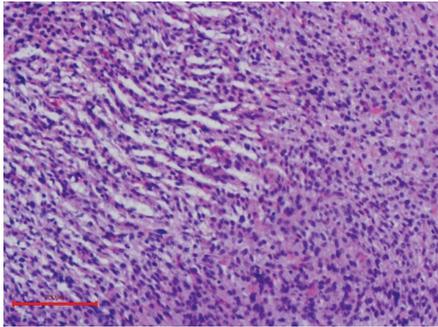
A1



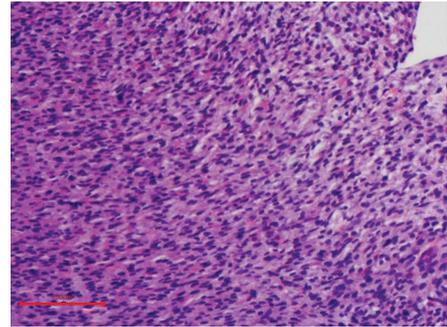
A2



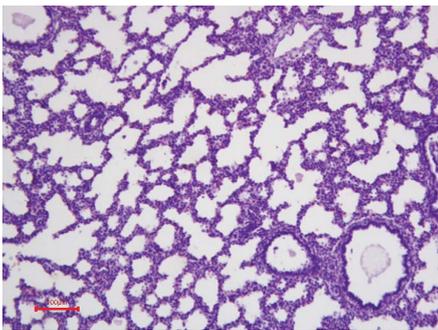
B1



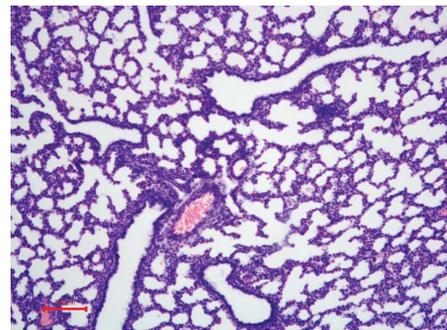
B2



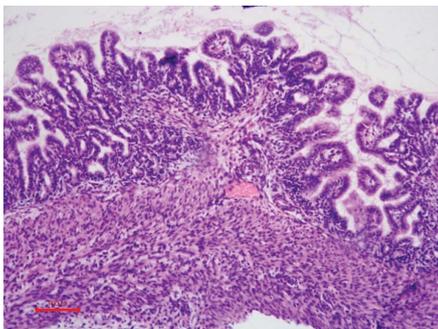
C1



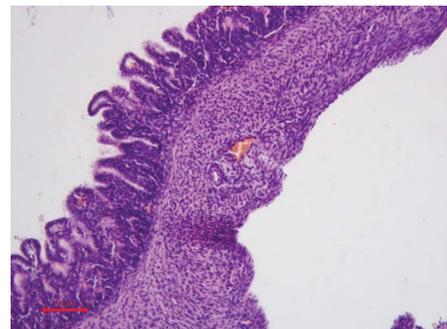
C2



D1



D2



E1



E2



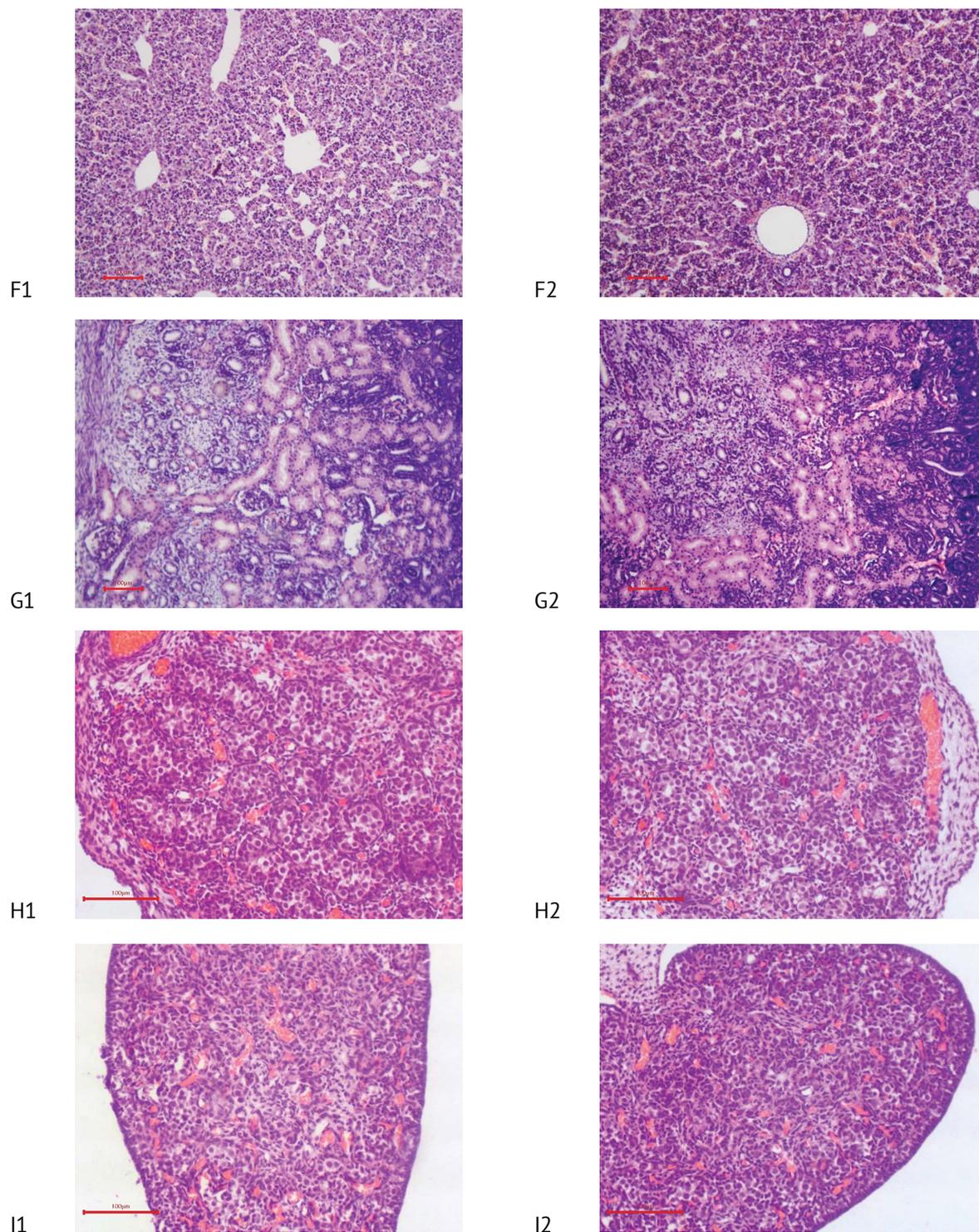


Рис. 3. Микрофотографии образцов тканей плодов животных из контрольной группы (индекс 1) и из группы получавших тиозонид в дозе 206 мг/кг (индекс 2) соответственно: А1 и А2 – головной мозг; В1 и В2 – миокард; С1 и С2 – легкие; D1 и D2 – желудок; E1 и E2 – кишечник; F1 и F2 – печень; G1 и G2 – почки; H1 и H2 – семенник; I1 и I2 – яичник. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 3. Micrographs of foetal tissue samples from the control group (index 1) and the 206 mg/kg thiozonide group (index 2): A1 and A2, brain; B1 and B2, myocardium; C1 and C2, lung; D1 and D2, stomach; E1 and E2, intestine; F1 and F2, liver; G1 and G2, kidney; H1 and H2, testis; I1 and I2, ovary. Haematoxylin and eosin staining

(исследования на животных не показали риска для плода, адекватных исследований у беременных женщин нет) и рекомендован

для проведения дополнительных клинических исследований с участием беременных женщин.

Литература / References

1. Васильева ИА, Тестов ВВ, Стерликов СА. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 – 2020–2021 гг. *Туберкулез и болезни легких*. 2022;100(3):6–12.
Vasilyeva IA, Testov VV, Sterlikov SA. Tuberculosis situation in the years of the COVID-19 pandemic – 2020–2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2022;100(3):6–12 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12>
2. Стерликов СА, Русакова ЛИ, Сон ИМ. Исходы случаев лечения туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью: результаты трехлетнего наблюдения. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики*. 2018;(2):14–27.
Sterlikov SA, Rusakova LI, Son IM. Extensively drug-resistant tuberculosis treatment outcomes: results of the three-year observation. *Current Problems of Health Care and Medical Statistics*. 2018;(2):14–27 (In Russ.).
3. Савченко АЮ, Буренков МС, Байдин ПС, Раменская ГВ, Перова НВ, Кукес ВГ. Исследование генотоксических свойств противотуберкулезного препарата тиозонид. *Туберкулез и болезни легких*. 2021;99(6):22–7.
Savchenko AYu, Burenkov MS, Baydin PS, Ramenskaya GV, Perova NV, Kukes VG. Study of genotoxic properties of thiozonide. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2021;99(6):22–7 (In Russ.).
<http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-6-22-27>
4. Бочарова ИВ, Буренков МС, Лепеха ЛН, Смирнова ТГ, Черноусова ЛН, Демикова ОВ. Доклинические исследования специфической активности нового противотуберкулезного препарата тиозонид. *Туберкулез и болезни легких*. 2014;(6):46–50.
Bocharova IV, Burenkov MS, Lepekhina LN, Smirnova TG, Chernousova LN, Demikhova OV. Preclinical studies of the specific activity of the new antituberculosis drug thiozonide. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2014;(6):46–50 (In Russ.). EDN: [SLSSBX](#)
5. Савченко АЮ, Раменская ГВ, Буренков МС. Изучение безопасности и переносимости противотуберкулезного препарата тиозонид при однократном приеме возрастающих доз. *Качественная клиническая практика*. 2016;(3):43–8.
Savchenko AU, Ramenskaya GV, Bourenkov MS. The safety and tolerability study of thiozonide in single dose with it increasing. *Good Clinical Practice*. 2016;(3):43–8 (In Russ.).
6. Bookstaver PB, Bland CM, Griffin B, Stover KR, Eiland LS, McLaughlin M. A review of antibiotic use in pregnancy. *Pharmacotherapy*. 2015;35(11):1052–62.
<https://doi.org/10.1002/phar.1649>
7. Steen JS, Stainton-Ellis DM. Rifampicin in pregnancy. *The Lancet*. 1977;2(8038):604–5.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)91447-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)91447-7)
8. Bothamley G. Drug treatment for tuberculosis during pregnancy: safety considerations. *Drug Saf*. 2001;24(7):553–65.
<https://doi.org/10.2165/00002018-200124070-00006>
9. Постников СС. Токсические эффекты антибиотиков. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2008;87(2):21.
Postnikov SS. Toxic effects of antibiotics. *Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*. 2008;87(2):21 (In Russ.). EDN: [JQPRZR](#)
10. Дыбан АП, Баранов ВС, Акимов ИМ. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1970;59(10):89–100.
Dyban AP, Baranov VS, Akimov IM. Basic methodological approaches to testing the teratogenic activity of chemical substances. *Archives of Anatomy, Histology, and Embryology*. 1970;59(10):89–100 (In Russ.). PMID: 5511190
11. Гушин ЯА, Мужикян АА. Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;(3):88–95.
Gushchin YaA, Muzhikyan AA. Effect of fixing liquids on microscopic structure of small laboratory animals. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;(3):88–95 (In Russ.). EDN: [SUEDYE](#)
12. Мужикян АА, Макарова МН, Гушин ЯА. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;(2):103–9.
Muzhikyan AA, Makarova MN, Gushchin YaA. Features histological processing of organs and tissues of laboratory animals. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;(2):103–9 (In Russ.). EDN: [SFLHTJ](#)
13. Vicente JS, Llobat L, Viudes-De-Castro MP, Lavara R, Baselga M, Marco-Jiménez F. Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. *Theriogenology*. 2012;77(1):81–8.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.019>
14. Rosell JM, de la Fuente LF, Carbajo MT, Fernández XM. Reproductive diseases in farmed rabbit does. *Animals*. 2020;10(10):1873.
<https://doi.org/10.3390/ani10101873>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.Ю. Бородина – проведение эксперимента, сбор и анализ данных, анализ литературы, написание текста рукописи; К.Л. Крышень – планирование эксперимента, анализ данных, участие в написании текста рукописи; А.Ю. Савченко – участие в написании текста рукописи; М.Н. Макарова – участие в написании рукописи и критический пересмотр ее содержания; В.Г. Макаров – критический пересмотр содержания и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Все исследования были выполнены в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследований было одобрено на заседании биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол заседания БЭК от 12.01.2022 № 2.1/22).

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке АО «Фарм-Синтез», Российская Федерация.

Конфликт интересов. Существует потенциальный конфликт интересов в связи с финансированием данной научной работы АО «Фарм-Синтез». Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

Authors' contribution. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Antonina Yu. Borodina conducted the experiment, collected and analysed data, analysed literature, and drafted the manuscript. Kirill L. Kryshen planned the experiment, analysed data, and participated in the drafting of the manuscript. Alla Yu. Savchenko participated in the drafting of the manuscript. Marina N. Makarova participated in the drafting of the manuscript and critically revised its content. Valery G. Makarov critically revised the content of the manuscript and approved the final version for publication.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The study was approved by the Bioethics Committee of the research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" (Approval No. 2.1/22 of 12.01.2022).

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by Pharm-Sintez AO, Russian Federation.

Conflict of interest. There is a potential conflict of interest due to the financing of this scientific work by Pharm-Sintez AO. However, when writing the article, the authors were guided by considerations of the scientific value of the obtained material and declare the impartiality of the assessment of the obtained data.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Бородина Антонина Юрьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5386-7551>
borodina.ay@doclinika.ru

Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Савченко Алла Юрьевна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>
alursav@mail.ru

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Поступила 02.03.2023

После доработки 03.04.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Antonina Yu. Borodina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5386-7551>
borodina.ay@doclinika.ru

Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Alla Yu. Savchenko, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>
alursav@mail.ru

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.),
Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Received 2 March 2023

Revised 3 April 2023

Accepted 6 June 2023

УДК 615.065

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-204-214>

Обзорная статья | Review



Идиосинкратическая лекарственная гепатотоксичность — от патогенеза к снижению риска

И.А. Мазеркина[✉]

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Мазеркина Ирина Анатольевна mazerkina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Идиосинкратическая лекарственная гепатотоксичность (ИЛГТ) — редкое и труднопрогнозируемое осложнение лекарственной терапии, в тяжелых случаях приводящее к смерти пациента или вызывающее необходимость пересадки печени.

Цель работы — обзор современных представлений об иммунном патогенезе ИЛГТ и возможностях прогнозирования и предупреждения риска его развития.

Печень обладает высокой иммунотолерантностью, что обеспечивается комплексом механизмов с участием различных клеток (антигенпрезентирующих клеток, Т-лимфоцитов), цитокинов и других молекул, препятствующих развитию иммунных ответных реакций при попадании в организм ксенобиотиков. Показано, что идиосинкратическое лекарственное повреждение печени развивается при комбинации нескольких взаимоусиливающих неблагоприятных факторов, нарушающих иммунотолерантность печени на разных уровнях. К ним относят химические свойства лекарственных средств, определяющие их гепатотоксичность, и индивидуальные особенности организма, в том числе генетически обусловленное строение и функционирование компонентов адаптивной иммунной системы. Многофакторность и разноуровневость патогенеза ИЛГТ не позволяет определить биомаркер риска для конкретного лекарственного средства. Анализ данных литературы показал, что на доклиническом этапе снизить риск гепатотоксичности препарата-кандидата и/или метаболита может оценка его способности вызывать повреждение митохондрий, образовывать нековалентные связи, активные формы кислорода, участвовать в высвобождении молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs). Ассоциации ИЛГТ при применении некоторых лекарственных средств с полиморфизмами генов у пациентов благодаря высокой отрицательной прогностической ценности могут использоваться в клинической практике для исключения ИЛГТ или выявления гепатотоксичного лекарственного средства при полипрагмазии. Перспективным представляется выявление комбинаций нескольких аллелей, ассоциированных с повышенным риском развития ИЛГТ, что повысит прогностическую ценность генных исследований и может быть использовано в персонализированной медицине.

Ключевые слова: идиосинкразия; лекарственное повреждение печени; патогенез лекарственной гепатотоксичности; иммунотолерантность; Т-клетки; сигнальные пути активации; генетические факторы риска; человеческий лейкоцитарный антиген

Для цитирования: Мазеркина И.А. Идиосинкратическая лекарственная гепатотоксичность — от патогенеза к снижению риска. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):204–214. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-204-214>

© И.А. Мазеркина, 2023

Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury: From Pathogenesis to Risk Reduction

I.A. Mazerkina[✉]

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Corresponding author: Irina A. Mazerkina mazerkina@expmed.ru

ABSTRACT

Idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI) is a rare and poorly predictable adverse drug reaction that may lead to death or liver transplantation in severe cases.

The aim of the study was to review contemporary concepts of the immune-mediated pathogenesis of iDILI and possible ways to predict and prevent the risk of developing this condition.

The liver is characterised by high immune tolerance due to a complex of mechanisms involving various cells (antigen-presenting cells, T-cells), cytokines, and other molecules, which prevents severe immune responses to xenobiotics entering the body. Previous research has shown that iDILI results from a combination of multiple synergistic unfavourable factors that impair liver immune tolerance at different levels. These factors include the hepatotoxicity-associated chemical properties of medicines and the individual characteristics of the patient, including the genetically determined structure and function of the adaptive immune system components. Since iDILI has a multilevel and multifactor pathogenesis, it is difficult to determine a risk biomarker for a particular medicine. According to the literature review, the risk of hepatotoxicity of a drug candidate and/or a metabolite can be reduced at the preclinical level by assessing the ability to cause mitochondrial damage, form non-covalent bonds, produce reactive oxygen species, and release damage-associated molecular patterns (DAMPs). The association of iDILI with gene polymorphisms in patients receiving certain medicines has a high negative predictive value and can be used in clinical practice to rule out iDILI or identify hepatotoxic medicinal products in polypharmacy. The identification of the allele combinations associated with an increased risk of iDILI seems promising for enhancing the predictive value of genetic studies and may be used in personalised medicine.

Key words: idiosyncrasy; drug-induced hepatotoxicity; iDILI; pathogenesis of idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity; immune tolerance; T-cells; signalling pathway activation; genetic risk factors; human leukocyte antigen; HLA

For citation: Mazerkina I.A. Idiosyncratic drug-induced liver injury: from pathogenesis to risk reduction. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):204–214. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-204-214>

Введение

Идиосинкратическая лекарственная гепатотоксичность (иЛГТ) может стать причиной тяжелых гепатоцеллюлярных повреждений, приводящих к летальному исходу или необходимости трансплантации печени. В США и ряде европейских стран иЛГТ стала основанием для запрета применения или ограничения показаний к применению нимесулида (нестероидное противовоспалительное средство), троглитазона (противодиабетическое средство), ксимелагатрана (антикоагулянтное средство), мипомерсена (гиполипидемическое средство) и других лекарственных средств [1–3].

Идиосинкратическое лекарственное повреждение печени, в отличие от прямого, имеет более продолжительный латентный период, не воспроизводится в общепринятых тестах на токсичность *in vivo* и не обладает прямой дозозависимостью [4]. Низкая частота развития иЛГТ в общей популяции, около 1:1000 – 1:10000, снижает вероятность ее выявления в дорегистрационных клинических исследованиях [5]. Значительным шагом вперед в плане недопущения лекарственных средств (ЛС) с потенциалом идиосинкратической гепатотоксичности на фармацевтический рынок было внедрение в дорегистрационные клинические

исследования мониторинга гепатоцеллюлярных повреждений печени¹, основанного на выявлении их связи с изменениями показателей ряда биохимических маркеров. Обнаруженная закономерность, получившая название закон Хая (Hu's Law), заключается в присоединении к признакам повреждения печени (повышение активности трансаминаз) повышение уровня общего билирубина (выше 2 верхних границ нормы) при отсутствии других явных причин его повышения (гепатит, обструкция желчных путей) [6]. Если при проведении дорегистрационных клинических исследований регистрируется один случай, соответствующий критериям закона Хая, это вызывает настороженность, а два случая считаются прогностически значимым фактором гепатотоксичного потенциала у ЛС при его применении в большой популяции.

Клинические испытания являются последним этапом разработки ЛС, к этому времени уже затрачены значительные ресурсы, и важным направлением поиска является выявление факторов, которые позволили бы исключить потенциально гепатотоксичное ЛС на более раннем этапе. Ключевым моментом для определения потенциала ЛС вызывать идиосинкратическое повреждение печени является понимание лежащих в его основе патогенетических процессов. При прямой лекарственной гепатотоксичности клеточный стресс от непосредственного воздействия ЛС и/или его метаболитов запускает механизмы дезактивации и адаптации, что в итоге приводит к некрозу или апоптозу. Пути идиосинкратического лекарственного повреждения печени сложнее: при ИЛГТ так же, как и при прямой лекарственной гепатотоксичности, имеет место повреждающее действие ЛС или метаболита на клетки печени, но ведущая роль отводится реакции на эти повреждения со стороны адаптивной иммунной системы [7].

Цель работы — обзор современных представлений об иммунном патогенезе идиосинкратического лекарственного повреждения печени и возможностях прогнозирования и предупреждения риска его развития.

Механизмы развития ИЛГТ

Предрасположенность к развитию ИЛГТ связывают с разными факторами, такими как пожилой возраст, женский пол и генетические особенности, ни один которых не является прогностически значимым [7–10].

В настоящее время основной механизм развития ИЛГТ связывают с адаптивной иммунной системой. В клиническом течении ИЛГТ присутствуют общие черты с идиосинкратическими повреждениями других систем. Чаще всего ИЛГТ развивается через 1–3 мес. после начала приема ЛС и при повторном назначении латентный период укорачивается, однако в некоторых случаях реакция развивается после первого приема или не развивается при повторном назначении у одного и того же пациента [8, 9]. Также типичным считается отсутствие прямой дозозависимости, однако ИЛГТ редко развивается при применении ЛС в дозах менее 10 мг/сут [10]. Имеются данные, что применение ингибиторов иммунных контрольных точек может повысить риск ИЛГТ [11]. Самый значимый фактор риска, указывающий на иммунный механизм, — ассоциация ИЛГТ при использовании некоторых ЛС с определенными гаплотипами человеческого лейкоцитарного антигена (human leucocyte antigen, HLA), однако при этом у большинства носителей таких «гаплотипов риска» развития ИЛГТ не происходит [12].

Печень является иммунотолерантным органом, что означает наличие механизмов, препятствующих выраженной иммунной реакции на воспалительные молекулы и патогены, попадающие в нее через желудочно-кишечный тракт. Избежать значительных повреждений печени в результате активации адаптивной иммунной системы при попадании в организм ксенобиотиков позволяет комплекс проверяющих и ограничительных механизмов с участием различных клеток (например, регуляторных Т-лимфоцитов), цитокинов и других молекул, включая молекулы иммунных контрольных точек: белок запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) и цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный протеин 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4). Сбой на каком-то этапе и приводит к возникновению идиосинкратического повреждения печени [13–15].

Главными исполнительными клетками адаптивного иммунного ответа в организме являются цитотоксические клетки CD8⁺ (Т-киллеры) и В-клетки, которые после активации становятся плазматическими клетками, продуцирующими антитела. Иногда при ИЛГТ определяются антитела к ЛС или аутоантитела, но гистологические данные указывают, что преобладает

¹ Drug-induced liver injury: Premarketing clinical evaluation. Guidance for industry. FDA; 2009.

иммунное повреждение с участием клеток CD8⁺ [16]. Регуляция адаптивного иммунного ответа осуществляется с участием клеток CD4⁺ (Т-хелперов) [9, 13, 14]. Схема иммунного механизма развития ИЛГТ представлена на *рисунке 1*.

Для активации регулирующих клеток CD4⁺ необходимо три сигнала, в том числе с участием клеток врожденной иммунной системы [9].

1 сигнал: модификация ЛС, формирование неоантигена и его связывание с главным комплексом гистосовместимости класса II антигенпрезентирующих клеток (АПК). К АПК относятся клетки, экспрессирующие главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex, MHC, он же HLA) класса II (MHCII): дендритные клетки, В-лимфоциты, эпителиальные клетки печеночных синусов и макрофаги. Химически активные вещества (метаболиты, образовавшиеся под воздействием изоферментов цитохрома P450 или других, активные формы кислорода,

в некоторых случаях – сами ЛС), связываясь с белками клеток печени или другими макромолекулами, могут их модифицировать с образованием неоантигенов. Модифицированные молекулы-неоантигены могут быть восприняты как чужеродные и захвачены АПК для дальнейшей их презентации лимфоцитам. Образование неоантигенов происходит преимущественно в гепатоцитах, так как АПК имеют мало ферментов. Для того чтобы быть презентируемыми иммунной системе в комплексе MHCII, неоантигены должны попасть из гепатоцитов в АПК. Неоантигены могут попасть из гепатоцитов в АПК двумя путями. АПК может фагоцитировать гепатоцит, находящийся в процессе апоптоза или погибший в результате токсического действия ЛС. Такой путь малопродуктивен, поскольку обновление гепатоцитов происходит достаточно медленно, а большинство ЛС, вызывающих ИЛГТ, обладают слабой цитотоксичностью. Более

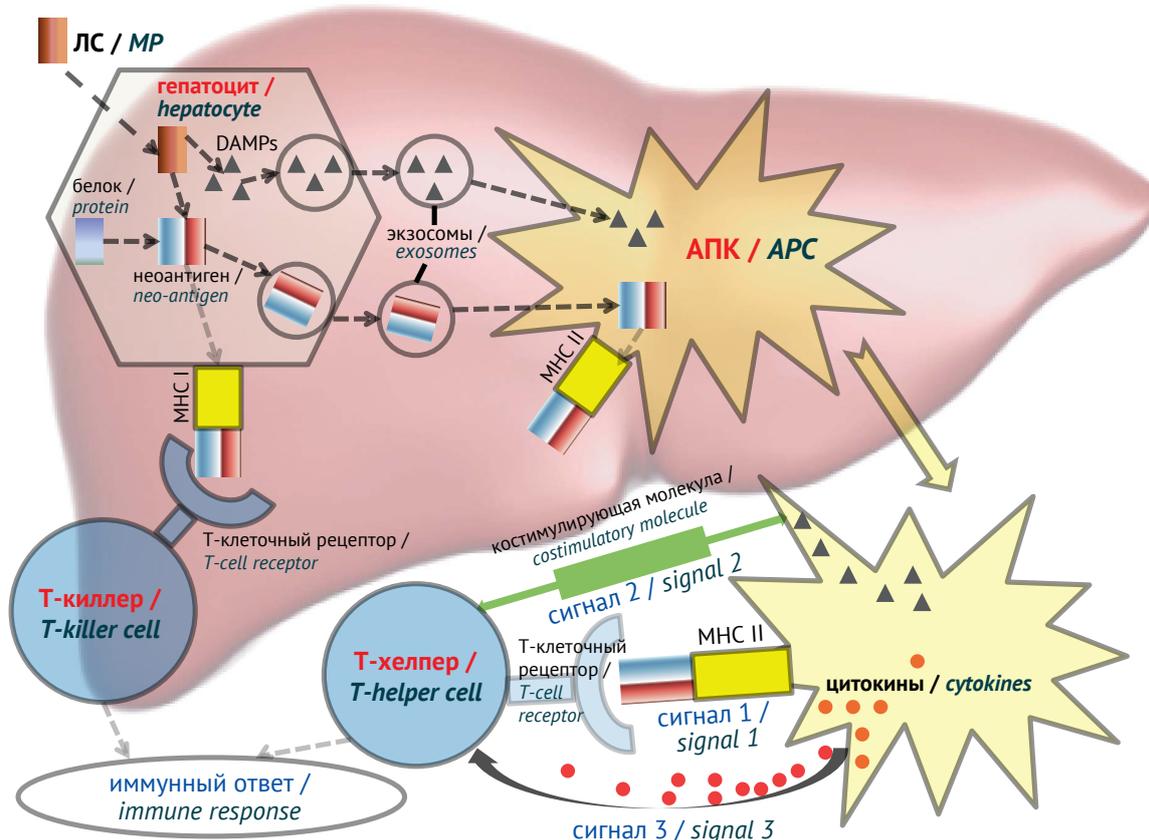


Рис. 1. Механизм идиосинкратического лекарственного повреждения печени (объяснения в тексте). ЛС – лекарственное средство; АПК – антигенпрезентирующая клетка; DAMPs – молекулярные паттерны, связанные с повреждением; MHC I – главный комплекс гистосовместимости класса I; MHC II – главный комплекс гистосовместимости класса II

Fig. 1. Mechanism of idiosyncratic drug-induced liver injury (see explanations in the text). MP, medicinal product; APC, antigen-presenting cell; DAMPs, damage-associated molecular patterns; MHC, major histocompatibility complex

вероятный путь — попадание модифицированных белков из гепатоцитов в АПК в экзосомах. В АПК белки-неоантигены расщепляются на пептиды и в качестве составной части МНСII презентуются клеткам CD4⁺, у которых экспрессирован рецептор, способный распознать такой пептид.

2 сигнал: экспрессия на АПК костимулирующих молекул. Костимулирующие молекулы, такие как CD80, CD86 и CD40, образуют связи с корецепторами CD4⁺. В этом участвуют высвобожденные в межклеточное пространство или на поверхность клеток фрагменты молекулярных паттернов, связанных с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Появление DAMPs происходит при нарушениях, вызванных действием активных метаболитов, митохондриальным повреждением, ингибированием помпы выведения желчных кислот (bile salt export pump, BSEP), реакцией на несвернутые белки (unfolded protein response, UPR), оксидативным стрессом. В соответствии с гипотезой опасности (danger hypothesis) [17] для возникновения иммунного ответа необходима совместная стимуляция запускающих механизмов с участием DAMPs, появление которых сигнализирует о повреждении, то есть иммунная система будет игнорировать чужеродное вещество, пока оно не вызвало повреждение или клеточный стресс. DAMPs через рецепторы, распознающие паттерны (pattern recognition receptors, PRRs), такие как Toll-подобный рецептор, активируют АПК, что приводит к экспрессии на АПК костимулирующих молекул. К DAMPs относятся белки теплового шока, хроматин-связанные белки группы высокой мобильности B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1), фрагменты ДНК и РНК и др. [18]. Основным средством перемещения DAMPs из мест образования к иммунным клеткам являются экзосомы [19].

3 сигнал: продукция цитокинов. Выделение цитокинов из умерших или находящихся в состоянии стресса клеток является сигналом для активации и пролиферации клеток CD4⁺, тип и количество цитокинов определяет, какой тип Т-хелпера производить. Т-хелперы имеют разные функции: клетки Th1 активируют адаптивный клеточный ответ (клетки CD8⁺), клетки Th2 — адаптивный гуморальный ответ (образование антител), клетки Th17 обладают провоспалительным действием, регулирующие Т-клетки обеспечивают иммунную толерантность. АПК могут активировать клетки

CD4⁺ Treg, которые подавляют иммунный ответ, а также могут высвобождать подавляющие иммунный ответ цитокины, такие как интерлейкин (ИЛ) 10 [9].

Белки, модифицированные в гепатоцитах активными метаболитами ЛС, могут быть презентированы на поверхности гепатоцитов в комплексе с МНСI (в отличие от АПК все ядерные клетки имеют МНСI). Комплекс МНСI/пептид связывается с рецепторами клеток CD8⁺, что приводит к цитотоксическому иммунному ответу. Однако до тех пор, пока пептиды, модифицированные ЛС, не будут распознаны рецепторами МНСII, МНСI и Т-хелперов, полноценного адаптивного иммунного ответа и значимого повреждения печени не произойдет.

Не все ЛС, вызывающие идиосинкратические реакции, при биотрансформации образуют активные метаболиты. Существует концепция *p-i* — фармакологическое взаимодействие ЛС с антиген-специфичными иммунными рецепторами (pharmacological interaction with immune receptors), согласно которой некоторые ЛС могут нековалентно связываться с МНС и быть презентированы Т-клеткам через их рецепторы [20]. Например, ксимелагатран не образует метаболитов, однако может вызывать ИЛГТ [21]. Также есть свидетельства ассоциации ИЛГТ со специфичными Т-клеточными рецепторами [22].

Другие механизмы развития ИЛГТ — образование активных метаболитов и активных форм кислорода, нековалентное связывание, ингибирование помпы выведения желчных кислот (BSEP), отклик на неструктурированные белки (unfolded protein response), повреждение митохондрий — являются дополняющими факторами развития идиосинкратической реакции, участвуя в образовании модифицированных белков и DAMPs [23].

Пути снижения риска развития ИЛГТ

Доклинические исследования

Исследования *in vitro*. В исследованиях *in vitro* используют различные клеточные культуры, выращенные в различных конфигурациях, для проведения скрининга ЛС на наличие общей цитотоксичности, возможности участия ЛС в образовании активных метаболитов и активных форм кислорода, в нековалентном связывании с МНС, способности ЛС вызывать повреждение митохондрий, взаимодействие с транспортерами и ферментами, а также участвовать в межлекарственном взаимодействии на уровне транспортеров и ферментов,

в образовании DAMPs, в отклике на неструктурированные белки и др. [23]. Следует отметить, что эти свойства определяются у ЛС с уже известным идиосинкратическим потенциалом для подтверждения их роли в развитии иЛГТ, и данные таких исследований не являются прогностическими.

Шагом вперед в исследованиях иЛГТ *in vitro* стало определение сигнализации между клетками печени и иммунной системы. M.O. Ogese и соавт. [24] при изучении воздействия различных ЛС с идиосинкратическим гепатотоксическим потенциалом (амоксициллин, флуклоксациллин, нитрозо-сульфаметоксазол, изониазид) на культуре первичных гепатоцитов показали, что транспортированные в экзосомах модифицированные белки из гепатоцитов фагоцитировались дендритными клетками, вызывая выделение различных цитокинов, и вызывали активацию наивных Т-клеток. Ранее B.D. Cosgrove и соавт. [25] в исследованиях на клеточных моделях было продемонстрировано, что одновременное воздействие ЛС, имеющих потенциал вызывать иЛГТ, с липосахаридами и/или цитокинами (фактор некроза опухоли TNF α , гамма-интерферон (IFN γ), ИЛ1 α и ИЛ6) приводит к синергизму цитотоксического действия. Авторы предложили для скрининга потенциала идиосинкратической гепатотоксичности, связанной с воспалением, использовать воздействие комбинации ЛС и смеси цитокинов на первичные гепатоциты человека. S. Oda и соавт. [26] разработали систему *in vitro* с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (hPBMCs) как источника иммунных клеток при совместном культивировании с клетками HepG2 для прогнозирования потенциала ЛС вызывать иЛГТ.

Перспективным для прогнозирования развития иЛГТ представляется использование технологий Big Data: транскриптомики [27, 28], протеомики [29], метаболомики [30]. Эти технологии позволяют получить большое количество данных, отражающих изменения, происходящие в клетке при воздействии различных веществ, на уровне транскрипции, синтеза белков и метаболизма.

Исследования *in vivo*. Модели гепатотоксичности на лабораторных животных не всегда релевантны даже при исследовании прямой ЛГТ вследствие межвидовых различий [31]. Тем не менее есть несколько моделей, позволяющих исследовать механизмы иЛГТ.

Модель с подавлением иммунной толерантности была разработана на основе гипотезы, что иммунная толерантность предупреждает повреждение печени при воздействии антигенов и в патогенезе иЛГТ нарушение иммунной толерантности играет одну из главных ролей. Для таких исследований используют мышей с нокаутированным геном PD-1 с добавлением антител к CTLA-4 для подавления иммунного ответа. Так, в исследовании I.G. Metushi и соавт. [31] у мышей с нокаутированным геном PD-1 препарат амодиахинин вызывал более тяжелое повреждение печени, чем у мышей дикого типа, у которых нарушения функции печени проходили самопроизвольно. Дополнительное подавление антителами цитотоксического CTLA-4, который играет одну из ведущих ролей в иммунотолерантности, приводило к развитию более тяжелых повреждений печени, сходных с иЛГТ у человека. Отмечалось увеличение количества Т-клеток CD8 $^+$ и макрофагов, а также регуляторных Т-клеток, вероятно, с целью подавления повреждения. В дальнейшем это привело к уменьшению количества Т-клеток CD8 $^+$ и уменьшению повреждения [32]. Использование этой модели позволяет продемонстрировать участие нескольких факторов в повреждении клеток печени при иЛГТ, а также способность иммунной системы восстанавливать иммунную толерантность. В другом исследовании на мышах с нарушенной иммунотолерантностью за счет обеднения клеток-супрессоров миелоидного происхождения было показано, что гепатотоксичность галотана развивается по иммуноаллергическому механизму с образованием антител [33].

Гуманизированные модели мышей: 1) модели мышей с гуманизированными тканями, в которых иммунодефицитным мышам подсаживают клетки печени человека [34, 35]; 2) трансгенные мыши с интегрированными человеческими генами [36]. Основной проблемой таких моделей остается экспрессия человеческих генов в организме мышей, что может привести к непредсказуемой регуляции различных процессов и затрудняет использование гуманизированных моделей для прогнозирования развития нарушений у человека. Прогностическое значение таких моделей для клинической практики также низкое, поскольку их дизайн основан на наличии предрасположенности к конкретным видам повреждений [37].

Механизм развития идиосинкратического повреждения является многофакторным и связан с индивидуальными особенностями иммунной системы, поэтому вызывает сомнения существование маркера, который позволил бы определить *in vitro* идиосинкратический гепатотоксический потенциал нового ЛС с учетом индивидуальных особенностей.

Тем не менее доклинические исследования имеют важное значение для понимания механизмов повреждений, сигналов, метаболизма и восстановления при ИЛГТ. Скрининг *in vitro* позволяет исключить из ЛС-кандидатов вещества с высоким цитотоксическим потенциалом, способностью образовывать высокоактивные метаболиты и вызывать повреждение митохондрий.

Генетические исследования

Индивидуальные особенности любого звена функционирования иммунной системы, в том числе генетически обусловленные, могут быть факторами риска нарушения иммунотолерантности и развития ИЛГТ. Подробный обзор о роли генетических факторов в развитии ИЛГТ представлен С. Stephens и соавт. [38].

В работах по исследованию полиморфизма генов, вовлеченных в разные звенья процесса развития гепатотоксичности, первой мишенью стали гены, кодирующие ферменты процессов биотрансформации и нейтрализации ЛС. Выводы таких исследований были противоречивы. Например, в работе К. Pachkoria и соавт. [39] генотипирование 60 пациентов, у которых были обнаружены поражения печени при применении различных ЛС, не выявило аллелей гена цитохрома P450 CYP2C9, ассоциированных с гепатотоксичностью. В других исследованиях, напротив, была выявлена ассоциация гепатотоксичности некоторых ЛС (вальпроевая кислота, эфавиренц, противотуберкулезные средства) с определенными аллелями CYP [40–42]. Результаты исследования ассоциаций лекарственной гепатотоксичности с полиморфизмом ферментов II фазы биотрансформации и транспортеров также были неоднозначны [43–48]. Частично это можно объяснить небольшим размером выборок и их этнической неоднородностью.

При изучении ассоциаций между лекарственной гепатотоксичностью и полиморфизмом генов HLA, в том числе у различных этнических групп, была выявлена ассоциация полиморфизма гена HLA I с гепатотоксичностью препаратов триметоприм+сульфаметоксазол [49], тиклопидин [50], а также при применении растения

Polygonum multiflorum у китайцев [51, 52]. С полиморфизмом гена HLA II ассоциировалась гепатотоксичность препарата амоксициллин+клавулановая кислота [53]. Также была показана ассоциация полиморфизма гена ИЛ-10 с лекарственной гепатотоксичностью при применении диклофенака [54].

