

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Исследование специфических видов токсичности оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил

Гайдай Е.А.¹, Крышень К.Л.¹, Джайн (Корсакова) Е.А.³, Демченко Д.В.², Каргопольцева Д.Р.¹, Кательникова А.Е.¹, Гайдай Д.С.¹, Балабаньян В.Ю.³

¹АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Ленинградская область, пос. Кузьмолловский, Россия;

²ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Ленинградская область, пос. Кузьмолловский, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия

Введение. В настоящее время комбинированная антиретровирусная терапия (АРТ) является основным компонентом лечения пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Вместе с тем высокий мутационный потенциал возбудителя и частота проявления побочных эффектов существующих препаратов диктуют необходимость разработки и доклинического изучения новых более эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС).

Цель исследования – комплексная оценка специфических видов токсичности нового нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (ревертазы, РНК-зависимой ДНК-полимеразы) (ННИОТ) вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, производного бензофенона.

Материал и методы. В работе изучены репродуктивная токсичность, эмбрио-, иммунотоксичность, а также генотоксические (в тестах учёта микроядер в эритроцитах крови и ДНК-комет) и аллергизирующие свойства указанной субстанции (в тестах реакций общей анафилаксии (РОА), активной кожной анафилаксии (АКА) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)). Соединение протестировано на 3 видах животных в 2 дозах: предполагаемой терапевтической (1 ТД) и её 10-кратном эквиваленте (10 ТД). С учётом метаболических коэффициентов для крыс (*Rattus*) дозы составили 9 и 90 мг/кг, для мышей (*Mus musculus*) 21 и 210 мг/кг, для морских свинок (*Cavia porcellus*) – 8 и 80 мг/кг соответственно.

Результаты и обсуждение. По итогам исследований установлен благоприятный профиль безопасности тестируемого объекта. Не выявлено его негативного влияния на иммунную систему, репродуктивную функцию, организм беременных животных и плод; препарат в эксперименте не обладал генотоксическими и аллергизирующими свойствами.

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать исследуемую субстанцию в качестве перспективного терапевтического кандидата для лечения инфекции, вызываемой ВИЧ-1.

Ключевые слова: ВИЧ-1; бензофенон; доклинические исследования; иммунотоксичность; репродуктивная токсичность; эмбриотоксичность; генотоксичность; аллергия; крысы; мыши; морские свинки

Для цитирования: Гайдай Е.А., Крышень К.Л., Джайн (Корсакова) Е.А., Демченко Д.В., Каргопольцева Д.Р., Кательникова А.Е., Гайдай Д.С., Балабаньян В.Ю. Исследование специфических видов токсичности оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(4): 279-288. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

Для корреспонденции: Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук, руководитель отдела токсикологии и микробиологии, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Ленинградская область, пос. Кузьмолловский, Россия. E-mail: kryshen.kl@doclinika.ru

Участие авторов: Гайдай Е.А. – проведение экспериментов, сбор данных, подготовка текста; Крышень К.Л. – планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание текста; Джайн (Корсакова) Е.А. – анализ данных, подбор и анализ литературы, написание текста; Демченко Д.В. – анализ данных, обсуждение результатов; Каргопольцева Д.Р. – анализ данных, обсуждение результатов; Кательникова А.Е. – анализ данных, обсуждение результатов; Гайдай Д.С. – анализ данных, обсуждение результатов; Балабаньян В.Ю. – разработка концепции и дизайна исследований, обсуждение результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России (Государственный контракт № 14.N08.11.0154 от 02 июня 2017 г.; уникальный идентификатор контракта RF-N0817X0148).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации.

Поступила 30.03.2021

Принята к печати 14.07.2021

Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

Study of the specific toxic effects of the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, the original non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) reverse transcriptase

Elena A. Gaidai¹, Kirill L. Kryshen¹, Ekaterina A. Jain (Korsakova)³, Dmitry V. Demchenko², Dilara R. Kargopol'tseva¹, Anastasiya E. Katel'nikova¹, Dmitry S. Gaidai¹, Vadim Yu. Balabanyan³

¹«RMC HOME OF PHARMACY» JSC, 188663, Leningrad Region, Kuz'molovskiy vill., Russia;

²CJSC «St. Petersburg Institute of Pharmacy», 188663, Leningrad Region, Kuz'molovskiy vill., Russia;

³FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University», 119991, Moscow, Russia

Introduction. Combination antiretroviral therapy is currently the main component of treatment for human immunodeficiency virus (HIV) infected patients. At the same time, the high mutational potential of the virus and the frequency of side effects of existing drugs dictate the need for the development and preclinical study of new, more effective and safer compounds.

The **aim** of the study is to evaluate the specific types of toxicity of a new non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RNA-dependent DNA revertase) (NNRTI) based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, a benzophenone derivative.

Material and methods. The study investigated reproductive toxicity, embryotoxicity, immunotoxicity, genotoxic (in micronucleus test in and comet assay) and allergenic properties of the test item compound. It was tested on three species of animals in two doses: the estimated therapeutic dose (1 TD) and its tenfold equivalent (10 TD). Taking into account the metabolic coefficients, the doses for rats (*Rattus*) were 9 and 90 mg/kg, for mice (*Mus musculus*), 21 and 210 mg/kg, and for guinea pigs (*Cavia porcellus*), 8 and 80 mg/kg, respectively.

Results and discussion. According to the obtained results, a favorable safety profile of the tested compound was established. Negative effects on the immune system, reproductive function, the body of pregnant animals and the fetus were not observed, as well as the compound did not have genotoxic and allergenic properties.

Conclusion. These data allows to consider the studied compound as a promising therapeutic candidate for the treatment of HIV-1 infection.

Key words: HIV-1; benzophenone; preclinical studies; immunotoxicity; reproductive toxicity; embryotoxicity; genotoxicity; allergy; rats; mice; guinea pigs

For citation: Gaidai E.A., Kryshen' K.L., Jain (Korsakova) E.A., Demchenko D.V., Kargopol'tseva D.R., Katel'nikova A.E., Gaidai D.S., Balabanyan V.Yu. Study of the specific toxic effects of the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, the original non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) reverse transcriptase. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 279-288 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

For correspondence: Kryshen' K.L., Ph.D. (Biol.), Head of the Toxicology and Microbiology Department, «RMC HOME OF PHARMACY» JSC, 188663, Russia, Leningrad Region, Kuz'molovskiy vill., Russia.
E-mail: kryshen.kl@doclinika.ru

Information about the authors:

Gaidai E.A., <http://orcid.org/0000-0002-5295-6384>

Kryshen' K.L., <http://orcid.org/0000-0003-1451-7716>

Jain (Korsakova) E.A., <http://orcid.org/0000-0003-0283-8598>

Demchenko D.V., <http://orcid.org/0000-0003-3856-3936>

Kargopol'tseva D.R., <http://orcid.org/0000-0002-9944-5223>

Katel'nikova A.E., <http://orcid.org/0000-0003-3203-9869>

Gaidai D.S., <http://orcid.org/0000-0002-8773-5717>

Balabanyan V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

Contribution: Gaidai E.A. – conducting of the experiments, data collecting, preparing of the text, Kryshen' K.L. – planning and conducting of the experiments, data analysis, writing of the text; Jain (Korsakova) E.A. – data analysis, literature analysis, writing of the text; Demchenko D.V. – data analysis, discussion of the results; