

ОЦЕНКА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ МНОГОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА «РИАМИЛОВИР» НА МОДЕЛИ НЕЛИНЕЙНЫХ МОРСКИХ СВИНОК

К.Д. Федулова¹, Н.В. Изможерова¹, А.Ю. Петров², И.В. Гаврилов³, Н.В. Словеснова²

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

¹кафедра фармакологии и клинической фармакологии,

²кафедра фармации и химии,

³кафедра биохимии

Целью исследования являлась оценка гепатотоксического действия риамиловира при многократном введении на животной модели. Материалы и методы. Двадцать нелинейных морских свинок были рандомизированы на 4 группы: контрольную и экспериментальные, получавшие 64 дня ежедневно риамиловир перорально в дозировках 48, 96, 144 мг/кг. Трижды оценивался биохимический профиль: аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, гамма-глутамил-трансфераза, общий белок, общий и прямой билирубины, альбумин, холестерин, триглицериды – на 0, 33 и 65-й дни эксперимента. Результаты. Выявлено снижение альбумина и холестерина в группе животных с дозировкой риамиловира 96 мг/кг и альбумина в группе с дозировкой 144 мг/кг. Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о функциональном изменении синтетической функции печени без признаков гепатобилиарного и гепатоцеллюлярного повреждения.

Ключевые слова: гепатотоксичность, доклиническое исследование, риамиловир.

DOI 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-151-155

ASSESSMENT OF HEPATOTOXICITY OF MULTIPLE ANTIVIRAL RIAMILOVIR PREPARATION ADMINISTRATION IN NON-LINEAR GUINEA PIGS MODEL

K.D. Fedulova¹, H.V. Izmozherova¹, A.Yu. Petrov², I.V. Gavrilov³, N.V. Slovesnova²

FSBEI HE «Ural State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,

¹Department of pharmacology and clinical pharmacology,

²Department of pharmacy and chemistry,

³Department of biochemistry

The aim of this study was to assess hepatotoxicity of riamilovir with repeated administration on the animal model. Materials and methods. Twenty non-linear guinea pigs were randomized into 4 groups: control and three experimental, receiving 64 days of daily riamilovir orally in doses of 48, 96, 144 mg/kg. Biochemical profile: ALT, AST, GGT, total protein, total and direct bilirubins, albumin, cholesterol, triglycerides: on 0, 33 and 65 days from the start of the experiment. Results. A significant decrease of serum albumin and cholesterol levels was found only in group 2 and there were no statistically significant changes of other indicators. Conclusion. The data obtained indicate a functional liver synthetic function changes without signs of hepatobiliary and hepatocellular damage.

Key words: hepatotoxicity, preclinical study, riamilovir.

В настоящее время уделяется много внимания безопасности лекарственных препаратов, и доклинические исследования являются важнейшим этапом в изучении побочных их эффектов. Особенно важно на доклиническом этапе оценить риск развития гепатотоксичности. Лекарственные поражения печени (ЛПП) являются основной причиной острой печеночной недостаточности в США и Европе [2]. Согласно статистике, во Франции ЛПП возникают с частотой 14–19 случаев на 100 000 пациентов; по общемировой статистике, ЛПП возникает с частотой 13,9–24 случая на 100 000 пациентов. В доклинических исследованиях у 50 % новых потенциальных лекарственных молекул выявляется гепатотоксичность, которая в клинических

исследованиях является самой частой причиной отзыва препаратов [3].

Противовирусный препарат «Риамиловир» используется в клинической практике в составе комплексной терапии гриппа у взрослых и, являясь нуклеотидным аналогом, имеет потенциал для репозиционирования. Данный препарат обладает малой токсичностью при коротком курсе использования [1]. Являясь аналогом пуриновых оснований, этот препарат может быть ингибитором белка теплового шока 90 (heat shock protein 90, HSP90), который играет ключевую роль в жизненном цикле вируса гепатита В и С, вируса герпеса, вируса иммунодефицита человека [4]. Терапия данных вирусных инфекций требует более длительного

приема в сравнении с курсом лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. Соответственно риск возникновения нежелательных лекарственных реакций, в том числе ЛПП, может быть значительно выше. Таким образом, оценка потенциального риска гепатотоксичности риамиловира при длительном приеме представляется актуальной целью.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить гепатотоксическое действие препарата «Риамиловир» при многократном введении на животной модели.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментальной модели использовались нелинейные морские свинки. До начала эксперимента животные прошли карантин в течение одного месяца. Каждое животное содержалось в индивидуальной клетке в соответствии с ГОСТ Р 53434.2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».

Животные общим числом 20 рандомизированы при помощи приложения для рандомизации британского национального центра по замене, усовершенствования и уменьшения использования животных в исследованиях (National center for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research, UK).

Таким образом, животные были разделены на 4 группы: контрольная группа получала 10%-й сахарно-крахмальный сироп, I группа получала 2,5%-й сахарно-крахмальный сироп риамиловира (48 мг/кг), II и III группы получали 4%-й сахарно-крахмальный сироп риамиловира в разных объемах (96 и 144 мг/кг соответственно). Субстанция риамиловира (партия № 15117) производства ООО «Завод Медсинтез» (Российская Федерация). Для удобства доставки животным композиция в объеме 2 мл помещалась в шприцы с удаленными иглами; препарат хранился не более 7 дней при температуре 2–4 °С.

Характеристика экспериментальных групп представлена в табл. 1. Сироп вводился животным перорально за зубной ряд через короткий зонд, надеваемый на шприц, ежедневно в одно и то же время.

Таблица 1

Характеристика экспериментальных групп

Группа	Вес животных, г медиана [интерквартильный размах]	Дозировка риамиловира, мг/кг/сутки	Дозировка риамиловира в перерасчете на ЭДЧ, мг/кг
Контрольная группа, $n = 5$	880,0 [520,0; 967,0]	0	0
Группа I, $n = 5$	832,5 [790,0; 932,5]	48	10,2
Группа II, $n = 5$	861,0 [790,0; 931,0]	96	20,4
Группа III, $n = 5$	916,0 [798,5; 967,5]	144	30,6

Примечание. ЭДЧ – эквивалентная доза человека, рассчитана по формуле $ЭДЧ = \text{доза животного} / k$, где k для морской свинки 4,7.

В течение эксперимента каждое животное осматривалось ежедневно, оценивались: активность, общее состояние животных, изменения шерсти, наличие диареи и кровотечений. Забор крови производился трижды после 14–15-часового голодания: до начала эксперимента (0-й день), на 33-й и 65-й дни эксперимента. Биохимическая панель включала: аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), общий и свободный билирубин, гамма-глутамил-трансфераза (ГГТ), общий холестерин, триглицериды, общий белок.

Кровь забиралась при помощи вакуумной системы забора крови VACUETTE® из полости сердца, в пробирки VACUETTE® с гелем и активатором свертывания [5]. Во время забора крови животные находились под

общей анестезией, которая выполнялась с помощью лекарственных препаратов «Золетил 100» (Тилетамин) и «Ксила» 2 % (Ксилазин), анестезиологическое пособие оказывалось врачом-ветеринаром.

Биохимический анализ производился на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell (Awareness Technology, США) с использованием реактивов ООО «Ольвекс-Диагностикум».

После окончания 8-недельного периода введения препарата (на 65-й день) животные выводились из эксперимента при помощи эфирного наркоза. Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программ Statistica 13.0 (StatSoft, США). Алгоритм статистического анализа включал этап определения

медианы, 25 и 75 процентиля. Сравнение полученных результатов проводилось при помощи непараметрического критерия Фридмана, разницу принимали как статистически значимую при $p < 0,05$.

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 10 от 16.12.2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении всего исследования ни в одной экспериментальной группе отклонений в состоянии здоровья животных обнаружено не было. У всех морских свинок была чистая, ухоженная шкурка, видимые слизистые и кожные покровы имели физиологическую окраску, экзофтальма не было. Диарея и кровотечения не зафиксированы.

При сравнении значений полученных биохимических показателей (табл. 2) при помощи критерия Фридмана статистически значимых изменений значений АЛТ, АСТ, ГГТ, общего и свободного билирубина, триглицеридов и общего белка не было получено. Для оценки гепатоцеллюлярного повреждения достаточно двух маркеров из перечисленных: АЛТ, АСТ, сорбитолдегидрогеназа или глутаматдегидрогеназа [7]. Как минимум два параметра из перечисленных необходимы для идентификации гепатобилиарного повреждения: щелочная фосфатаза, гамма-глутамил-трансфераза, 5-нуклеотидаза или общий билирубин [7]. Такие показатели, как общий белок, альбумин, холестерин, триглицериды используются как дополнительные параметры метаболической и синтетической функции печени. Стоит отметить, что снижение альбумина является отражением нарушением не только

синтетической функции, но и маркером воспалительных процессов [9].

В исследовании было выявлено статистически значимое снижение альбумина во II группе с 45,7 [44,3; 46,25] г/л в начале эксперимента до 37,25 [36,2; 39,5] г/л на 65-й день ($p = 0,018$), и в III группе 44,95 [42,8; 46,15] г/л в начале эксперимента до 43,1 [40,7; 44,5] г/л на 65-й день ($p = 0,039$), статистически значимое снижение холестерина во II группе с 1,33 ммоль/л [1,16; 1,4] в начале эксперимента до 0,9 ммоль/л [0,69; 1,0] на 65-й день ($p = 0,049$), при этом его уровень остался в границах нормы (норма холестерина для морских свинок составляет 0,5–2,0 ммоль/л) [8].