Полногеномный поиск ассоциаций. Значительным шагом вперед в исследовании связи генетических факторов с ИЛГТ стала возможность проведения полногеномного поиска ассоциаций (genome-wide association study, GWA), позволяющего изучать полиморфизм одного нуклеотида (single-nucleotide polymorphism, SNP). Полногеномный поиск ассоциаций основан на технологии с использованием SNP-микрочипов и позволяет анализировать большое количество однонуклеотидных полиморфизмов одновременно без предварительного выбора локального гена [55]. Эти исследования не подтвердили ассоциации полиморфизма генов, участвующих в метаболизме, с предрасположенностью к лекарственной гепатотоксичности, за исключением ассоциации генотипа медленного ацетилирования с гепатотоксичностью противотуберкулезного лечения у тайских пациентов [56].

Полногеномные исследования ассоциаций выявили значительное количество ассоциаций полиморфизма гена HLA обоих классов с ИЛГТ. Для HLA I были определены ассоциации следующих полиморфизмов с развитием ИЛГТ: A*02:01 — амоксициллин+клавулановая кислота [57], A*31:01 — карбамазепин [58], A*33:01 — тербинафин, фенофибрат, тиклопидин [59], B*35:02 — миноциклин [60], B*39:01 — инфликсимаб [61], B*57:01 — флуклоксациллин [62, 63]. Аналогичные ассоциации определены для HLA II: DRB1*07 — ксимелагатран [64], DRB1*07:01 — лапатиниб [65, 66], DRB1*15:01-DQB1*06:02 — люмиракоксиб [67], DRB1*16:01-DQB1*05:02 — флупиритин [68].

Е.Т. Cirulli и соавт. при исследовании пациентов разных этнических групп с лекарственной гепатотоксичностью ($n=2048$, контроль $n=12429$) была показана ассоциация ИЛГТ, развившейся при применении различных ЛС, с полиморфизмом rs2476601 гена PTPN22, кодирующего протеиновую тирозинфосфатазу [69], которой отводится важная роль в регуляции активации Т-клеток и эффекторного ответа [70].

Установленные ассоциации подтверждают роль иммунных механизмов в развитии ИЛГТ. Следует отметить, что большинство аллелей, ассоциированных с повышенным риском

развития иЛГТ, имеют слабую положительную прогностическую ценность, что подтверждает многофакторность патогенеза иЛГТ. Это делает нецелесообразным рутинное генетическое тестирование с целью выявления риска при назначении ЛС [71]. С другой стороны, генетические факторы риска развития иЛГТ имеют высокую отрицательную прогностическую ценность и поэтому их исследование может быть полезным в клинических ситуациях, когда необходимо исключить или подтвердить диагноз иЛГТ [72], а также для выявления препарата – наиболее вероятного гепатотоксиканта при одновременном назначении нескольких ЛС.

Заключение

В настоящее время имеется значительная доказательная база иммунного механизма развития иЛГТ. Иммунная толерантность печени осуществляется за счет нескольких механизмов, на разных уровнях предохраняющих печень от развития повреждения в результате активации адаптивной иммунной системы. Ослабление иммунной толерантности с развитием иЛГТ может произойти при совпадении нескольких неблагоприятных факторов, связанных как с химическими свойствами ЛС, так и с генетическими особенностями пациента.

На этапе доклинических исследований снизить риск гепатотоксичности новых ЛС позволя-

ет изучение общей токсичности ЛС-кандидата, выявление его способности образовывать активные метаболиты и активные формы кислорода, участвовать в высвобождении DAMPs, вызывать повреждение митохондрий, способности образовывать нековалентные связи, взаимодействовать с транспортерами, а также изучение межлекарственного взаимодействия на уровне транспортеров и ферментов.

Клинические исследования генетических особенностей пациентов, у которых наблюдалась иЛГТ, позволяют определить аллели, ассоциированные с повышенным риском идиосинкратического повреждения печени. Однако их результаты имеют слабую положительную прогностическую ценность из-за многофакторности патогенеза иЛГТ. В то же время их высокая отрицательная прогностическая ценность может использоваться в клинике для исключения иЛГТ или для выявления гепатотоксичного ЛС при полипрагмазии. От полногеномных исследований ассоциаций можно ожидать выявления комбинаций нескольких аллелей, ассоциированных с повышенным риском развития иЛГТ, что увеличит положительную прогностическую ценность и сможет использоваться в персонализированной медицине. Изучение механизмов развития иЛГТ также может стать шагом к разработке ЛС, способных остановить идиосинкратическую реакцию.

Литература / References

1. Kwon J, Kim S, Yoo H, Lee E. Nimesulide-induced hepatotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(1):e0209264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209264>
2. McNaughton R, Huet G, Shakir S. An investigation into drug products withdrawn from the EU market between 2002 and 2011 for safety reasons and the evidence used to support the decision-making. *BMJ Open*. 2014; 4(1):e004221. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004221>
3. Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med*. 2016;14:10. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0553-2>
4. Chen M, Will Y. *Drug-induced liver toxicity*. New York: Humana New York; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7677-5>
5. de Abajo FJ, Montero D, Madurga M, García Rodríguez LA. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;58(1):71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02133.x>
6. Robles-Díaz M, Lucena MI, Kaplowitz N, Stephens C, Medina-Cáiz I, González-Jiménez A, et al. Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. *Gastroenterology*. 2014;147(1):109–18.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.050>
7. Hoofnagle JH, Björnsson ES. Drug-induced liver injury – types and phenotypes. *N Engl J Med*. 2019;381(3):264–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1816149>
8. Fontana RJ. Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. *Gastroenterology*. 2014;146(4):914–28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.032>
9. Jee A, Sernoskie SC, Uetrecht J. Idiosyncratic drug-induced liver injury: mechanistic and clinical challenges. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):2954. <https://doi.org/10.3390/ijms22062954>
10. Lammert C, Einarsson S, Saha C, Niklasson A, Björnsson E, Chalasani N. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology*. 2008;47(6):2003–9. <https://doi.org/10.1002/hep.22272>
11. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med*. 2013;368(14):1365–6. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1302338>

12. Daly AK, Day CP. Genetic association studies in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev.* 2012;44(1):116–26. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.605790>
13. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S54–62. <https://doi.org/10.1002/hep.21060>
14. Doherty DG. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2016;66:60–75. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.020>
15. Zheng M, Tian Z. Liver-mediated adaptive immune tolerance. *Front Immunol.* 2019;10:2525. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02525>
16. Foureau DM, Walling TL, Maddukuri V, Anderson W, Culbreath K, Kleiner DE, et al. Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis. *Clin Exp Immunol.* 2015;180(1):40–51. <https://doi.org/10.1111/cei.12558>
17. Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Gordon F, Park BK. The danger hypothesis – potential role in idiosyncratic drug reactions. *Toxicology.* 2002;181–182:55–63. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00255-x](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00255-x)
18. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>
19. Fleshner M, Crane CR. Exosomes, DAMPs and miRNA: features of stress physiology and immune homeostasis. *Trends Immunol.* 2017;38(10):768–76. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.002>
20. Pichler WJ. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(4):301–5. <https://doi.org/10.1097/00130832-200208000-00003>
21. Keisu M, Andersson TB. Drug-induced liver injury in humans: the case of ximelagatran. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(196):407–18. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_13
22. Ko TM, Chung WH, Wei CY, Shih HY, Chen JK, Lin CH, Chen YT, Hung SI. Shared and restricted T-cell receptor use is crucial for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1266–76.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.08.013>
23. Segovia-Zafra A, Di Zeo-Sánchez DE, López-Gómez C, Pérez-Valdés Z, García-Fuentes E, Andrade RJ, et al. Preclinical models of idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): moving towards prediction. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(12):3685–726. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.013>
24. Ogese MO, Jenkins RE, Adair K, Tailor A, Meng X, Faulkner L, et al. Exosomal transport of hepatocyte-derived drug-modified proteins to the immune system. *Hepatology.* 2019;70(5):1732–49. <https://doi.org/10.1002/hep.30701>
25. Cosgrove BD, King BM, Hasan MA, Alexopoulos LG, Farazi PA, Hendriks BS, et al. Synergistic drug-cytokine induction of hepatocellular death as an in vitro approach for the study of inflammation-associated idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;237(3):317–30. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.04.002>
26. Oda S, Matsuo K, Nakajima A, Yokoi T. A novel cell-based assay for the evaluation of immune- and inflammatory-related gene expression as biomarkers for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol Lett.* 2016;241:60–70. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.029>
27. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(5):1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
28. De Abrew KN, Overmann GJ, Adams RL, Tiesman JP, Dunavent J, Shan YK, et al. A novel transcriptomics based in vitro method to compare and predict hepatotoxicity based on mode of action. *Toxicology.* 2015;328:29–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.008>
29. Ölander M, Wiśniewski JR, Artursson P. Cell-type-resolved proteomic analysis of the human liver. *Liver Int.* 2020;40(7):1770–80. <https://doi.org/10.1111/liv.14452>
30. Cuykx M, Rodrigues RM, Laukens K, Vanhaecke T, Covaci A. In vitro assessment of hepatotoxicity by metabolomics: a review. *Arch Toxicol.* 2018;92(10):3007–29. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2286-9>
31. Sakai C, Iwano S, Yamazaki Y, Ando A, Nakane F, Kouno M, et al. Species differences in the pharmacokinetic parameters of cytochrome P450 probe substrates between experimental animals, such as mice, rats, dogs, monkeys, and microminipigs, and humans. *J Drug Metab Toxicol.* 2014;5:6. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000173>
32. Metushi IG, Hayes MA, Uetrecht J. Treatment of PD-1(-/-) mice with amodiaquine and anti-CTLA4 leads to liver injury similar to idiosyncratic liver injury in patients. *Hepatology.* 2015;61(4):1332–42. <https://doi.org/10.1002/hep.27549>
33. Chakraborty M, Fullerton AM, Semple K, Chea LS, Proctor WR, Bourdi M, et al. Drug-induced allergic hepatitis develops in mice when myeloid-derived suppressor cells are depleted prior to halothane treatment. *Hepatology.* 2015;62(2):546–57. <https://doi.org/10.1002/hep.27764>
34. Kakuni M, Morita M, Matsuo K, Katoh Y, Nakajima M, Tateno C, Yokoi T. Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol Lett.* 2012;214(1):9–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.001>
35. Ekdahl A, Weidolf L, Baginski M, Morikawa Y, Thompson RA, Wilson ID. The metabolic fate of fenclozic acid in chimeric mice with a humanized liver. *Arch Toxicol.* 2018;92(9):2819–28. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2274-0>
36. Song B, Aoki S, Liu C, Susukida T, Ito K. An animal model of abacavir-induced HLA-mediated liver injury. *Toxicol Sci.* 2018;162(2):713–23. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy001>
37. McGill MR, Jaeschke H. Animal models of drug-induced liver injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(5):1031–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.037>
38. Stephens C, Lucena MI, Andrade RJ. Genetic risk factors in the development of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2021;17(2):153–69. <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1854726>

39. Pachkoria K, Lucena MI, Ruiz-Cabello F, Crespo E, Cabello MR, Andrade RJ. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 are not related to drug-induced idiosyncratic liver injury (DILI). *Br J Pharmacol*. 2007;150(6):808–15.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707122>
40. Zhao M, Zhang T, Li G, Qiu F, Sun Y, Zhao L. Associations of CYP2C9 and CYP2A6 polymorphisms with the concentrations of valproate and its hepatotoxin metabolites and valproate-induced hepatotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;121(2):138–43.
<https://doi.org/10.1111/bcpt.12776>
41. Yimer G, Amogne W, Habtewold A, Makonnen E, Ueda N, Suda A, et al. High plasma efavirenz level and CYP2B6*6 are associated with efavirenz-based HAART-induced liver injury in the treatment of naïve HIV patients from Ethiopia: a prospective cohort study. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(6):499–506.
<https://doi.org/10.1038/tpj.2011.34>
42. Hu X, Zhang M, Bai H, Wu L, Chen Y, Ding L, et al. Antituberculosis drug-induced adverse events in the liver, kidneys, and blood: clinical profiles and pharmacogenetic predictors. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;104(2):326–34.
<https://doi.org/10.1002/cpt.924>
43. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, Swainsbury RA, Dang TS, Day CP. Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology*. 2007;132(1):272–81.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.023>
44. Wattanapokayakit S, Mushiroda T, Yanai H, Wichukhinda N, Chuchottawon C, Nedsuwan S, et al. NAT2 slow acetylator associated with anti-tuberculosis drug-induced liver injury in Thai patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20(10):1364–9.
<https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0310>
45. Sharma SK, Jha BK, Sharma A, Sreenivas V, Upadhyay V, Jaisinghani C, et al. Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 2 & susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Indian J Med Res*. 2016;144(6):924–8.
https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_684_14
46. Du H, Chen X, Fang Y, Yan O, Xu H, Li L, et al. Slow N-acetyltransferase 2 genotype contributes to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(5):3591–6.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2433-y>
47. Suvichapanich S, Fukunaga K, Zahroh H, Mushiroda T, Mahasirimongkol S, Toyo-Oka L, et al. NAT2 ultra-slow acetylator and risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a genotype-based meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2018;28(7):167–76.
<https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000339>
48. Zhang M, Wang S, Wilffert B, Tong R, van Soolingen D, van den Hof S, Alffenaar JW. The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti-TB treatment: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(12):2747–60.
<https://doi.org/10.1111/bcp.13722>
49. Li YJ, Phillips EJ, Dellinger A, Nicoletti P, Schutte R, Li D, et al. Human leukocyte antigen B*14:01 and B*35:01 are associated with trimethoprim-sulfamethoxazole induced liver injury. *Hepatology*. 2021;73(1):268–81.
<https://doi.org/10.1002/hep.31258>
50. Hirata K, Takagi H, Yamamoto M, Matsumoto T, Nishiya T, Mori K, et al. Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study. *Pharmacogenomics J*. 2008;8(1):29–33.
<https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500442>
51. Li C, Rao T, Chen X, Zou Z, Wei A, Tang J, et al. HLA-B*35:01 allele is a potential biomarker for predicting Polygonum multiflorum-induced liver injury in humans. *Hepatology*. 2019;70(1):346–57.
<https://doi.org/10.1002/hep.30660>
52. Yang WN, Pang LL, Zhou JY, Qiu YW, Miao L, Wang SY, et al. Single-nucleotide polymorphisms of HLA and Polygonum multiflorum-induced liver injury in the Han Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2020;26(12):1329–39.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i12.1329>
53. O'Donohue J, Oien KA, Donaldson P, Underhill J, Clare M, MacSween RN, Mills PR. Co-amoxiclav jaundice: clinical and histological features and HLA class II association. *Gut*. 2000;47(5):717–20.
<https://doi.org/10.1136/gut.47.5.717>
54. Aithal GP, Ramsay L, Daly AK, Sonchit N, Leathart JB, Alexander G, et al. Hepatic adducts, circulating antibodies, and cytokine polymorphisms in patients with diclofenac hepatotoxicity. *Hepatology*. 2004;39(5):1430–40.
<https://doi.org/10.1002/hep.20205>
55. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Primers*. 2021;(1):59.
<https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>
56. Suvichapanich S, Wattanapokayakit S, Mushiroda T, Yanai H, Chuchottawon C, Kantima T, et al. Genome-wide association study confirming the association of NAT2 with susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury in Thai patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(8):e02692–18.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02692-18>
57. Lucena MI, Molokhia M, Shen Y, Urban TJ, Aithal GP, Andrade RJ, et al. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles. *Gastroenterology*. 2011;141(1):338–47.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.001>
58. Nicoletti P, Barrett S, McEvoy L, Daly AK, Aithal G, Lucena MI, et al. Shared genetic risk factors across carbamazepine-induced hypersensitivity reactions. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(5):1028–36.
<https://doi.org/10.1002/cpt.1493>
59. Nicoletti P, Aithal GP, Bjornsson ES, Andrade RJ, Sawle A, Arrese M, et al. Association of liver injury from specific drugs, or groups of drugs, with polymorphisms in HLA and other genes in a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1078–89.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.016>
60. Urban TJ, Nicoletti P, Chalasani N, Serrano J, Stolz A, Daly AK, et al. Minocycline hepatotoxicity: clinical characterization and identification of HLA-B*35:02 as a risk factor. *J Hepatol*. 2017;67(1):137–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.010>

61. Bruno CD, Fremd B, Church RJ, Daly AK, Aithal GP, Björnsson ES, et al. HLA associations with infliximab-induced liver injury. *Pharmacogenomics J.* 2020;20(5):681–6. <https://doi.org/10.1038/s41397-020-0159-0>
62. Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, et al. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat Genet.* 2009;41(7):816–9. <https://doi.org/10.1038/ng.379>
63. Nicoletti P, Aithal GP, Chamberlain TC, Coulthard S, Alshabeeb M, Grove JJ, et al. Drug-induced liver injury due to flucloxacillin: relevance of multiple human leukocyte antigen alleles. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;106(1):245–53. <https://doi.org/10.1002/cpt.1375>
64. Kindmark A, Jawaid A, Harbron CG, Barratt BJ, Bengtsson OF, Andersson TB, et al. Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *Pharmacogenomics J.* 2008;8(3):186–95. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500458>
65. Spraggs CF, Budde LR, Briley LP, Bing N, Cox CJ, King KS, et al. HLA-DQA1*02:01 is a major risk factor for lapatinib-induced hepatotoxicity in women with advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(6):667–73. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.3197>
66. Parham LR, Briley LP, Li L, Shen J, Newcombe PJ, King KS, et al. Comprehensive genome-wide evaluation of lapatinib-induced liver injury yields a single genetic signal centered on known risk allele HLA-DRB1*07:01. *Pharmacogenomics J.* 2016;16(2):180–5. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.40>
67. Singer JB, Lewitzky S, Leroy E, Yang F, Zhao X, Klickstein L, et al. A genome-wide study identifies HLA alleles associated with lumiracoxib-related liver injury. *Nat Genet.* 2010;42(8):711–4. <https://doi.org/10.1038/ng.632>
68. Nicoletti P, Werk AN, Sawle A, Shen Y, Urban TJ, Coulthard SA, et al. HLA-DRB1*16: 01-DQB1*05: 02 is a novel genetic risk factor for flupirtine-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics.* 2016;26(5):218–24. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000209>
69. Cirulli ET, Nicoletti P, Abramson K, Andrade RJ, Björnsson ES, Chalasani N, et al. A missense variant in PTPN22 is a risk factor for drug-induced liver injury. *Gastroenterology.* 2019;156(6):1707–1716.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.034>
70. Zhang X, Yu Y, Bai B, Wang T, Zhao J, Zhang N, et al. PTPN22 interacts with EB1 to regulate T-cell receptor signaling. *FASEB J.* 2020;34(7):8959–74. <https://doi.org/10.1096/fj.201902811RR>
71. Alfirevic A, Pirmohamed M. Predictive genetic testing for drug-induced liver injury: considerations of clinical utility. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(3):376–80. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.107>
72. Kaliyaperumal K, Grove JJ, Delahay RM, Griffiths WJH, Duckworth A, Aithal GP. Pharmacogenomics of drug-induced liver injury (DILI): molecular biology to clinical applications. *J Hepatol.* 2018;69(4):948–57. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.013>

Вклад авторов. Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям ICMJE.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400082-4).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. The author confirms that she meets the ICMJE criteria for authorship.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400082-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

Мазеркина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>
mazerkina@expmed.ru

Поступила 05.04.2023

После доработки 30.05.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Irina A. Mazerkina, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>
mazerkina@expmed.ru

Received 5 April 2023

Revised 30 May 2023

Accepted 6 June 2023

УДК 615.065:615.277.3:612.017.1
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-360>

Оригинальная статья | Original article



Токсичность, ассоциированная с ингибиторами иммунных контрольных точек: анализ иммуноопосредованных нежелательных явлений при применении биоаналога пембролизумаба (Пемброриа)

М.Ю. Федянин¹, А.В. Снеговой², В.В. Бредер¹, Ю.Н. Линькова³, А.В. Зинкина-Орихан³,
С.Б. Сеткина³, С.Н. Фогт³, В.С. Чистяков³, Н.А. Кравцова^{3,✉}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Каширское шоссе, д. 23, Москва, 115478, Российская Федерация

² Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2-й Боткинский пр., д. 3, Москва, 125284, Российская Федерация

³ Акционерное общество «БИОКАД», вн. тер. г. поселок Стрельна, п. Стрельна, ул. Связи, д. 38, стр. 1, помещ. 89, Санкт-Петербург, 198515, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Кравцова Надежда Алексеевна kravtsovana@biocad.ru

РЕЗЮМЕ

В последние годы значительно увеличилось количество пациентов со злокачественными новообразованиями, получающих терапию ингибиторами иммунных контрольных точек (ИИКТ), включая препарат пембролизумаб, блокирующий белок запрограммированной клеточной гибели-1 (PD-1). Одним из важных аспектов при проведении клинических исследований с применением ИИКТ является оценка риска развития иммуноопосредованных нежелательных явлений (ИНЯ).

Цель работы: оценка безопасности биоаналога пембролизумаба (BCD-201, Пемброриа) в сравнении с референтным препаратом на основании результатов клинического исследования I фазы и имеющихся данных медицинской литературы.

Материалы и методы: проведено двойное слепое рандомизированное контролируемое клиническое исследование I фазы BCD-201-1 с участием пациентов с распространенными формами меланомы и немелкоклеточного рака легкого ($n=131$), которым проводилась терапия препаратом BCD-201 (Пемброриа) либо референтным препаратом Китруда® внутривенно в дозе 200 мг каждые 3 недели до достижения 24 недель терапии или прогрессии заболевания, или до развития признаков неприемлемой токсичности. Пациенты были рандомизированы в соотношении 1:1 в одну из двух групп (биоаналога или референтного препарата пембролизумаба). На момент написания статьи результаты исследования остаются заслепленными, данные по группам терапии представлены в маскированном виде.

Результаты: в исследовании доказана эквивалентность показателей фармакокинетики и сопоставимость профилей безопасности биоаналога пембролизумаба и референтного препарата. Оба препарата характеризовались хорошей переносимостью; частота ИНЯ любой степени тяжести была сопоставима между группами терапии (21,2% в группе 1 и 21,5% в группе 2). Большинство ИНЯ были легкой и умеренной степени

© М.Ю. Федянин, А.В. Снеговой, В.В. Бредер, Ю.Н. Линькова, А.В. Зинкина-Орихан, С.Б. Сеткина, С.Н. Фогт, В.С. Чистяков, Н.А. Кравцова, 2023

тяжести, за исключением случая диареи и иммуноопосредованного энтероколита 3-й степени тяжести у одного субъекта исследования. Статистически значимые отличия по медиане времени до развития иНЯ между группами терапии отсутствовали ($p=0,22$, двусторонний критерий Уилкоксона).

Выводы: в рамках проанализированного периода двойного слепого исследования BCD-201-1 продемонстрированы схожие характеристики безопасности препаратов Пемброриа и Китруда®, согласующиеся с опубликованными данными по референтному препарату. Информация о соответствии профилей безопасности биоаналога пембролизумаба и референтного препарата при длительном применении будет получена в продолжающихся клинических исследованиях.

Ключевые слова: Пемброриа; пембролизумаб; биоаналог; PD-1-ингибитор; иммуноопосредованные нежелательные явления; иммуноопосредованные нежелательные реакции; ингибиторы иммунных контрольных точек; иммунотерапия; клинические исследования

Для цитирования: Федянин М.Ю., Снеговой А.В., Бредер В.В., Линькова Ю.Н., Зинкина-Орихан А.В., Сеткина С.Б., Фогт С.Н., Чистяков В.С., Кравцова Н.А. Токсичность, ассоциированная с ингибиторами иммунных контрольных точек: анализ иммуноопосредованных нежелательных явлений при применении биоаналога пембролизумаба (Пемброриа). *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):215–230. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-360>

Toxicity Associated with Immune Checkpoint Inhibitors: Analysis of Immune-Related Adverse Events with a Pembrolizumab Biosimilar (Pembroria)

M.Yu. Fedyanin¹, A.V. Snegovoy², V.V. Breder¹, Yu.N. Linkova, A.V. Zinkina-Orikhan³, S.B. Setkina³, S.N. Fogt³, V.S. Chistiakov³, N.A. Kravtsova^{3,✉}

¹ National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin, 23 Kashirskoe Hwy, Moscow 115478, Russian Federation

² M.P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 3 2nd Botkinskiy Dr., Moscow 125284, Russian Federation

³ BIOCAD JSC, Rm 89, 38/1 Svyazi St., Strelna, St. Petersburg 198515, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Nadezhda A. Kravtsova** kravtsovana@biocad.ru

ABSTRACT

In recent years, there has been a significant increase in the number of patients with malignancies treated with immune checkpoint inhibitors (ICIs), including the anti-programmed cell death protein 1 (anti-PD-1) agent pembrolizumab. One of the important aspects of conducting clinical trials with ICIs is the assessment of the risk of developing immune-related adverse events (irAEs).

The aim of the study was to evaluate the safety of a pembrolizumab biosimilar (BCD-201, Pembroria) compared with a reference medicinal product using the results of a phase I clinical trial and the available medical literature.

Materials and methods. A phase I double-blind, randomised, controlled clinical trial (BCD-201-1) has been conducted in patients with advanced melanoma and non-small-cell lung cancer ($n=131$). Patients were randomly allocated in a 1:1 ratio to receive either BCD-201 (Pembroria) or the reference medicinal product (Keytruda®), administered intravenously at a dose of 200 mg every 3 weeks for up to 24 weeks or until disease progression or unacceptable toxicity is observed. Since the trial results remain blinded at the time of this writing, treatment group data are masked.

Results. The study demonstrated the equivalence of pharmacokinetics and comparable safety profiles of pembrolizumab biosimilar and reference medicinal products. Both medicinal products were well tolerated; the frequency of all-grade irAEs was comparable between treatment groups (21.2% in Group 1 vs 21.5% in Group 2). Most

irAEs were mild to moderate, with the exception of a case of Grade 3 diarrhoea and immune-mediated enterocolitis in one study subject; there were no statistically significant differences in the median time to development of irAEs between treatment groups ($P=0.22$, two-sided Wilcoxon test).

Conclusions. The analysed period of the BCD-201-1 trial demonstrated comparable safety characteristics of Pembrolia and Keytruda®, which is consistent with the published safety data on the latter. Information on the similarity of long-term safety profiles of the pembrolizumab biosimilar and the reference medicinal product will be obtained from ongoing clinical trials.

Key words: Pembrolia; pembrolizumab; biosimilar; PD-1 inhibitor; immune-related adverse events; immune-mediated adverse reactions; immune-checkpoint inhibitors; immunotherapy; clinical trials

For citation: Fedyanin M.Yu., Snegovoy A.V., Breder V.V., Linkova Yu.N., Zinkina-Orikhan A.V., Setkina S.B., Fogt S.N., Chistiakov V.S., Kravtsova N.A. Toxicity associated with immune checkpoint inhibitors: analysis of immune-related adverse events with a pembrolizumab biosimilar (Pembrolia). *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):215–230. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-360>

Введение

В настоящее время широкое распространение получила иммунотерапия злокачественных новообразований с применением так называемых ингибиторов иммунных контрольных точек (ИИКТ). В клинической практике лидирующие позиции занимают моноклональные антитела, вырабатываемые против белка запрограммированной клеточной гибели-1 (programmed cell death protein 1, PD-1), его лиганда (programmed cell death ligand 1, PD-L1) и гликопротеина цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4). Они используются не только для лечения поздних стадий онкологических заболеваний, но и для неoadъювантной/адъювантной терапии [1]. Применение препаратов группы ИИКТ позволило достичь существенного увеличения общей выживаемости у пациентов с различными видами злокачественных новообразований, включая меланому, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), почечно-клеточный рак, гепатоцеллюлярный рак и уротелиальный рак [2–6]. Вместе с тем повышение активности иммунной системы с целью преодоления иммунной толерантности к опухолевым клеткам может сопровождаться развитием нежелательных явлений (НЯ), не характерных для других групп противоопухолевых препаратов, известных как иммуноопосредованные нежелательные явления (иНЯ), которые могут затрагивать практически любые органы и системы органов. Большинство иНЯ проявляются симптомами легкой и средней степени тяжести, потенциально управляемы и хорошо поддаются лечению, однако в некоторых случаях иммуноопосредованная токсичность может не только быстро и серьезно ухудшить состояние паци-

ента, что ведет к прекращению иммунотерапии, но и создает угрозу летального исхода [7].

Изучение механизмов, лежащих в основе иНЯ, а также прогностических факторов развития НЯ высокой степени тяжести необходимо для достижения максимальной пользы противоопухолевого лечения при снижении риска развития неблагоприятных последствий иммунотерапии. В статье обсуждаются характеристики иНЯ при терапии ИИКТ в целом и пембролизумабом в частности, в том числе на примере применения биоаналога пембролизумаба (моноклональное антитело к PD-1 рецептору), а также рекомендуемая для препаратов данной группы стратегия мер минимизации рисков.

Характеристика иНЯ при терапии ИИКТ

Эпидемиология. Частота и степень тяжести отдельных иНЯ различается в зависимости от типа препарата (анти-PD-1/PD-L1, анти-CTLA-4), а также от режима терапии (введение одного препарата или комбинации ИИКТ, режим дозирования и длительность терапии). Ранее выполненные систематические обзоры показали, что частота иНЯ была выше у пациентов, получавших препараты анти-CTLA-4 (53,8%), по сравнению с пациентами, получавшими препараты анти-PD-1 (26,5%) или анти-PD-L1 (17,1%) [8]. При назначении препаратов анти-CTLA-4 иНЯ 3–4-й степеней тяжести (от тяжелых до жизнеугрожающих) наблюдались чаще (31%) по сравнению с анти-PD-1 препаратами (10%) [9].

Наиболее часто отмечали иНЯ со стороны кожи, желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), печени, органов эндокринной системы и легких [10]. Согласно результатам анализа объединенных данных клинических исследований (КИ) медиана времени до развития иНЯ составляет обычно

2–16 недель, однако описаны случаи развития иНЯ в течение нескольких суток [10], спустя один год [11] или через несколько лет от начала терапии иИКТ [10].

Особое значение при разработке стратегии минимизации рисков имеют иНЯ с летальным исходом. По данным литературы, частота иНЯ, заканчивающихся летальным исходом, зависит от типа мишени иИКТ. Согласно результатам метаанализа данных за 2009–2018 гг. (Vigilyze/Vigibase, база данных Всемирной организации здравоохранения), в котором было рассмотрено 613 случаев смерти, связанных с иммуноопосредованными нежелательными реакциями (иНР) [7], частота летальных исходов при применении препаратов анти-PD-1 составила 0,36%, для анти-PD-L1 – 0,38%, для анти-CTLA-4 – 1,08%, для комбинации препаратов анти-PD-1/PD-L1 и анти-CTLA-4 – 1,23% [7]. К наиболее частым иНР, приводившим к летальному исходу при терапии препаратами анти-CTLA-4, относился колит и другие иНР с поражением ЖКТ, при применении препаратов анти-PD-1/PD-L1 – пневмонит, гепатит, иНР с поражением нервной системы. Поражение сердца регистрировалось редко, однако частота летальных исходов в случае развития этого вида иНР была самой высокой. Так, среди пациентов с миокардитом частота летальных исходов составила 39,7%, в то время как при колите и эндокринопатиях – 5 и 2% соответственно [7].

В ряде исследований была продемонстрирована корреляция между отдельными иНЯ и улучшением противоопухолевого ответа. Это позволяет предположить, что некоторые иНЯ могут служить положительным прогностическим маркером степени противоопухолевой активации иммунитета, инициированной иИКТ [10]. Согласно опубликованным данным, развитие иНР при терапии анти-PD-1/PD-L1 препаратами ассоциировано с улучшением показателей общей и беспрогрессивной выживаемости у пациентов с НМРЛ, меланомой, почечно-клеточным раком, уротелиальной карциномой, раком желудка. С другой стороны, были получены противоречивые данные в отношении взаимосвязи иНЯ, индуцированных препаратами анти-CTLA-4, с эффективностью противоопухолевого лечения [12].

Механизмы развития иНЯ. Патофизиология иНЯ остается недостаточно изученной. Определенный вклад в понимание сложных механизмов иНЯ внесли результаты, полученные в доклинических, трансляционных исследова-

ниях и КИ, а также имеющиеся данные по аутоиммунным и аутовоспалительным процессам. Можно выделить основные механизмы развития иНЯ.

1. Нарушение препаратами группы иИКТ регуляторных механизмов иммунной толерантности, обеспечивающих защиту организма от аутоиммунных нарушений посредством повышения продукции аутоантител и аутореактивных Т-клеток [13, 14].

2. Опосредованная Т-клетками активация В-клеток и стимуляция секреции иммуноглобулинов (антитело-опосредованные нарушения). Данный механизм может лежать в основе развития нарушений со стороны щитовидной железы и гипофиза, опосредованных аутоантителами [15].

3. Цитотоксическое Т-клеточное повреждение здоровых тканей и органов за счет кросс-презентации общего с опухолевым антигена. Примерами иНР, для которых предполагается данный механизм, являются фульминантные миокардиты у пациентов, экспрессирующих специфичный для клеток мышечной ткани антиген, а также витилиго при аутоиммунном повреждении меланоцитов [16, 17].

4. Прямое повреждение здоровых тканей, экспрессирующих лиганды иИКТ (нецелевой эффект). Данный иммунный механизм повреждения характерен для тканей щитовидной железы и гипофиза [18].

5. Повышение продукции Т-лимфоцитами (Th1 и Th17) воспалительных цитокинов, вызывающих повреждение нормальных тканей организма. Характерно для иммуноопосредованных нарушений со стороны ЖКТ, в особенности для колита [19].

6. Влияние некоторых бактериальных штаммов кишечной микробиоты может способствовать смещению иммунного ответа в сторону активации или подавления воспалительной реакции, что способствует повышению или снижению риска развития определенных типов иНР (колит, эндокринопатии, иНЯ со стороны крови и лимфатической системы) [13, 20].

Факторы риска развития иНЯ. В настоящее время нет клинически верифицированных биомаркеров для прогнозирования развития иНЯ. На основании имеющихся данных можно выделить факторы риска, в отношении которых имеются доказательства их влияния на частоту или степень тяжести развития иНЯ.

Индивидуальные факторы риска: соматическая конституция (саркопения и снижение мышечной

массы тела ассоциировано с более высоким риском) [21]; пол (женский пол предположительно связан с более высоким риском); тип опухоли (например, метаанализ 48 КИ показал, что пациенты с меланомой имеют более высокую частоту развития иНЯ со стороны кожи и ЖКТ и более низкую – со стороны респираторной системы) [22]; сопутствующая патология (предшествующие аутоиммунные заболевания, некоторые вирусные заболевания, в частности, папилломавирусная инфекция) [23, 24]; наличие аутоантител до лечения (например, аутоантитела к тиреоидной пероксидазе [25], ревматоидный фактор [26], аутоантитела к рецепторам ацетилхолина [27]); нарушения кишечной микрофлоры (повышенная колонизация *Faecalibacterium* и другими бактериями типа *Firmicutes* связана с лучшим ответом на терапию и повышенным риском иммуноопосредованного колита) [28].

Имеет значение и генетическая предрасположенность – генотип HLA (human leucocyte antigen), который является одним из основных генетических факторов развития большинства иммунозависимых заболеваний. Например, было показано, что носительство ряда аллелей HLA связано с большей частотой развития иммуноопосредованных артрита [29], кожного зуда, колита [30].

Безопасность применения иИКТ у пациентов с сопутствующими аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) была изучена в ряде исследований. По результатам ретроспективного исследования, включавшего 123 пациента с сопутствующими (предсуществующими) АИЗ, получавших терапию иИКТ, у 60% пациентов отмечалось развитие иНЯ, при этом наблюдалось как обострение сопутствующего АИЗ (25,2%), так и развитие новых иНЯ (35%) [31]. Схожие результаты были получены в проспективном исследовании с использованием данных французского регистра тяжелых НЯ при применении иммуномодулирующих моноклональных антител в онкологии REISAMIC [32]. Следует отметить, что наличие сопутствующих АИЗ не является абсолютным противопоказанием к терапии иИКТ, а показатели общей выживаемости при их использовании у этой категории пациентов сопоставимы с таковыми для других групп [32, 33].

Сопутствующая противопухолевая терапия. Результаты ряда исследований свидетельствуют о повышении частоты иНЯ при терапии иИКТ одновременно с проведением лучевой терапии, особенно высокодозной [34]. Одновременная

или последовательная терапия ингибиторами тирозинкиназ в сочетании с иИКТ, например применение комбинации вемурафениба с ипилимумабом [35], а также анти-PD-1/PD-L1 с кризотинибом, сопровождалась повышенным риском развития тяжелых иммуноопосредованных гепатотоксических реакций [36]; применение комбинации ниволумаба с осимертинибом – иммуноопосредованных интерстициального пневмонита, колита, гепатита [37].

Иная сопутствующая терапия. Ингибиторы протонной помпы, нестероидные противовоспалительные средства и ряд других лекарственных препаратов могут повышать риск развития иммуноопосредованного интерстициального нефрита посредством возможного образования гаптена с тубулярными антигенами; известно, что антибиотики повышают частоту иммуноопосредованных диареи и колита [38–40].

Терапия и меры минимизации риска иНЯ. Меры минимизации рисков развития иНЯ направлены на информирование медицинских работников о современных методах предотвращения и выявления данных осложнений, оказания медицинской помощи в случае их развития, а также об особенностях выбора индивидуального подхода к мониторингу состояния пациента с учетом знаний об индивидуальных факторах риска развития иНЯ. В настоящее время подробные рекомендации разработаны как онкологическим сообществом, включая Российское общество клинической онкологии (RUSSCO) [41], Обществом специалистов поддерживающей терапии в онкологии (RASSC)¹, Европейское общество медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology, ESMO) [42], Национальную всеобщую онкологическую сеть (National Comprehensive Cancer Network, NCCN)² и др., так и специалистами Европейского альянса ревматологических ассоциаций (European Alliance of Associations for Rheumatology, EULAR) [43], что подчеркивает важность междисциплинарного подхода в терапии иНЯ. При этом должно тщательно оцениваться соотношение пользы и риска применения препарата для пациента, учитывая течение основного заболевания. В одних случаях при развитии тяжелых иНЯ терапия иИКТ должна быть полностью отменена, в других – возможно возобновление терапии после разрешения иНЯ.

Принципы лечения иНЯ схожи с таковыми при терапии острого аутоиммунного воспаления.

¹ <https://rassc.org/ru/recommendations/prochie/77-protokol-korreksii-disimmunnykh-oslozhnenij>

² <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=3&id=1486>

Чаще всего для управления иНЯ назначают глюкокортикоиды и прерывание терапии иИКТ. Согласно рекомендациям RUSSCO [41], при лечении всех иНЯ используется ступенчатый подход. Начальная ступень выбирается исходя из тяжести развившегося иНЯ, переход на более высокие ступени осуществляется при неэффективности проводимой терапии. В случае развития иНЯ тяжелой степени (3–4-й степени тяжести) в большинстве случаев рекомендуется приостановка терапии иИКТ и назначение глюкокортикоидов в высоких дозах (преднизолон 1–2 мг/кг/сут внутрь или внутривенно либо эквивалентная терапия).