Также было выявлено снижение альбумина во II группе животных на 8,45 г/л ($p = 0,018$), с 45,7 г/л в начале эксперимента до 37,25 г/л на 65-й день и в III группе животных на 1,85 г/л ($p = 0,039$), с 44,95 г/л в начале эксперимента до 43,1 г/л. Значение альбумина также осталось в границах нормального значения (норма альбумина для морских свинок 20–50 г/л) [10]. Не было зарегистрировано снижения общего белка во II группе, что может свидетельствовать об относительном снижении уровня альбумина и повышении уровня провоспалительных белков, в том числе глобулина. Воспалительные цитокины, в том числе интерлейкин-1, фактор некроза опухолей, интерферон, стимулируют синтез белков воспалительных белков, что приводит к относительному снижению альбумина [9]. Также стоит отметить, что отсутствовали изменения в III группе животных, получавших максимальную дозировку риамиловира. Вероятнее всего, это связано с физико-химическими свойствами соли риамиловира, которая обладает плохой растворимостью. Возможно, в концентрации 144 мг/кг препарат плохо всасывается при пероральном введении.

Таблица 2

Динамика биохимических показателей (медиана, 25-й и 75-й процентиля)*

Показатель	Группа	День эксперимента			p, критерий Фридмана
		0	33	65	
АЛТ, Ед./л	Контроль	25,0 [21,7; 27,1]	35,5 [29,4; 35,5]	45,2 [27,1; 53,7]	0,09
	I группа	39,85 [25,7; 53,6]	35,65 [28,6; 45,4]	29,25 [24,1; 38,9]	0,77
	II группа	33,1 [24,1; 35,0]	28,25 [35,7; 40,5]	46,65 [30,9; 61,7]	0,17
	III группа	37,5 [31,8; 45,6]	43,5 [35,7; 57,8]	54,85 [40,0; 67,0]	0,47
АСТ, Ед./л	Контроль	30,8 [22,6; 48,5]	44,3 [29,1; 61,1]	88,6 [41,3; 107,3]	0,26
	I группа	26,35 [21,1; 63,7]	43,15 [30,6; 59,5]	55,9 [36,4; 77,3]	0,77
	II группа	38,65 [26,0; 50,9]	46,5 [28,8; 56,4]	33,3 [31,6; 35,3]	0,62
	III группа	49,15 [33,0; 63,5]	48,6 [46,0; 53,2]	65,45 [37,9; 102,6]	0,47

Показатель	Группа	День эксперимента			p, критерий Фридмана
		0	33	65	
ГГТ, Ед./л	Контроль	6,46 [5,8; 10,6]	6,46 [4,1; 6,46]	7,08 [4,7; 23,0]	0,71
	I группа	6,1 [5,0; 11,4]	7,24 [6,61; 8,0]	9,0 [7,77; 10,0]	0,62
	II группа	7,0 [5,9; 9,5]	7,0 [5,6; 8,6]	6,78 [5,95; 14,0]	0,77
	III группа	9,0 [7,5; 10,1]	7,4 [6,6; 8,0]	8,5 [7,6; 10,5]	0,36
Билирубин общий, мкмоль/л	Контроль	8,96 [6,0; 9,12]	5,75 [3,95; 8,22]	7,4 [7,07; 10,2]	0,71
	I группа	7,4 [5,75; 16,0]	4,77 [2,4; 8,5]	6,37 [3,08; 10,2]	1,0
	II группа	9,865 [5,5; 13,35]	4,11 [3,0; 8,4]	5,75 [3,5; 19,1]	0,08
	III группа	11,47 [4,93; 18,8]	8,22 [6,2; 8,26]	7,6 [5,3; 12,45]	1,0
Билирубин свободный, мкмоль/л	Контроль	1,89 [1,64; 2,2]	1,46 [1,1; 1,48]	1,91 [1,81; 3,11]	0,051
	I группа	1,69 [0,9; 4,15]	1,35 [1,1; 1,89]	1,64 [1,08; 2,5]	1,0
	II группа	2,09 [1,47; 2,8]	1,32 [0,87; 2,1]	1,54 [1,1; 4,3]	0,17
	III группа	2,76 [1,74; 4,06]	1,46 [1,1; 1,8]	2,11 [1,36; 3,1]	0,17
ТГ, ммоль/л	Контроль	1,15 [1,02; 1,56]	1,76 [1,72; 2,9]	2,2 [1,68; 2,26]	0,09
	I группа	1,25 [0,9; 1,7]	1,0 [0,86; 1,72]	1,46 [0,9; 1,9]	0,07
	II группа	0,93 [0,89; 1,5]	1,51 [0,88; 2,2]	1,68 [1,5; 1,97]	0,36
	III группа	2,665 [1,94; 3,08]	1,77 [1,4; 2,5]	1,9 [1,2; 2,53]	0,47
ХС, ммоль/л	Контроль	0,97 [0,81; 0,99]	1,06 [0,85; 1,18]	0,84 [0,81; 0,9]	0,26
	I группа	1,01 [0,83; 1,14]	0,94 [0,79; 1,2]	0,705 [0,65; 0,94]	0,36
	II группа	1,33 [1,16; 1,4]	1,22 [0,9; 1,4]	0,9 [0,69; 1,0]	0,049
	III группа	1,05 [0,82; 1,27]	0,96 [0,81; 1,21]	1,13 [0,98; 1,18]	0,47
Общий белок, г/л	Контроль	51,3 [43,1; 61,5]	59,5 [57,4; 60,9]	58,6 [53,0; 63,6]	0,36
	I группа	58,0 [56,7; 58,7]	57,25 [54,2; 58,1]	51,55 [43,4; 58,6]	0,17
	II группа	59,2 [58,4; 60,3]	57,95 [57,4; 58,8]	54,95 [54,6; 57,3]	0,17
	III группа	58,45 [56,4; 59,0]	57,6 [53,6; 59,8]	57,6 [53,6; 59,8]	0,17
Альбумин, г/л	Контроль	40,1 [35,1; 49,9]	46,0 [45,9; 46,8]	41,6 [38,8; 44,9]	0,26
	I группа	43,9 [42,3; 45,7]	44,5 [42,9; 46,0]	37,3 [32,9; 42,3]	0,36
	II группа	45,7 [44,3; 46,2]	43,0 [40,4; 45,7]	37,25 [36,2; 39,5]	0,018
	III группа	44,95 [42,8; 46,1]	55,9 [54,3; 57,7]	43,1 [40,7; 44,5]	0,039