Для терапии отдельных видов иНЯ и в случае тяжелых, рефрактерных к глюкокортикоидам иНЯ могут применяться иммуномодуляторы, которые чаще используются в ревматологии (анти-интерлейкин-6 (ИЛ-6), анти-фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), микофенолата мофетил и др.). Инфликсимаб (анти-ФНО-альфа) может быть успешно использован для лечения колита и миокардита, но не рекомендуется при гепатите ввиду собственной гепатотоксичности [44]. В некоторых случаях может быть эффективным применение ритуксимаба (анти-CD20 антитела), в особенности при развитии миастении гравис и энцефалита [45–47]. Зафиксированы случаи успешного применения алемтузумаба (анти-CD52 антитела), вызывающего деплецию Т-клеток, и абатацепта (агониста CTLA-4) для лечения рефрактерного миокардита [47, 48]. Ведолизумаб (анти- $\alpha 4\beta 7$ -интегрин) рассматривался как альтернатива для лечения пациентов с колитом [17]. Рекомендуется внутривенное введение иммуноглобулинов при лечении тяжелых миокардитов, буллезных дерматитов и синдрома Стивенса–Джонсона, токсического эпидермального некролиза, миоцита, поражения нервной системы и тяжелых пневмонитов. При развитии синдрома высвобождения цитокинов может быть эффективно назначение анти-ИЛ-6 терапии (тоцилизумаб). Есть данные успешного применения анти-ИЛ-6 и анти-ИЛ-17 терапии при иНЯ со стороны кожи, таких как псориазоформный дерматит [49].

При иммуноопосредованных эндокринопатиях, которые крайне редко могут угрожать жизни пациента, таких как гипотиреоз, может потребоваться только заместительная гормональная терапия [41].

Важным элементом стратегии управления рисками является информирование пациентов и медицинских работников обо всех важных ранних симптомах и признаках развития

иНЯ при применении препаратов группы иИКТ при помощи специальных информационных материалов (брошюры для медицинских работников и пациентов) [50]. С учетом обратимости иНЯ в большинстве случаев при своевременном выявлении и принятии эффективных мер данные подходы являются важными условиями обеспечения применения препаратов группы иИКТ при превышении пользы над сопряженными рисками.

Возможность контролируемого изучения распространенности и особенностей течения иНЯ предоставляют КИ иИКТ. В связи с этим в КИ с применением иИКТ, включая биоаналогичные препараты, важен тщательный мониторинг иНЯ.

Цель работы – оценка безопасности биоаналога пембролизумаба (BCD-201, Пемброриа) в сравнении с референтным препаратом на основании результатов собственного клинического исследования BCD-201-1 и имеющихся данных медицинской литературы.

Материалы и методы

В двойное слепое рандомизированное контролируемое исследование I фазы BCD-201-1 препарата Пемброриа (BCD-201, биоаналог пембролизумаба; АО «БИОКАД») в сравнении с референтным препаратом Китруда® (действующее вещество пембролизумаб; ООО «МСД Фармасьютикалс») был включен 131 пациент с распространенными формами меланомы ($n=91$) и НМРЛ ($n=40$). Исследование проводили на базе 15 центров в период с 08.02.2021 по 12.10.2022 (дата завершающего визита последнего пациента). Пациенты были рандомизированы в соотношении 1:1 в группу препарата BCD-201 или референтного препарата Китруда®.

Пациенты получали терапию препаратом Пемброриа или препаратом Китруда® внутривенно в дозе 200 мг каждые 3 недели до достижения 24 недель терапии или прогрессии заболевания, или до развития признаков неприемлемой токсичности. После этого пациенты по усмотрению исследователя могли продолжить терапию пембролизумабом до 2 лет. Информация о конкретной терапии (Пемброриа или Китруда®), которую получали пациенты группы 1 и группы 2, на момент написания статьи скрыта от врачей и субъектов исследования, а также лиц, принимающих непосредственное участие в проведении исследования.

От каждого пациента было получено добровольное информированное согласие на включение результатов их обследования и лечения в данное исследование. Клиническое исследование

BCD-201-1 проводили в соответствии с утвержденным протоколом (получено разрешение Министерства здравоохранения Российской Федерации на проведение клинического исследования от 24.12.2020 № 721), этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, в соответствии с правилами Надлежащей клинической практики (GCP) и другими применимыми регуляторными требованиями Российской Федерации. Протокол, а также информация для субъекта и форма информированного согласия были рассмотрены и одобрены этическими комитетами каждого из участвующих в исследовании центров до начала проведения исследования.

Необходимо отметить, что сопоставление профилей безопасности препаратов Пемброриа и Китруда® было проведено после подтверждения эквивалентности фармакокинетических свойств сравниваемых препаратов. По результатам изучения концентраций пембролизумаба в крови пациентов после первого введения препарата в рамках исследования BCD-201-1 значения 90% доверительного интервала для отношений средних геометрических значений $AUC_{(0-504)}$ (суммарная площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества – время» в интервале времени от 0 до 504 ч) и C_{max} (максимальная концентрация пембролизумаба) для биоаналога и референтного препарата были в интервале 80,00–125,00%. Полученные результаты соответствуют требуемым границам согласно Правилам проведения исследований биологических лекарственных средств ЕАЭС³ и руководству ЕМА/CHMP/BMWP/403543/2010⁴.

Методы оценки иНЯ. Обследование пациентов с целью оценки безопасности (в том числе для выявления иНЯ), проводимое в КИ BCD-201-1, включало регулярный физикальный осмотр на плановых визитах, контроль клинического, биохимического анализов крови (перед каждым введением исследуемого препарата Пемброриа или препарата Китруда® и на неделе 25), общего анализа мочи (на неделях 4, 10, 16, 22 и 25), выполнение электрокардиограммы (на неделях 4, 10, 16 и 25). Биохимический анализ крови включал следующие показатели: глюкоза, общий билирубин, аланиновая трансаминаза (АЛТ), аспарагиновая трансаминаза (АСТ), общий белок,

мочевина, креатинин, лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Для выявления иммуноопосредованных эндокринопатий с поражением щитовидной железы дополнительно было предусмотрено определение уровня тиреотропного гормона (ТТГ) на этапе скрининга и на неделях 1, 4, 10, 16 и 25.

В основе анализа данных по безопасности терапии была оценка доли пациентов с различными видами иНЯ, включая иНЯ с учетом их характера, тяжести, причинно-следственной связи с введением исследуемого препарата. В качестве иНЯ оценивались все неблагоприятные субъективные и объективные изменения состояния пациента, включая отклонения лабораторных показателей и результатов инструментальных методов исследования, клинические проявления, изменение течения сопутствующей патологии.

Кодирование определенных категорий иНЯ проводилось в соответствии с классом систем органов (system organ class, SOC) и предпочтительными терминами (preferred term, PT) по медицинскому словарю регуляторной деятельности (Medical dictionary for regulatory activities, MedDRA) версии 25.1. Степень тяжести иНЯ и лабораторных отклонений определялась исследователем в соответствии с NCI CTCAE (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events) v5.0.

Статистическая обработка данных по безопасности. Анализ параметров безопасности был проведен с помощью методов описательной статистики. Статистическая обработка полученных данных производилась с помощью программной среды SAS 9.4 и Python версии 3.7 и выше.

Результаты и обсуждение

Обе группы пациентов (группа 1 и группа 2) были сопоставимы по основным демографическим показателям (табл. 1).

Таким образом, в обеих группах преобладали пациенты в возрасте 60 лет и старше. Среди пациентов с меланомой было равномерное распределение по половой принадлежности, с НМРЛ – преобладали пациенты мужского пола. Большинство субъектов относилось к европеоидной расе.

Большая часть субъектов с НМРЛ была включена в исследование с первично метастатическим заболеванием: 70,8% (17/24) субъектов

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴ Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues. ЕМА/CHMP/BMWP/403543/2010. ЕМА; 2012.

Таблица 1. Демографические характеристики субъектов исследования на этапе скрининга, популяция ИТТ (клиническое исследование BCD-201-1)

Table 1. Demographic characteristics of subjects at screening, the ITT population (BCD-201-1 clinical trial)

Параметр <i>Parameter</i>		Группа 1 / <i>Group 1</i> (<i>n</i> =67*) чел./pers. (%)		Группа 2 / <i>Group 2</i> (<i>n</i> =64) чел./pers. (%)	
		НМРЛ <i>NSCLC</i>	Меланома <i>Melanoma</i>	НМРЛ <i>NSCLC</i>	Меланома <i>Melanoma</i>
Возраст, лет, среднее (СО) <i>Age, years, mean (SD)</i>		66,0 (8,19)	60,7 (13,79)	62,4 (10,11)	60,8 (12,86)
Пол, чел. (%) <i>Sex, pers. (%)</i>	Мужской <i>Male</i>	19 (79,2)	21 (48,8)	13 (81,3)	19 (39,6)
	Женский <i>Female</i>	5 (20,8)	22 (51,2)	3 (18,8)	29 (60,4)
Раса, чел. (%) <i>Race, pers. (%)</i>	Европеоидная <i>Caucasian</i>	24 (100)	42 (97,7)	16 (100)	48 (100)
	Негроидная <i>Black</i>	0	1 (2,3)	0	0
Фертильность, чел. (%) <i>Fertility, pers. (%)</i>	Да <i>Yes</i>	20 (83,3)	24 (55,8)	13 (81,3)	23 (47,9)
	Нет <i>No</i>	4 (16,7)	19 (44,2)	3 (18,8)	25 (52,1)

Примечание. ИТТ – популяция в соответствии с назначенным лечением; *n* – количество субъектов в группе; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; СО – стандартное отклонение.

* Один субъект был рандомизирован в группу 1, но получал терапию из группы 2 на протяжении всего исследования. В популяции ИТТ данные этого пациента приведены в соответствии с рандомизацией, а в остальных популяциях данные этого пациента использованы в соответствии с фактически полученной терапией.

Note. ITT, intention-to-treat population; *n*, number of subjects per group; NSCLC, non-small-cell lung cancer; SD, standard deviation.

* One subject was randomised to group 1 but received group 2 therapy throughout the trial. In the ITT population, this patient's data are used according to the randomisation; and in the remaining populations, this patient's data are used according to the actual therapy received.

в группе 1 и 62,5% (10/16) субъектов в группе 2. У большинства субъектов с меланомой в обеих группах (81,4% (35/43) субъектов в группе 1 и 81,3% (39/48) субъектов в группе 2) на момент скрининга была зафиксирована стадия заболевания M1c в соответствии с классификацией AJCC (American Joint Committee on Cancer Classification) 7-го пересмотра.

Группы 1 и 2 были сопоставимы по характеру и частоте сопутствующих заболеваний на этапе скрининга. Наиболее распространенными среди всех пациентов были нарушения со стороны сосудов (гипертензия) и ЖКТ (хронический гастрит); среди пациентов с НМРЛ – нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения (хронический бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких).

Популяция для оценки безопасности включала всех пациентов, которые получили по крайней мере одну инфузию пембролизумаба (*n*=131).

Оба препарата характеризовались хорошей переносимостью, не было выявлено существенных различий профилей безопасности исследуемого и референтного препаратов. Информация о частоте развития иНЯ при применении препарата BCD-201 в сравнении с референтным препаратом Китруда® в ходе клинического исследования BCD-201-1 представлена в *таблице 2*, результаты соответствуют длительности терапии и наблюдения, равной 24 неделям.

Анализ данных (*табл. 2*) свидетельствует о том, что наиболее частыми иНЯ в исследовании BCD-201-1 были эндокринные нарушения (гипотиреозидизм и гипертиреоз). Это соответствует данным литературы по профилю безопасности пембролизумаба [51]. Частота иНЯ любой степени тяжести была сопоставима между группами терапии (21,2% в группе 1 и 21,5% в группе 2). Большинство случаев были легкой и умеренной степеней тяжести. Исключением явился случай развития диареи и иммуноопосредованного

Таблица 2. Иммуноопосредованные нежелательные явления у пациентов, получавших терапию пембролизумабом, популяция для оценки безопасности (клиническое исследование BCD-201-1)

Table 2. Immune-related adverse events in subjects receiving pembrolizumab, the safety population (BCD-201-1 clinical trial)

Системно-органный класс, наименование иммуноопосредованного нежелательного явления (степень тяжести)* <i>System organ class, immune-related adverse event (severity)*</i>	Группа 1 / <i>Group 1</i> (n=66) чел./pers. (%)	Группа 2 / <i>Group 2</i> (n=65) чел./pers. (%)
Эндокринные нарушения / <i>Endocrine disorders</i>		
Гипотиреозидизм (1–2-й степени) <i>Hypothyroidism (grade 1–2)</i>	4 (6,1)	4 (6,2)
Гипертиреоз (1–2-й степени) <i>Hyperthyroidism (grade 1–2)</i>	2 (3,0)	4 (6,2)
Тиреоидит (1-й степени) <i>Thyroiditis (grade 1)</i>	2 (3,0)	0
Лабораторные и инструментальные данные / <i>Investigations</i>		
Снижение уровня тиреотропного гормона в крови (1-й степени) <i>Blood thyroid stimulating hormone decreased (grade 1)</i>	0	3 (4,6)
Повышение уровня аланиновой трансаминазы (1-й степени) <i>Alanine aminotransferase increased (grade 1)</i>	1 (1,5)	0
Повышение уровня аспарагиновой трансаминазы (1-й степени) <i>Aspartate aminotransferase increased (grade 1)</i>	0	1 (1,5)
Повышение уровня трансаминаз (1-й степени) <i>Transaminases increased (grade 1)</i>	0	1 (1,5)
Нарушения со стороны кожи и подкожной клетчатки / <i>Skin and subcutaneous tissue disorders</i>		
Сыпь (1-й степени) <i>Rash (grade 1)</i>	3 (4,5)	1 (1,5)
Витилиго (1-й степени) <i>Vitiligo (grade 1)</i>	1 (1,5)	0
Зуд (1-й степени) <i>Pruritus (grade 1)</i>	0	1 (1,5)
Крапивница (1-й степени) <i>Urticaria (grade 1)</i>	0	1 (1,5)
Сухая кожа (1-й степени) <i>Dry skin (grade 1)</i>	0	1 (1,5)
Нарушения со стороны печени и желчевыводящих путей / <i>Hepatobiliary disorders</i>		
Иммуноопосредованный гепатит (2-й степени) <i>Immune-mediated hepatitis (grade 2)</i>	2 (3,0)	0
Аутоиммунный гепатит (2-й степени) <i>Autoimmune hepatitis (grade 2)</i>	1 (1,5)	0
Нарушения со стороны крови и лимфатической системы / <i>Blood and lymphatic system disorders</i>		
Анемия (1-й степени) <i>Anaemia (grade 1)</i>	0	1 (1,5)
Лейкопения (2-й степени) <i>Leucopenia (grade 2)</i>	0	1 (1,5)
Лимфопения (2-й степени) <i>Lymphopenia (grade 2)</i>	0	1 (1,5)
Желудочно-кишечные нарушения / <i>Gastrointestinal disorders</i>		
Диарея (3-й степени) <i>Diarrhoea (Grade 3)</i>	0	1 (1,5)
Иммуноопосредованный энтероколит (3-й степени) <i>Immune-mediated enterocolitis (Grade 3)</i>	0	1 (1,5)

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Системно-органный класс, наименование иммуноопосредованного нежелательного явления (степень тяжести)* <i>System organ class, immune-related adverse event (severity)*</i>	Группа 1 / Group 1 (n=66) чел./pers. (%)	Группа 2 / Group 2 (n=65) чел./pers. (%)
Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения / <i>Respiratory, thoracic and mediastinal disorders</i>		
Иммуноопосредованное легочное заболевание (2-й степени) <i>Immune-mediated lung disease (grade 2)</i>	1 (1,5)	0
Нарушения со стороны органа зрения / <i>Eye disorders</i>		
Неинфекционный конъюнктивит (2-й степени) <i>Noninfective conjunctivitis (grade 2)</i>	0	1 (1,5)

Примечание. n – количество субъектов в группе.

* Системно-органный класс и предпочтительный термин для определения иммуноопосредованных нежелательных явлений (иНЯ) приведены в терминах Медицинского словаря для регуляторной деятельности (MedDRA) версии 25.1. Если у субъекта зарегистрировано несколько случаев развития иНЯ разной степени тяжести, то учитывали только иНЯ максимальной степени тяжести по СТСАЕ (Common Terminology Criteria for Adverse Events). Нежелательные явления представлены в порядке убывания общей частоты регистрации.

Note. n, number of subjects per group.

* System organ classes and preferred terms for immune-related adverse events (irAEs) are encoded using the Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA), version 25.1. For subjects with multiple irAEs varying in severity, the table includes only the irAE of the maximum CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) grade. Adverse events are presented in descending order by overall reporting frequency.

энтероколита 3-й степени тяжести у одного субъекта исследования. Медиана времени до развития иНЯ составила 43 сут в группе 1 и 64 сут в группе 2 ($p=0,22$, двусторонний критерий Уилкоксона). В течение периода исследования только одному субъекту (группа 1) была отменена терапия в связи с развитием иНЯ (аутоиммунный гепатит 2-й степени тяжести).

Таким образом, по имеющимся результатам исследования BCD-201-1 не было выявлено значимых различий в отношении частоты и других характеристик иНЯ между группами биоаналога пембролизумаба и референтного препарата Китруда®.

Сравнение эффективности биоаналога пембролизумаба и референтного препарата не являлось основной целью КИ BCD-201-1, однако учитывая то, что показатели безопасности противоопухолевого препарата тесно связаны с наличием у пациентов симптомов прогрессирования заболевания, необходимо отметить, что как у пациентов с меланомой, так и у пациентов с НМРЛ в сравниваемых группах отмечены сходные общая частота ответа на терапию и количество случаев прогрессирования заболевания по критериям RECIST 1.1⁵. В дальнейшем сопоставимая эффективность монотерапии препаратами Пемброриа и Китруда® при меланоме была подтверждена в рамках предварительного

анализа данных КИ III фазы (неопубликованные данные), что исключает влияние на профиль безопасности различий в эффективности сравниваемых препаратов.

Полученные в КИ BCD-201-1 данные по безопасности были сопоставлены с таковыми в КИ референтного препарата Китруда® KEYNOTE-006, в котором принимали участие пациенты с нерезектабельной меланомой III и IV стадий [51]. Оценка безопасности в КИ KEYNOTE-006 выполнялась по схожей методике, обследование включало физикальный осмотр, клинический, биохимический (АЛТ, АСТ, общий билирубин, креатинин) анализы крови на каждом цикле терапии, общий анализ мочи 1 раз в 12 недель, электрокардиограмму на этапе скрининга и на неделе 6, определение уровней ТТГ, трийодтиронина (Т3), свободного тироксина (Т4) на неделях 0, 3, 6, 9, затем каждые 6 недель. Степень тяжести НЯ и отклонения результатов лабораторных исследований оценивались в соответствии с NCI СТСАЕ v4.0. Пациентам проводилась терапия пембролизумабом в режиме 10 мг/кг каждые 2 недели, или 10 мг/кг каждые 3 недели, или ипилимумабом в дозе 3 мг/кг каждые 3 недели. При сравнимой с приведенными выше данными по КИ BCD-201-1 длительности терапии пембролизумабом (около 24 недель) среди иНЯ в КИ KEYNOTE-006 в обеих группах с применением пембролизумаба чаще

⁵ Revised RECIST guideline (version 1.1). <https://recist.eortc.org/recist-1-1-2/>

Таблица 3. Иммуноопосредованные нежелательные явления при терапии пембролизумабом, популяция пациентов согласно фактически полученному лечению (по С. Robert и соавт. [51] с изменениями)

Table 3. Immune-related adverse events in subjects receiving pembrolizumab, the as-treated population (adapted from C. Robert et al. [51])

Иммуноопосредованные нежелательные явления (иНЯ)* <i>Immune-related adverse events (irAEs)*</i>	Пембролизумаб 10 мг/кг каждые 2 недели <i>Pembrolizumab 10 mg/kg every 2 weeks (n=278)</i>		Пембролизумаб 10 мг/кг каждые 3 недели <i>Pembrolizumab 10 mg/kg every 3 weeks (n=277)</i>	
	Все иНЯ <i>All irAEs</i> чел./pers. (%)	иНЯ 3–5 ст. тяжести <i>Grade 3–5 irAEs</i> чел./pers. (%)	Все иНЯ <i>All irAEs</i> чел./pers. (%)	иНЯ 3–5 ст. тяжести <i>Grade 3–5 irAEs</i> чел./pers. (%)
Гипотиреозидизм <i>Hypothyroidism</i>	28 (10,1)	1 (0,4)	24 (8,7)	0
Гипертиреоз <i>Hyperthyroidism</i>	18 (6,5)	0	9 (3,2)	0
Колит <i>Colitis</i>	5 (1,8)	4 (1,4)	10 (3,6)	7 (2,5)
Гепатит <i>Hepatitis</i>	3 (1,1)	3 (1,1)	5 (1,8)	5 (1,8)
Гипофизит <i>Hypophysitis</i>	1 (0,4)	1 (0,4)	2 (0,7)	1 (0,4)
Пневмонит <i>Pneumonitis</i>	1 (0,4)	0	5 (1,8)	1 (0,4)
Сахарный диабет 1 типа <i>Type 1 diabetes mellitus</i>	1 (0,4)	1 (0,4)	1 (0,4)	1 (0,4)
Увеит <i>Uveitis</i>	1 (0,4)	0	3 (1,1)	0
Миозит <i>Myositis</i>	0	0	2 (0,7)	0
Нефрит <i>Nephritis</i>	0	0	1 (0,4)	0

Примечание. n – количество пациентов в группе.

* иНЯ приведены независимо от указанной исследователем связи с терапией.

Note. n, number of patients per group.

* The table includes irAEs regardless of causal attribution to treatment by investigators.

всего наблюдался гипотиреозидизм. У более чем 1% пациентов были выявлены иНЯ 3–4-й степени тяжести, представленные колитом и гепатитом (табл. 3).

Таким образом, при сопоставимой длительности терапии пембролизумабом иНЯ в КИ BCD-201-1 и KEYNOTE-006 были схожими по характеру, частоте и степени тяжести.

По результатам анализа долгосрочной безопасности монотерапии пембролизумабом (Китруда®) при меланоме в КИ KEYNOTE-001, KEYNOTE-002 и KEYNOTE-006, включавших данные 1567 пациентов (медиана наблюдения 42,4 мес.), частота развития иНЯ любой степени тяжести составила 23,0%, при этом чаще всего наблюдался гипотиреозидизм (9,1%), пневмонит (3,3%) и гипертиреоз (3,0%) [33]. Большая часть

иНЯ имела степень тяжести от легкой до умеренной, иНЯ 3–4-й степени тяжести были зарегистрированы у 6,9% пациентов. Большинство иНЯ развились в течение первых 16 недель терапии пембролизумабом. Среди 202 пациентов, получавших терапию системными глюкокортикоидами по поводу иНЯ, у 152 (75,2%) событие разрешилось, медиана времени до этого момента составила 6,4 недели (от 0,3 до 152,1). Повторный курс терапии системными глюкокортикоидами потребовался 36 пациентам (23,1%) [33].

Заключение

Данные об иНЯ, полученные в рандомизированных контролируемых КИ, являются наиболее репрезентативными по сравнению с другими типами клинических исследований.

В рамках проведенного нами рандомизированного контролируемого исследования I фазы BCD-201-1 были продемонстрированы сопоставимые характеристики безопасности биоаналога пембролизумаба (Пемброриа) и референтного препарата Китруда®. Доля субъектов с иНЯ любой степени тяжести в КИ BCD-201-1 составила примерно 21% в обеих группах, большинство явлений были 1–2-й степени тяжести. Наиболее частыми иНЯ в обеих группах были эндокринные нарушения (гипотиреозидизм и гипертиреоз).

Полученные результаты КИ BCD-201-1 согласуются с опубликованными данными по иНЯ

при применении референтного препарата (результаты КИ KEYNOTE-006, KEYNOTE-001, KEYNOTE-002). Информация о соответствии профиля безопасности при длительном применении биоаналога пембролизумаба будет получена в продолжающихся КИ.

Информация о факторах риска и особенностях течения иНР необходима для повышения безопасности применения иИКТ. Она приобретает особое значение для врачей и пациентов, поскольку препараты этой группы все чаще используются в клинической практике, и их доступность для пациентов возрастает в связи с появлением отечественных биоаналогов.

Литература / References

1. Stege H, Haist M, Nikfarjam U, Schultheis M, Heinz J, Pemler S, et al. The status of adjuvant and neoadjuvant melanoma therapy, new developments and upcoming challenges. *Target Oncol.* 2021;16(5):537–52. <https://doi.org/10.1007/s11523-021-00840-3>
2. Qiu Z, Chen Z, Zhang C, Zhong W. Achievements and futures of immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Exp Hematol Oncol.* 2019;8:19. <https://doi.org/10.1186/s40164-019-0143-z>
3. Lopez-Beltran A, Cimadamore A, Blanca A, Massari F, Vau N, Scarpelli M, et al. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of bladder cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(1):131. <https://doi.org/10.3390/cancers13010131>
4. Márquez-Rodas I, Cerezuela P, Soria A, Berrocal A, Riso A, González-Cao M, Martín-Algarra S. Immune checkpoint inhibitors: therapeutic advances in melanoma. *Ann Transl Med.* 2015;3(18):267. PMID: 26605313
5. Feng MY, Chan LL, Chan SL. Drug treatment for advanced hepatocellular carcinoma: first-line and beyond. *Curr Oncol.* 2022;29(8):5489–507. <https://doi.org/10.3390/curroncol29080434>
6. Resch I, Bruchbacher A, Franke J, Fajkovic H, Remzi M, Shariat SF, et al. Outcome of immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma across different treatment lines. *ESMO Open.* 2021;6(4):100122. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100122>
7. Wang DY, Salem JE, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2018;4(12):1721–8. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.3923>
8. El Osta B, Hu F, Sadek R, Chintalapally R, Tang SC. Not all immune-checkpoint inhibitors are created equal: meta-analysis and systematic review of immune-related adverse events in cancer trials. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;119:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.09.002>
9. Vaddepally R, Doddamani R, Sodavarapu S, Madam NR, Katkar R, Kutadi AP, et al. Review of immune-related adverse events (irAEs) in non-small-cell lung cancer (NSCLC)—their incidence, management, multi-organ irAEs, and rechallenge. *Biomedicines.* 2022;10(4):790. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040790>
10. Olsen TA, Zhuang TZ, Caulfield S, Martini DJ, Brown JT, Carthon BC, et al. Advances in knowledge and management of immune-related adverse events in cancer immunotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:779915. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.779915>
11. Allouchery M, Beuvon C, Pérault-Pochat MC, Roblot P, Puyade M, Martin M. Safety of immune checkpoint inhibitor resumption after interruption for immune-related adverse events, a narrative review. *Cancers (Basel).* 2022;14(4):955. <https://doi.org/10.3390/cancers14040955>
12. Kubo T, Hirohashi Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Murata K, Morita R, Torigoe T. Immunopathological basis of immune-related adverse events induced by immune checkpoint blockade therapy. *Immunol Med.* 2022;45(2):108–18. <https://doi.org/10.1080/25785826.2021.1976942>
13. Esfahani K, Elkrief A, Calabrese C, Lapointe R, Hudson M, Routy B, et al. Moving towards personalized treatments of immune-related adverse events. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(8):504–15. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0352-8>
14. Das R, Bar N, Ferreira M, Newman AM, Zhang L, Bailur JK, et al. Early B cell changes predict autoimmunity following combination immune checkpoint blockade. *J Clin Invest.* 2018;128(2):715–20. <https://doi.org/10.1172/JCI96798>
15. Kimbara S, Fujiwara Y, Iwama S, Ohashi K, Kuchiba A, Arima H, et al. Association of antithyroglobulin antibodies with the development of thyroid dysfunction induced by nivolumab. *Cancer Sci.* 2018;109(11):3583–90. <https://doi.org/10.1111/cas.13800>
16. Byrne EH, Fisher DE. Immune and molecular correlates in melanoma treated with immune

- checkpoint blockade. *Cancer*. 2017;123(S11):2143–53. <https://doi.org/10.1002/cncr.30444>
17. Bergqvist V, Hertervig E, Gedeon P, Kopljar M, Griph H, Kinhult S, et al. Vedolizumab treatment for immune checkpoint inhibitor-induced enterocolitis. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(5):581–92. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1962-6>
 18. Iwama S, De Remigis A, Callahan MK, Slovins SF, Wolchok JD, Caturegli P. Pituitary expression of CTLA-4 mediates hypophysitis secondary to administration of CTLA-4 blocking antibody. *Sci Transl Med*. 2014;6(230):230ra45. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008002>
 19. Ramos-Casals M, Brahmer JR, Callahan MK, Flores-Chávez A, Keegan N, Khamashta MA, et al. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):38. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0160-6>
 20. Dubin K, Callahan MK, Ren B, Khanin R, Viale A, Ling L, et al. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat Commun*. 2016;7:10391. <https://doi.org/10.1038/ncomms10391>
 21. Sabel MS, Lee J, Cai S, Englesbe MJ, Holcombe S, Wang S. Sarcopenia as a prognostic factor among patients with stage III melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(13):3579–85. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1976-9>
 22. Valpione S, Pasquali S, Campana LG, Piccin L, Moccillini S, Pigozzo J, Chiarion-Sileni V. Sex and interleukin-6 are prognostic factors for autoimmune toxicity following treatment with anti-CTLA4 blockade. *J Transl Med*. 2018;16(1):94. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1467-x>
 23. Kehl KL, Yang S, Awad MM, Palmer N, Kohane IS, Schrag D. Pre-existing autoimmune disease and the risk of immune-related adverse events among patients receiving checkpoint inhibitors for cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(6):917–26. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02321-z>
 24. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 2):228–40. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.008>
 25. Osorio JC, Ni A, Chaft JE, Pollina R, Kasler MK, Stephens D, et al. Antibody-mediated thyroid dysfunction during T-cell checkpoint blockade in patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(3):583–9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw640>
 26. Toi Y, Sugawara S, Sugisaka J, Ono H, Kawashima Y, Aiba T, et al. Profiling preexisting antibodies in patients treated with anti-PD-1 therapy for advanced non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(3):376–83. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5860>
 27. Suzuki S, Ishikawa N, Konoeda F, Seki N, Fukushima S, Takahashi K, et al. Nivolumab-related myasthenia gravis with myositis and myocarditis in Japan. *Neurology*. 2017;89(11):1127–34. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004359>
 28. Clavel T, Gomes-Neto JC, Lagkouvardos I, Ramer-Tait AE. Deciphering interactions between the gut microbiota and the immune system via microbial cultivation and minimal microbiomes. *Immunol Rev*. 2017;279(1):8–22. <https://doi.org/10.1111/imr.12578>
 29. Cappelli LC, Dorak MT, Bettinotti MP, Bingham CO, Shah AA. Association of HLA-DRB1 shared epitope alleles and immune checkpoint inhibitor-induced inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(3):476–80. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key358>
 30. Hasan Ali O, Berner F, Bomze D, Fässler M, Diem S, Cozzio A, et al. Human leukocyte antigen variation is associated with adverse events of checkpoint inhibitors. *Eur J Cancer*. 2019;107:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.009>
 31. Fountzilas E, Lampaki S, Koliou GA, Koumariou A, Levva S, Vagionas A, et al. Real-world safety and efficacy data of immunotherapy in patients with cancer and autoimmune disease: the experience of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Cancer Immunol Immunother*. 2022;71(2):327–37. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02985-6>
 32. Danlos FX, Voisin AL, Dyeve V, Michot JM, Routier E, Taillade L, et al. Safety and efficacy of anti-programmed death 1 antibodies in patients with cancer and pre-existing autoimmune or inflammatory disease. *Eur J Cancer*. 2018;91:21–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.12.008>
 33. Robert C, Hwu WJ, Hamid O, Ribas A, Weber JS, Daud AI, et al. Long-term safety of pembrolizumab monotherapy and relationship with clinical outcome: a landmark analysis in patients with advanced melanoma. *Eur J Cancer*. 2021;144:182–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.11.010>
 34. Bang A, Wilhite TJ, Pike LRG, Cagney DN, Aizer AA, Taylor A, et al. Multicenter evaluation of the tolerability of combined treatment with PD-1 and CTLA-4 immune checkpoint inhibitors and palliative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;98(2):344–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.02.003>
 35. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med*. 2013;368(14):1365–6. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1302338>
 36. Vizcarrondo FR, Patel SP, Pennell NA, Pakkala S, West H, Kratzke R, et al., Phase 1b study of crizotinib in combination with pembrolizumab in patients (pts) with untreated ALK-positive (+) advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology*. 2016;27(Suppl 6):vi416–54. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw383.91>
 37. Ahn M-J, Yang J, Yu H, Saka H, Ramalingam S, Goto K, et al. 136O: osimertinib combined with durvalumab in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: results from the TATTON phase Ib trial. *Journal of Thoracic*

- Oncology*. 2016;11(4):S115.
[https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(16\)30246-5](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(16)30246-5)
38. Seethapathy H, Zhao S, Chute DF, Zubiri L, Oppong Y, Strohhahn I, et al. The incidence, causes, and risk factors of acute kidney injury in patients receiving immune checkpoint inhibitors. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(12):1692–700.
<https://doi.org/10.2215/CJN.00990119>
39. Raghavan R, Shawar S. Mechanisms of drug-induced interstitial nephritis. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2017;24(2):64–71.
<https://doi.org/10.1053/j.ackd.2016.11.004>
40. Abu-Sbeih H, Herrera LN, Tang T, Altan M, Chaf-tari AP, Okhuysen PC, et al. Impact of antibiotic therapy on the development and response to treatment of immune checkpoint inhibitor-mediated diarrhea and colitis. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):242.
<https://doi.org/10.1186/s40425-019-0714-x>
41. Проценко СА, Антимоник НЮ, Берштейн Л.М, Жу-кова НВ, Новик АВ, Носов ДА и др. Практические рекомендации по управлению иммуноопосредо-ванными нежелательными явлениями. *Злокаче-ственные опухоли*. 2022;10(3s2):168–99.
Protsenko SA, Antimonik NYu, Bershtein LM, Zhuko-va NV, Novik AV, Nosov DA, et al. Practical guidelines for the management of immune-related adverse events. *Malignant tumours*. 2020;10(3s2):168–99 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-50>
42. Haanen JBAG, Carbonnel F, Robert C, Kerr KM, Peters S, Larkin J, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guide-lines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann On-col*. 2017;28(suppl_4):iv119–42.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx225>
43. Kostine M, Finckh A, Bingham CO, Visser K, Leipe J, Schulze-Koops H, et al. EULAR points to consider for the diagnosis and management of rheumatic im-mune-related adverse events due to cancer immu-notherapy with checkpoint inhibitors. *Ann Rheum Dis*. 2021;80(1):36–48.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217139>
44. Thompson JA, Schneider BJ, Brahmer J, Andrews S, Armand P, Bhatia S, et al. NCCN Guidelines Insights: management of immunotherapy-related tox-icities, version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020;18(3):230–41.
<https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0012>
45. Ito M, Fujiwara S, Fujimoto D, Mori R, Yoshimura H, Hata A, et al. Rituximab for nivolumab plus ipili-mumab-induced encephalitis in a small-cell lung cancer patient. *Ann Oncol*. 2017;28(9):2318–9.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx252>
46. Crusz SM, Radunovic A, Shepherd S, Shah S, Newey V, Phillips M, et al. Rituximab in the treatment of pem-brolizumab-induced myasthenia gravis. *Eur J Cancer*. 2018;102:49–51.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.125>
47. Esfahani K, Buhlaiga N, Thébault P, Lapointe R, John-son NA, Miller WH Jr. Alectuzumab for immune-re-lated myocarditis due to PD-1 therapy. *N Engl J Med*. 2019;380(24):2375–6.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc1903064>
48. Salem JE, Allenbach Y, Vozy A, Brechot N, John-son DB, Moslehi JJ, Kerneis M. Abatacept for severe immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. *N Engl J Med*. 2019;380(24):2377–9.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc1901677>
49. Kim ST, Tayar J, Trinh VA, Suarez-Almazor M, Gar-cia S, Hwu P, et al. Successful treatment of arthritis induced by checkpoint inhibitors with tocilizumab: a case series. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(12):2061–4.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211560>
50. Комиссарова ВА. Меры минимизации рисков в фармаконадзоре: обзор отечественного и зару-бежного опыта. *Качественная клиническая прак-тика*. 2019;(3):33–43.
Komissarova VA. Risk minimization measures in phar-macovigilance: review of national and international experience. *Good Clinical Practice*. 2019;(3):33–43 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24411/2588-0519-2019-10081>
51. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipili-mumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521–32.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *М.Ю. Федянин, А.В. Снеговой, В.В. Бредер* – написание текста рукописи и критический пересмотр его содержания; *Ю.Н. Линькова* – критический пересмотр содержания текста рукописи; *А.В. Зинкина-Орихан* – анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста и критический пересмотр его содержания; *С.Б. Сеткина* – анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи; *С.Н. Фогт* – анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи и критический пересмотр его содержания, формулировка выводов; *В.С. Чистяков* – участие в проведении исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи, формулировка выводов; *Н.А. Кравцова* – анализ данных литературы, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследование BCD-201-1 проводилось в соответствии с утвержденным протоколом (получено одобрение Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24.12.2020 № 721). Протокол, а также информация для субъекта и форма информированного согласия были одобрены этическими комитетами каждого из участвующих в исследовании центров.

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие пациентов на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью, в том числе на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

Благодарности. Спонсор исследования – АО «БИОКАД» (Россия).

Конфликт интересов. Ю.Н. Линькова, А.В. Зинкина-Орихан, С.Б. Сеткина, С.Н. Фогт, В.С. Чистяков, Н.А. Кравцова являются сотрудниками АО «БИОКАД». Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Mikhail Yu. Fedyanin, Anton V. Snegovoy, Valeriy V. Breder* drafted and critically revised the manuscript. *Yulia N. Linkova* critically revised the manuscript. *Arina V. Zinkina-Orikhan* analysed and interpreted study results, drafted and critically revised the manuscript. *Svetlana B. Setkina* analysed and summarised literature data, drafted the manuscript. *Sergei N. Fogt* analysed and interpreted study results, drafted and critically revised the manuscript, and formulated the conclusions. *Vladimir S. Chistiakov* participated in conducting the study, analysed and interpreted study results, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. *Nadezhda A. Kravtsova* analysed literature data, analysed and interpreted study results, drafted the manuscript.

Ethics approval. The BCD-201-1 trial was conducted in accordance with a protocol approved by the Ministry of Health of the Russian Federation (Approval No. 721 of December 24, 2020). The clinical trial protocol, the patient information leaflet, and the informed consent form were approved by the ethics committees at each study site.

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information, as well as for its use and anonymised publication for scientific and educational purposes.

Acknowledgements. The study sponsor is BIOCAD JSC (Russia).