* Различия значимы при $p < 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Противовирусный препарат «Риамилловир» не вызывает гепатоцеллюлярного и гепатобилиарного повреждения при многократном введении в дозировках 48, 96, 144 мг/кг в течение 64 дней (8 недель). Возможно функциональное изменение синтетической функции печени при ежедневном введении риамилловира в течение 8 недель в дозировках 96 и 144 мг/кг.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Деева Э.Г., Русинов В.Л., Чарушин В.Н. и др. / Deeva E.G., Rusinov V.L., Charushin V.N., et al. Противовирусный препарат «Триазавирин»: от скрининга до клинической апробации / Protivovirusnyj preparat "Triazavirin": ot skrininga do klinicheskoy aprobacii [Antiviral drug "Triazavirin": from screening to clinical testing] // Разработка и апробация лекарственных средств / *Razrabotka i aprobaciya lekarstvennyh sredstv* [Drug development and approbation]. – 2014. – № 2 (7). – С. 144–151.
2. Kullak-Ublick G.A., Andrade R.J., Merz M., et al. Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment // *Gut*. – 2017. – No. 66. – P. 1154–1164.
3. Chen M., Suzuki A., Borlak J., et al. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors // *Journal of Hepatology*. – 2015. – Vol. 63 (2). – P. 503–514.
4. Fedulova K.D., Ivanova A.V., Izmozherova N.V. Computer modeling of interaction between the antiviral drug riamilovir

and HSP90 // *AIP Conference Proceedings*. – 2019. – No. 2063(030007). – URL: <https://doi.org/10.1063/1.5087315> (date of viewing: 14.09.2020).

5. Parasuraman S., Raveendran R., Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals // *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. – 2010. – No. 1 (2). – P. 87–93.

6. James L.S., Thomas K.B. The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus // *Drug discovery today*. – 2009. – No. 14 (3-4). – P. 162–167.

7. Reflection paper on non-clinical evaluation of drug-induced liver injury (DILI) // Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – 2010. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-non-clinical-evaluation-drug-induced-liver-injury-dili_en.pdf (date of viewing: 14.09.2020).

8. Siska W., Gupta A., Tomlinson L., et al. Recommendations for clinical pathology data generation, interpretation, and reporting in target animal safety studies for veterinary drug development // *International Journal of Toxicology*. – 2017. – No. 36 (4). – P. 293–302.

9. Manani S.M., Virzi G.M., Clementi A., et al. Pro-inflammatory cytokines: a possible relationship with dialytic adequacy and serum albumin in peritoneal dialysis patients // *Clinical kidney journal*. – 2016. – Vol. 9 (1). – P. 153–157.

10. Washington I.M., Van Hoosier G. Clinical biochemistry and hematology // *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. – 2012. – P. 57–116.

Контактная информация

Федулова Ксения Дмитриевна – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, e-mail: fedulova.k.d@gmail.com