Conflict of interest. Julia N. Linkova, Arina V. Zinkina-Orikhan, Svetlana B. Setkina, Sergei N. Fogt, Vladimir S. Chistiakov, and Nadezhda A. Kravtsova are employees of BIOCAD JSC. However, when writing the article, these authors were guided by considerations of the scientific value of the material obtained; they declare impartiality in data analysis. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Федянин Михаил Юрьевич, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
fedianinmu@mail.ru

Снеговой Антон Владимирович, д-р мед. наук,
профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0170-5681>
anvs2012@gmail.com

Бредер Валерий Владимирович, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6244-4294>
vbreder@yandex.ru

Линькова Юлия Николаевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5463-1022>
linkova@biocad.ru

Зинкина-Орихан Арина Валерьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8499-2232>
zinkina@biocad.ru

Сеткина Светлана Борисовна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3084-0305>
setkinasb@biocad.ru

Фогт Сергей Николаевич
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8734-2449>
fogt@biocad.ru

Чистяков Владимир Сергеевич
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2315-7791>
chistiakov@biocad.ru

Кравцова Надежда Алексеевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6250-5774>
kravtsovana@biocad.ru

Поступила 31.01.2023

После доработки 29.03.2023

Принята к публикации 21.04.2023

Online first 28.04.2023

Mikhail Yu. Fedyanin, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
fedianinmu@mail.ru

Anton V. Snegovoy, Dr. Sci. (Med.),
Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0170-5681>
anvs2012@gmail.com

Valeriy V. Breder, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6244-4294>
vbreder@yandex.ru

Yulia N. Linkova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5463-1022>
linkova@biocad.ru

Arina V. Zinkina-Orikhan
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8499-2232>
zinkina@biocad.ru

Svetlana B. Setkina, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3084-0305>
setkinasb@biocad.ru

Sergei N. Fogt
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8734-2449>
fogt@biocad.ru

Vladimir S. Chistiakov
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2315-7791>
chistiakov@biocad.ru

Nadezhda A. Kravtsova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6250-5774>
kravtsovana@biocad.ru

Received 31 January 2023

Revised 29 March 2023

Accepted 21 April 2023

Online first 28 April 2023

УДК 615.065:616.12

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-231-240>

Оригинальная статья | Original article



Клинико-anamnestические предикторы развития сухого кашля у пациентов с сердечно-сосудистой патологией на фоне приема эналаприла

И.В. Сычев^{1,✉}, Н.П. Денисенко², А.А. Качанова², А.В. Лапштаева¹, Ш.П. Абдуллаев², Л.Н. Гончарова¹, К.Б. Мирзаев², Д.А. Сычев²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Большевикская ул., д. 68, г. Саранск, 430005, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Баррикадная ул., д. 2/1, стр. 1, Москва, 125993, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Сычев Иван Витальевич titovaar@fgu.ru

РЕЗЮМЕ

Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ) являются одними из наиболее часто назначаемых и эффективных препаратов для лечения ряда сердечно-сосудистых заболеваний. Согласно данным ряда исследований, у 30% пациентов, принимавших ИАПФ, развиваются нежелательные реакции, вследствие чего часто возникает необходимость отмены терапии. Наиболее частой нежелательной реакцией является сухой кашель, при этом клинико-anamnestические предикторы его развития у пациентов с сердечно-сосудистой патологией изучены недостаточно.

Цель работы: изучение клинико-anamnestических предикторов развития кашля на фоне приема эналаприла у пациентов с сердечно-сосудистой патологией.

Материалы и методы: в исследовании, проведенном в период с 2019 по 2022 г., приняли участие 224 пациента с эссенциальной артериальной гипертензией 2–3 стадий, принимавших эналаприл в дозах 10–20 мг/сут. Пациенты были разделены на две группы: 1 группа – 113 человек, у которых на фоне приема эналаприла развился кашель; 2 группа (группа контроля) – 104 человека, у которых не было выявлено развития нежелательных реакций на фоне приема эналаприла. Всем пациентам при формировании групп было проведено общеклиническое обследование, собраны данные аллергологического и фармакологического анамнеза. На основании анализа полученных данных изучена ассоциация клинико-anamnestических показателей с развитием нежелательной реакции в виде сухого кашля.

Результаты: в группе пациентов с развитием сухого кашля на фоне приема ИАПФ достоверно чаще, чем в группе контроля, встречались лица с проявлениями лекарственной токсикодермии в анамнезе (OR=5,639, CI 2,234–14,236; $\chi^2=15,845$, $p<0,001$), наличием сахарного диабета 2 типа (OR=3,409, CI 1,461–7,953; $\chi^2=8,7472$, $p<0,01$), с отягощенной наследственностью по бронхиальной астме (OR=4,141, CI 2,066–8,299; $\chi^2=17,417$, $p<0,001$) и наличием тяжелых проявлений аллергических реакций у близких родственников (OR=3,714, CI 1,720–8,018; $\chi^2=12,137$, $p<0,001$).

Выводы: наличие в анамнезе у пациентов наследственных заболеваний аллергического характера увеличивает вероятность развития сухого кашля при применении препаратов группы ИАПФ. Для повышения безопасности терапии ИАПФ необходимо проводить более подробный опрос пациентов с сердечно-сосудистой патологией о наличии аллергических заболеваний, в том числе у кровных родственников первой степени родства.

Ключевые слова: ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента; эналаприл; сухой кашель; нежелательная реакция; предикторы нежелательных реакций; сердечно-сосудистая патология; аллергологический анамнез; клиническое исследование

Для цитирования: Сычев И.В., Денисенко Н.П., Качанова А.А., Лапштаева А.В., Абдуллаев Ш.П., Гончарова Л.Н., Мирзаев К.Б., Сычев Д.А. Клинико-anamnestические предикторы развития сухого кашля у пациентов с сердечно-сосудистой патологией на фоне приема эналаприла. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):231–240. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-231-240>

Clinical Signs and Medical History as Predictors of Enalapril-Associated Dry Cough in Cardiovascular Patients

I.V. Sychev¹✉, N.P. Denisenko², A.A. Kachanova², A.V. Lapshtaeva¹, Sh.P. Abdullaev², L.N. Goncharova¹, K.B. Mirzaev², D.A. Sychev²

¹ National Research Ogarev Mordovia State University, 68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Mordovia, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russian Federation

✉ Corresponding author: Ivan V. Sychev sychev_iv@bk.ru

ABSTRACT

Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) are among the most prescribed and effective medicinal products for the treatment of several cardiovascular diseases. According to a number of studies, 30% of patients taking ACEIs develop adverse drug reactions (ADRs), and treatment discontinuation is often required as a result. The most common ADR associated with ACEIs is a dry (non-productive) cough. Nevertheless, the clinical signs and medical history predictive of this ADR in cardiovascular patients are still understudied.

The aim of the study was to analyse the clinical signs and medical history predictive of cough in patients with cardiovascular conditions treated with enalapril.

Materials and methods. The study was carried out in 2019–2022 and enrolled 224 patients with essential hypertension (grades 2 and 3) treated with enalapril at a dose of 10–20 mg/day. The patients were assigned to 2 groups: Group 1 included 113 patients with enalapril-associated cough, while Group 2 (control group) comprised 104 patients without this ADR. At screening, all the patients underwent a general examination and a check of their allergy and medication history. Using the data obtained, the authors analysed the association of the clinical signs and medical history with the ADR of interest (dry cough).

Results. In contrast to the control group, the group with ACEI-associated dry cough included more patients with a history of drug-induced toxicoderma (OR=5.639, CI 2.234–14.236, $\chi^2=15.845$, and $p<0.001$) or type 2 diabetes mellitus (OR=3.409, CI 1.461–7.953, $\chi^2=8.7472$, and $p<0.01$), a family history of bronchial asthma (OR=4.141, CI 2.066–8.299, $\chi^2=17.417$, and $p<0.001$), and a close family history of severe allergic reactions (OR=3.714, CI 1.720–8.018, $\chi^2=12.137$, and $p<0.001$).

Conclusions. A family history of allergy increases the probability of dry cough in patients taking ACEIs. In order to improve the safety of ACEI therapy, patients with cardiovascular conditions should be asked more detailed questions about their personal or first-degree family history of allergy.

Key words: angiotensin-converting enzyme inhibitors; enalapril; dry cough; adverse drug reaction; adverse drug reaction predictors; cardiovascular pathology; history of allergies; clinical study

For citations: Sychev I.V., Denisenko N.P., Kachanova A.A., Lapshtaeva A.V., Abdullaev Sh.P., Goncharova L.N., Mirzaev K.B., Sychev D.A. Clinical signs and medical history as predictors of enalapril-associated dry cough in cardiovascular patients. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):231–240. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-231-240>

Введение

Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ) являются одними из ключевых препаратов в стандартах оказания медицинской помощи пациентам с артериальной гипертензией (АГ)¹, ишемической болезнью сердца (ИБС)², хронической сердечной недостаточностью (ХСН)³ и сохраняют позиции среди наиболее широко применяемых групп сердечно-сосудистых препаратов в течение последних десятилетий [1, 2]. В то же время, несмотря на доказанную высокую эффективность данной группы препаратов в лечении кардиоваскулярной патологии, до 30% пациентов вынуждены прекращать терапию ИАПФ из-за развития нежелательных реакций (НР), таких как кашель, ангионевротический отек, кожная сыпь, нарушение функции почек, ортостатическая гипотензия, лейкопения (вплоть до агранулоцитоза), гиперкалиемия [3–6]. Наиболее частой НР при приеме ИАПФ является сухой кашель, который развивается в 4–48% случаев [3, 4, 7]. Анализ результатов проведенных исследований демонстрирует, что данные о распространенности ИАПФ-ассоциированного кашля варьируют в зависимости от представителя группы ИАПФ, а также этнической принадлежности пациента [4, 8–14]. Недостаточно глубокая изученность клинических и анамнестических предикторов развития НР при применении ИАПФ у пациентов с кардиоваскулярной патологией, а также высокая частота отмены терапии свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения механизмов и факторов риска развития НР, ассоциированных с применением препаратов данной группы.

Цель работы — изучение клинико-анамнестических предикторов развития кашля на фоне приема эналаприла у пациентов с кардиоваскулярной патологией.

Материалы и методы

Исследование было проведено на базе кафедры факультетской терапии медицинского института Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева в период с 2019 по 2022 г. В исследование были включены 224 пациента с эссенциальной артериальной гипертензией (АГ), принимавших эналаприл, средний

возраст которых составил $65,14 \pm 8,2$ года; из них 40 (17,8%) мужчин (средний возраст $65,85 \pm 8,48$ года) и 184 (82,2%) женщины (средний возраст $64,98 \pm 8,11$ года).

Пациенты были распределены на 2 группы в зависимости от наличия у них НР в виде сухого кашля на фоне приема эналаприла. Основную группу (группа 1) составили 113 человек, у которых был выявлен сухой кашель, средний возраст — $64,7 \pm 7,9$ года, из них 16 мужчин (14,2%) и 97 женщин (85,8%). Начало развития сухого кашля на фоне приема эналаприла в основной группе варьировало от 6 до 41 сут, в среднем $14,71 \pm 6,24$ сут. После отмены препарата сухой кашель полностью прекращался в течение от 1 до 13 сут, в среднем на $6,19 \pm 2,02$ сут.

Контрольную группу составляли 104 пациента (группа 2), у которых не было отмечено развития никаких НР на фоне приема эналаприла. Средний возраст пациентов — $65,5 \pm 8,4$ года, среди них 21 мужчина (20,1%) и 83 женщины (79,8%).

Критериями включения пациентов в исследование были наличие АГ 2–3 стадии, прием эналаприла в качестве антигипертензивной терапии в сопоставимых дозах от 10 до 20 мг/сут. В исследование не включали пациентов с пороками сердца, миокардитами, вторичными формами АГ, с перенесенной тромбоэмболией легочной артерии и инфекционными эндокардитом, с острым инфарктом миокарда и декомпенсированной ХСН, острым нарушением мозгового кровообращения, онкологическими заболеваниями, хронической обструктивной болезнью легких, бронхиальной астмой, иммунокомпрометированных пациентов.

При формировании основной и контрольной групп всем пациентам проведено стандартное общеклиническое обследование, которое включало сбор жалоб, анамнеза жизни, сведений об имеющихся сопутствующих заболеваниях, тщательный сбор информации о наследственных заболеваниях, в том числе о патологии сердечно-сосудистой системы, сбор аллергологического анамнеза (оценка аллергологического статуса самого пациента (наличие атопических заболеваний, спектр сенсибилизации и др.) и семейного аллергологического анамнеза), фармакологического анамнеза (опрос пациента

¹ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 02.11.2020 № 1193н «Об утверждении стандартов медицинской помощи взрослым при артериальной гипертензии».

² Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.04.2021 № 410н «Об утверждении стандарта медицинской помощи взрослым при стабильной ишемической болезни сердца (диагностика, лечение и диспансерное наблюдение)».

³ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.04.2022 № 272н «Об утверждении стандарта медицинской помощи взрослым при хронической сердечной недостаточности (диагностика, лечение и диспансерное наблюдение)».

и изучение медицинской документации), физикальный осмотр.

Проведен также анализ данных лабораторных и инструментальных методов обследования: клинического и биохимического анализов крови (общий белок, глюкоза, аланиновая трансаминаза (АЛТ), аспарагиновая трансаминаза (АСТ), альбумин, фосфатаза щелочная, билирубин общий, билирубин прямой, калий, натрий, креатинин, мочевины, холестерин общий, С-реактивный белок (биохимический анализатор Architect c8000, Abbott, США)), клинический анализ мочи (автоматический анализатор мочи iChemVelocity, Beckman Coulter, США), электрокардиографии (ЭКГ) (электрокардиограф ECG300G, Med-Mos, Китай), эхокардиографии (Эхо-КГ) (ультразвуковой сканер Xario SSA-660A, Toshiba, Япония), суточного мониторирования артериального давления (BPLab, Россия), холтеровского мониторирования ЭКГ (Астрокард®, Миокард-холтер, регистратор ЭКГ 3-канальный HE2, Россия). Измерение офисного артериального давления (АД) проводили аускультативным методом с помощью профессионального механического тонометра (LD-71, Little Doctor, Сингапур) в положении сидя троекратно с интервалом в 1–2 мин.

Ограничением исследования было отсутствие анализа влияния лекарственной терапии по сопутствующей патологии на развитие кашля при приеме эналаприла.

Исследование соответствовало требованиям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и было одобрено локальным этическим комитетом МГУ им. Н.П. Огарева (протокол от 23.12.2020 № 91). До включения в исследование все участники дали письменное информированное добровольное согласие на проведение исследования.

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Учитывая нормальное распределение количественных данных, для анализа межгрупповых различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Для выявления различий частот значений качественных показателей был применен критерий согласия Пирсона χ^2 , при количестве наблюдений менее 5 – точный критерий Фишера. Для количественной оценки влияния маркеров на наступление НР было рассчитано отношение шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI). Для всех видов анализа был принят уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

Анализ клинико-anamnestических данных показал, что группы были сопоставимы по стадии АГ, количеству пациентов, достигших целевого уровня АД, наличию пациентов с ИБС и по стадии ХСН (табл. 1).

Анализ данных показал, что в группе пациентов, у которых развился сухой кашель на фоне приема ИАПФ, было достоверно больше лиц с сахарным диабетом (СД) 2 типа (OR=3,409, CI 1,461–7,953, $p=0,003$, $\chi^2=8,7472$).

Группы были сопоставимы по частоте встречаемости модифицируемых и немодифицируемых факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), таких как отягощенная наследственность по ССЗ, наличие ожирения, выявленная дислипидемия, употребление табака, чрезмерное потребление алкоголя, низкая физическая активность пациентов. При анализе сопутствующей антигипертензивной терапии, применявшейся в сочетании с эналаприлом, статистически значимых различий между основной и контрольной группами также не было выявлено.

Анализ данных аллергологического анамнеза пациентов (табл. 2) свидетельствовал о том, что проявления лекарственной токсикодермии статистически значимо чаще встречались у пациентов с наличием НР в виде кашля на фоне приема эналаприла (25,7% случаев, OR=5,639, CI 2,234–14,236, $\chi^2=15,845$, $p < 0,001$). Также у пациентов с наличием кашля чаще, чем у пациентов контрольной группы, выявлялась отягощенная наследственность по бронхиальной астме (OR=4,141, CI 2,066–8,299, $\chi^2=17,417$, $p < 0,001$) и по наличию тяжелых проявлений аллергических реакций (анафилактический шок, отек Квинке, астматический статус, генерализованная крапивница) и аутоиммунных заболеваний у близких родственников (OR=3,714, CI 1,720–8,018, $\chi^2=12,137$, $p < 0,001$).

При анализе результатов проведенных лабораторных исследований (общий анализ мочи, общий анализ крови, биохимический анализ крови) не было выявлено статистически значимых различий между показателями у пациентов с развитием сухого кашля на фоне приема эналаприла и пациентов, у которых кашель на фоне терапии ИАПФ не наблюдался.

Анализ результатов инструментальных методов обследования пациентов, в частности суточного мониторирования АД, показал статистически значимые различия показателей среднего систолического, дневного систолического и дневного диастолического АД у пациентов

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 1. Clinical characteristics of enrolled patients

Параметр <i>Parameter</i>	Количество пациентов, чел. (%) <i>Number of patients, pers. (%)</i>		Критерии достоверности <i>p, χ²</i> <i>Validity indices (p, χ²)</i>
	Основная группа (группа 1) <i>Study group (Group 1)</i> <i>n=113</i>	Группа контроля (группа 2) <i>Control group (Group 2)</i> <i>n=104</i>	
Артериальная гипертензия 2 стадии <i>Arterial hypertension stage 2</i>	78 (69,03)	73 (70,19)	<i>p=0,852,</i> <i>χ²=0,0348</i>
Артериальная гипертензия 3 стадии <i>Arterial hypertension stage 3</i>	35 (30,97)	31 (29,81)	
Достижение целевого уровня артериального давления <i>Achieved target levels of blood pressure</i>	79 (69,91)	83 (79,81)	<i>p=0,090,</i> <i>χ²=2,8030</i>
Ишемическая болезнь сердца <i>Ischaemic heart disease</i>	24 (21,24)	26 (25,00)	<i>p=0,511,</i> <i>χ²=0,4320</i>
Хроническая сердечная недостаточность I стадии <i>Chronic heart failure class I</i>	91 (80,53)	79 (75,96)	<i>p=0,414,</i> <i>χ²=0,6664</i>
Хроническая сердечная недостаточность IIa стадии <i>Chronic heart failure class IIa</i>	22 (19,47)	25 (24,04)	
Сахарный диабет <i>Diabetes mellitus</i>	25 (22,12)	8 (7,69)	<i>p=0,003*,</i> <i>χ²=8,7472</i>

Примечание. *n* – количество пациентов в группе; χ^2 – критерий согласия Пирсона.

* Различия статистически значимы.

Note. *n*, number of patients per group; χ^2 , Pearson's chi-squared test.

* Differences are statistically significant.

Таблица 2. Клинико-anamнестические предикторы сухого кашля у пациентов, принимавших эналаприл

Table 2. Clinical signs and medical history predictive of dry cough in patients treated with enalapril

Клинико-anamнестические параметры <i>Clinical signs and medical history</i>	Количество пациентов, чел. (%) <i>Number of patients, pers. (%)</i>		Критерии достоверности <i>Validity indices</i>	Отношение шансов (95% CI) <i>Odds ratio (95% CI)</i>
	Основная группа (группа 1) <i>Study group (Group 1)</i>	Группа контроля (группа 2) <i>Control group (Group 2)</i>		
Аллергическая реакция на лекарственные средства (токсикодермия) в анамнезе <i>History of allergic reactions to medicines (toxicoderma)</i>	29 (25,71)	6 (5,74)	<i>p<0,001*,</i> <i>χ²=15,845</i>	5,639 (2,234–14,236)
Наличие острых локализованных аллергических реакций (крапивница) в анамнезе <i>History of acute local allergic reactions (urticaria)</i>	7 (6,19)	5 (4,81)	<i>p=0,656,</i> <i>χ²=0,199</i>	1,308 (0,402–4,253)
Наличие бронхиальной астмы у близких родственников <i>Bronchial asthma in close relatives</i>	42 (37,17)	13 (12,5)	<i>p<0,001*,</i> <i>χ²=17,417</i>	4,141 (2,066–8,299)
Тяжелые проявления аллергической реакции у близких родственников <i>Severe allergic reactions in close relatives</i>	32 (28,32)	10 (9,62)	<i>p<0,001*,</i> <i>χ²=12,137</i>	3,714 (1,720–8,018)

Примечание. CI – доверительный интервал; *p* – уровень значимости; χ^2 – критерий согласия Пирсона.

* Различия статистически значимы.

Note. CI, confidence interval; *p*, level of significance; χ^2 , Pearson's chi-squared test.

* Differences are statistically significant.

основной и контрольной групп (табл. 3), но данные значения входили в диапазон нормы.

При проведении суточного холтеровского мониторирования ЭКГ не было получено значимых различий показателей у пациентов основной и контрольной групп. Результаты Эхо-КГ (табл. 4), несмотря на полученные достоверные отличия значений, были в пределах нормы.

Таким образом, при клиническом обследовании и сборе анамнеза у пациентов с наличием сухого кашля и без развития такой НР на фоне приема эналаприла было выявлено, что жалобы, объективный статус, показатели клинического и биохимического анализов крови, показатели

стандартных инструментальных методов обследования не имели значимых отличий. У пациентов в основной группе достоверно чаще были выявлены СД 2 типа и проявления лекарственной токсикодермии в анамнезе. Также было установлено, что отягощенный аллергологический анамнез достоверно чаще встречался как у самих пациентов с наличием НР в виде сухого кашля, так и у их близких родственников.

Обсуждение

Доказано, что кашель на фоне применения ИАПФ является серьезной НР, поскольку имеет упорный характер, является фактором риска

Таблица 3. Результаты суточного мониторинга артериального давления у пациентов, принимавших эналаприл

Table 3. Results of 24-hour blood pressure monitoring in patients treated with enalapril

Показатели артериального давления <i>Blood pressure parameters</i>	Результаты исследования <i>Findings</i>		Уровень значимости, <i>p</i> <i>Significance level, p</i>
	Основная группа (группа 1) <i>Study group (Group 1)</i> <i>n=113</i>	Группа контроля (группа 2) <i>Control group (Group 2)</i> <i>n=104</i>	
Среднее систолическое артериальное давление, мм рт. ст. <i>Mean systolic blood pressure, mm Hg</i>	130,61±14,02	128,04±10,95	0,137
Среднее диастолическое артериальное давление, мм рт. ст. <i>Mean diastolic blood pressure, mm Hg</i>	77,20±9,26	74,87±8,30	0,044*
Среднее систолическое артериальное давление дневное, мм рт. ст. <i>Mean daytime systolic blood pressure, mm Hg</i>	136,05±14,05	132,52±10,23	0,037*
Среднее диастолическое артериальное давление дневное, мм рт. ст. <i>Mean daytime diastolic blood pressure, mm Hg</i>	80,87±10,01	76,91±8,53	0,002*
Среднее систолическое артериальное давление ночное, мм рт. ст. <i>Mean nocturnal systolic blood pressure, mm Hg</i>	120,39±15,72	116,44±14,59	0,05
Среднее диастолическое артериальное давление ночное, мм рт. ст. <i>Mean nocturnal diastolic blood pressure, mm Hg</i>	71,07±10,32	69,74±8,50	0,303
Индекс времени систолического артериального давления (%) <i>Systolic pressure-time index (%)</i>	31,75±30,3	25,11±28,70	0,099
Индекс времени диастолического артериального давления (%) <i>Diastolic pressure-time index (%)</i>	12,57±4,14	10,93±7,09	0,141
Среднее пульсовое артериальное давление, мм рт. ст. <i>Mean pulse pressure, mm Hg</i>	51,97±5,16	49,04±6,81	0,457
Скорость утреннего подъема систолического артериального давления, мм рт. ст./ч <i>Rate of morning systolic blood pressure rise, mm Hg/h</i>	10,29±2,06	8,93±3,13	0,074
Скорость утреннего подъема диастолического артериального давления, мм рт. ст./ч <i>Rate of morning diastolic blood pressure rise, mm Hg/h</i>	5,27±1,95	4,90±1,77	0,493

Примечание. Данные представлены в формате ($M \pm SD$) – среднее и соответствующее стандартное отклонение; *n* – количество пациентов в группе.

* Различия статистически значимы, парный *t*-критерий Стьюдента.

Note. Data are presented as $M \pm SD$ (mean and standard deviation). *n*, number of patients per group.

* Differences are statistically significant, paired Student's *t*-test.

Таблица 4. Сравнительный анализ результатов эхокардиографии пациентов основной и контрольной групп

Table 4. Comparative analysis of echocardiography results in study and control groups

Показатели эхокардиографии <i>Echocardiography parameters</i>	Результаты исследования <i>Findings</i>		Уровень значимости, <i>p</i> <i>Significance level, p</i>
	Основная группа (группа 1) <i>Study group (Group 1)</i> <i>n=113</i>	Группа контроля (группа 2) <i>Control group (Group 2)</i> <i>n=104</i>	
Аорта (см) <i>Aorta (cm)</i>	3,04±0,59	3,02±0,57	0,873
Левое предсердие (см) <i>Left atrium (cm)</i>	3,10±0,43	3,32±0,42	0,0002*
Конечный диастолический размер (см) <i>End-diastolic diameter (cm)</i>	5,24±0,69	5,5±0,74	0,008*
Конечный систолический размер (см) <i>End-systolic diameter (cm)</i>	3,27±0,42	3,44±0,44	0,004*
Конечный диастолический объем (мл) <i>End-diastolic volume (mL)</i>	125,86±7,71	128,12±6,83	0,753
Конечный систолический объем (мл) <i>End-systolic volume (mL)</i>	42,19±4,85	43,01±4,97	0,936
Индекс массы миокарда левого желудочка (г/м ²) <i>Left ventricular myocardial mass index (g/m²)</i>	121,91±8,29	124,63±6,95	0,618
Межжелудочковая перегородка (см) <i>Interventricular septum (cm)</i>	1,12±0,13	1,14±0,12	0,940
Задняя стенка левого желудочка (см) <i>Left ventricular posterior wall (cm)</i>	1,13±0,15	1,13±0,13	0,873
Фракция выброса (%) <i>Ejection fraction (%)</i>	55,16±6,59	54,5±7,43	0,483

Примечание. Данные представлены в формате (*M±SD*) – среднее и соответствующее стандартное отклонение; *n* – количество пациентов в группе.

* Различия статистически значимы, парный *t*-критерий Стьюдента.

Note. Data are presented as *M±SD* (mean and standard deviation). *n*, number of patients per group.

* Differences are statistically significant, paired Student's *t*-test.

бронхоспазма и не купируется противокашлевыми препаратами центрального действия [15]. Кроме того, кашель способен вызвать рвоту, охриплость голоса, недержание мочи в момент приступа, пневмоторакс, переломы ребер и грыжи [15–17]. Возникновение данной НР ухудшает качество повседневной жизни пациентов с сердечно-сосудистой патологией.

По мнению большинства авторов, развитие кашля при приеме ИАПФ можно объяснить повышением концентрации в верхних дыхательных путях брадикинина и субстанции Р, которые в норме разрушаются ангиотензин-превращающим ферментом. Ингибирование фермента приводит к накоплению данных медиаторов в верхних и нижних дыхательных путях, а также к стимуляции образования простагландинов [18]. В качестве одного из потенциальных механизмов ИАПФ-индуцированного

кашля также рассматривалась повышенная чувствительность брадикинин-зависимых нервных волокон дыхательных путей [19]. Некоторые авторы предполагают, что развитие кашля опосредуется несколькими механизмами и к появлению вторичного кашля на фоне приема ИАПФ может привести только их сочетание [20].

В настоящее время изучены следующие факторы риска, способствующие развитию кашля у пациентов, принимающих ИАПФ: возраст более 65 лет, женский пол, курение, индекс массы тела, обструктивное апноэ во сне в анамнезе, сопутствующий прием тиазидных диуретиков [8, 21]. В то же время результаты ряда исследований указывают на отсутствие связи развития кашля с вышеуказанными факторами [7, 11, 22, 23]. В проведенном нами исследовании кашель на фоне приема эналаприла у пациентов женского пола развивался в 4 раза чаще, чем у мужчин.

Количество курящих пациентов в группах сравнения было сопоставимо. По результатам изучения частоты встречаемости сопутствующих заболеваний выявлено статистически значимое преобладание СД 2 типа у пациентов с развитием НР в виде кашля по сравнению с пациентами, у которых кашель не наблюдался. В источниках литературы встречаются единичные публикации, содержащие информацию о возможной ассоциации развития НР в виде сухого кашля на фоне применения ИАПФ с особенностями анамнеза, наличием сопутствующих заболеваний бронхолегочной системы, в частности связи с наличием у пациентов хронической обструктивной болезни легких, бронхиальной астмы и туберкулеза легких [24]. В проведенном нами исследовании у пациентов, у которых наблюдался кашель на фоне применения ИАПФ, достоверно чаще встречались кожные проявления аллергического характера, связанные с приемом лекарственных препаратов, чем у пациентов контрольной группы.

Необходимо отметить, что нам не удалось обнаружить публикации, в которых была бы отмечена необходимость сбора информации о наличии аллергических заболеваний и их проявлений у близких родственников пациентов с кардиологической патологией для оценки возможной связи наследственных заболеваний аллергического характера с развитием НР на фоне приема ИАПФ. В проведенном нами исследовании было выявлено, что проявления лекарственной токсикодермии у пациентов, отягощенная наследственность по бронхиальной астме и наличие тяжелых проявлений аллергических

реакций и аутоиммунных заболеваний у близких родственников статистически значимо чаще встречались у пациентов с наличием НР в виде кашля при применении эналаприла.

Заключение

Результаты анализа взаимосвязи клинико-anamнестических показателей пациентов с кардиоваскулярной патологией свидетельствуют о том, что сухой кашель на фоне приема эналаприла достоверно чаще развивался у пациентов с проявлением лекарственной токсикодермии в анамнезе, наличием СД 2 типа, с отягощенной наследственностью по бронхиальной астме и по наличию тяжелых проявлений аллергических реакций у близких родственников по сравнению с пациентами контрольной группы. Учитывая отсутствие достоверных отличий данных лабораторных и инструментальных методов исследования пациентов, склонных к развитию кашля на фоне приема эналаприла, и пациентов, у которых не было отмечено развития НР, целесообразно дополнить алгоритм сбора анамнеза при назначении препаратов группы ИАПФ указанием на необходимость подробного опроса о наследственных заболеваниях аллергического характера.

Изучение клинико-anamнестических предикторов развития НР на фоне применения ИАПФ позволит в дальнейшем существенно повысить качество жизни пациентов с кардиоваскулярной патологией и снизить риск развития осложнений при использовании лекарственных препаратов данной группы.

Литература / References

1. Chan NJ, Soliman AM. Angiotensin converting enzyme inhibitor-related angioedema: onset, presentation, and management. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124(2):89–96. <https://doi.org/10.1177/0003489414543069>
2. Soo Hoo GW, Lin HK, Junaid I, Klaustermeyer WB. Angiotensin-converting enzyme inhibitor angioedema requiring admission to an intensive care unit. *Am J Med*. 2015;128(7):785–9. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.02.006>
3. Brughts JJ. Discontinuation of angiotensin converting enzyme inhibitors due to dry cough: incidence and clinical determinants. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(3):563. <https://doi.org/10.1002/cpt.1130>
4. Borghi C, Cicero AF, Agnoletti D, Fiorini G. Pathophysiology of cough with angiotensin-converting enzyme inhibitors: how to explain within-class differences? *Eur J Intern Med*. 2023;110:10–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2023.01.005>
5. Morimoto T, Gandhi TK, Fiskio JM, Seger AC, So JW, Cook EF, et al. An evaluation of risk factors for adverse drug events associated with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Eval Clin Pract*. 2004;10(4):499–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2753.2003.00484.x>
6. Ng LP, Goh PS. Incidence of discontinuation of angiotensin-converting enzyme inhibitors due to cough, in a primary healthcare centre in Singapore. *Singapore Med J*. 2014;55(3):146–9. <https://doi.org/10.11622/smedj.2014034>
7. Nasser J, Al Aradi K, Kubra SE, Omran A. High incidence of cough among users of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Bahrain Med Bull*. 2018;40(2):97–9. <https://doi.org/10.12816/0047558>
8. Jamshed F, Jaffry H, Hanif H, Kumar V, Naz U, Ahmed M, Fareed S. Demographic and clinical characteristics of patients presenting with angiotensin-

- converting enzyme inhibitors induced cough. *Cureus*. 2019;11(9):e5624.
<https://doi.org/10.7759/cureus.5624>
9. Lavorini F, Chellini E, Innocenti M, Campi G, Egan CG, Mogavero S, Fontana GA. A crossover randomized comparative study of zofenopril and ramipril on cough reflex and airway inflammation in healthy volunteers. *Cough*. 2014;10(1):7.
<https://doi.org/10.1186/s12997-014-0007-5>
 10. Boonyapisit W, Tresukosol D. Comparison of the incidence of imidapril and enalapril induced cough. *J Med Assoc Thai*. 2010;93 Suppl 1:S48–53. PMID: 20364557
 11. Loo HC, Osman F, Ho SL, An SY, Yong YMA, Khoo EM. Incidence of angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough in a Malaysian public primary care clinic: a retrospective cohort study. *Malays Fam Physician*. 2022;17(1):66–70.
<https://doi.org/10.51866/oa.80>
 12. Liang L, Kung JY, Mitchelmore B, Gill J, Cave A, Banh HL. Angiotensin-converting enzyme inhibitor induced cough in Chinese patients: a systematic review and meta-analysis. *J Pharm Pharm Sci*. 2021;24:137–47.
<https://doi.org/10.18433/jpps31632>
 13. Mateti UV, Nekkanti H, Vilakkathala R, Rajakanan T, Mallayasamy S, Ramachandran P. Pattern of angiotensin-converting enzyme inhibitors induced adverse drug reactions in South Indian teaching hospital. *N Am J Med Sci*. 2012;4(4):185–9.
<https://doi.org/10.4103/1947-2714.94945>
 14. Olowofela AO, Isah AO. A profile of adverse effects of antihypertensive medicines in a tertiary care clinic in Nigeria. *Ann Afr Med*. 2017;16(3):114–119.
https://doi.org/10.4103/aam.aam_6_17
 15. Schröder H. Reizhusten bei ACE-Hemmer-Einnahme [Dry cough from ACE inhibitors]. *Med Monatsschr Pharm*. 2005;28(9):321–2. German. PMID: 16163883
 16. Tebha SS, Zaidi ZA, Sethar S, Virk MAA, Yousaf MN. Angiotensin converting enzyme inhibitor associated spontaneous herniation of liver mimicking a pleural mass: a case report. *World J Hepatol*. 2022;14(4):854–9.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i4.854>
 17. Trovato DA, Sousa JE, Bruetman JE, Finn BC, Young P. Fracturas costales simétricas asociadas a tos [Symmetrical rib fractures associated with chronic cough. Report of one case]. *Rev Med Chil*. 2018;146(3):391–3. Spanish.
<https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000300391>
 18. Pinto B, Jadhav U, Singhai P, Sadhanandham S, Shah N. ACEI-induced cough: a review of current evidence and its practical implications for optimal CV risk reduction. *Indian Heart J*. 2020;72(5):345–50.
<https://doi.org/10.1016/j.ihj.2020.08.007>
 19. Fox AJ, Laloo UG, Belvisi MG, Bernareggi M, Chung KF, Barnes PJ. Bradykinin-evoked sensitization of airway sensory nerves: a mechanism for ACE-inhibitor cough. *Nat Med*. 1996;2(7):814–7.
<https://doi.org/10.1038/nm0796-814>
 20. Yilmaz İ. Angiotensin-converting enzyme inhibitors induce cough. *Turk Thorac J*. 2019;20(1):36–42.
<https://doi.org/10.5152/TurkThoracJ.2018.18014>
 21. Fernandez-Rando M, Herrera MD, Almeida-González CV, Grilo A. Days needed for the disappearance of a cough due to the use of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and identification of predisposing factors associated with its appearance in a clinical cohort of hypertensive patients. *J Clin Pharmacol*. 2021;61(5):591–7.
<https://doi.org/10.1002/jcph.1786>
 22. Teklay G, Gebremedhin A, Ayalew E. Prevalence of cough among patients treated with angiotensin converting enzyme inhibitors. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 2014;12(5):992–8.
 23. Sato A, Fukuda S. A prospective study of frequency and characteristics of cough during ACE inhibitor treatment. *Clin Exp Hypertens*. 2015;37(7):563–8.
<https://doi.org/10.3109/10641963.2015.1026040>
 24. Wyskida K, Jura-Szoltys E, Smertka M, Owczarek A, Chudek J. Factors that favor the occurrence of cough in patients treated with ramipril—a pharmacoepidemiological study. *Med Sci Monit*. 2012;18(9):PI21–8.
<https://doi.org/10.12659/msm.883336>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *И.В. Сычев* — идея и концепция исследования, проведение исследования, систематизация данных литературы, написание и редактирование текста рукописи, формулировка выводов; *Н.П. Денисенко* — анализ и интерпретация данных литературы, редактирование текста рукописи, участие в проведении исследования; *А.А. Качанова* и *А.В. Лапштаева* — участие в проведении исследования, анализ и обсуждение полученных результатов; *Ш.П. Абдуллаев* — анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; *Л.Н. Гончарова* и *К.Б. Мирзаев* — разработка концепции исследования, критический пересмотр содержания и результатов работы, редактирование текста рукописи; *Д.А. Сычев* — разработка концепции исследования, критический анализ полученных результатов, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Ivan V. Sychev* elaborated the study idea and concept, conducted the study, collated literature data, drafted and edited the manuscript, and formulated the conclusions. *Natalia P. Denisenko* analysed and interpreted literature data, edited the manuscript, and participated in conducting the study. *Anastasia A. Kachanova* and *Anna V. Lapshtaeva* participated in conducting the study, analysed and discussed the findings. *Sherzod P. Abdullaev* analysed literature data and edited the manuscript. *Lyudmila N. Goncharova* and *Karin B. Mirzaev* elaborated the study concept, critically reviewed the content of the manuscript and the study results, and edited the manuscript. *Dmitry A. Sychev* elaborated the study concept, critically analysed the results obtained in the study, and approved the final version of the manuscript for publication.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом медицинского института Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева (протокол от 23.12.2020 № 91).

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации. Тематика государственного задания: «Новые фармакогенетические биомаркеры безопасности фармакотерапии некоторых социально-значимых заболеваний» (ЕГИСУ НИОКТР № 121110800062-6).

Конфликт интересов. Д.А. Сычев является членом редколлегии журнала «Безопасность и риск фармакотерапии». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Ethics approval. This study was approved by the Local Ethics Committee of the Institute of Medicine of the National Research Ogarev Mordovia State University (Protocol No. 91 of 23.12.2020).

Acknowledgments. This study was sponsored by the Ministry of Health of the Russian Federation. It was carried out as part of publicly funded research project “New Pharmacogenetic Biomarkers of the Safety of Pharmacotherapy of Certain Socially Significant Diseases” (Unified State Information System for Accounting of Scientific Research, Experimental Design and Technological Works for Civil Purposes, No. 121110800062-6).

Conflict of interest. Dmitry A. Sychev is a member of the Editorial Board of *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Сычев Иван Витальевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0227-2651>
sychev_iv@bk.ru

Денисенко Наталья Павловна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-5941>
natalypilipenko3990@gmail.com

Качанова Анастасия Алексеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3194-4410>
aakachanova@yandex.ru

Лапштаева Анна Васильевна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4828-2476>
av_lapshtaeva@mail.ru

Абдуллаев Шерзод Пардабоевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9001-1499>
abdullaevsp@gmail.com

Гончарова Людмила Никитична, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4324-9071>
glnsn@mail.ru

Мирзаев Карин Бадавиевич, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9307-4994>
karin05doc@yandex.ru

Сычев Дмитрий Алексеевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4496-3680>
dmitry.alex.sychev@gmail.com

Поступила 27.02.2023

После доработки 13.04.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Ivan V. Sychev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0227-2651>
sychev_iv@bk.ru

Natalia P. Denisenko, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-5941>
natalypilipenko3990@gmail.com

Anastasia A. Kachanova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3194-4410>
aakachanova@yandex.ru

Anna V. Lapshtaeva, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4828-2476>
av_lapshtaeva@mail.ru

Sherzod P. Abdullaev, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9001-1499>
abdullaevsp@gmail.com

Lyudmila N. Goncharova, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4324-9071>
glnsn@mail.ru

Karin B. Mirzaev, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9307-4994>
karin05doc@yandex.ru

Dmitry A. Sychev, Academician of the RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4496-3680>
dmitry.alex.sychev@gmail.com

Received 27 February 2023

Revised 13 April 2023

Accepted 6 June 2023



БЕЗОПАСНОСТЬ И РИСК
ФАРМАКОТЕРАПИИ

ISSN 2312-7821



9 772312 782004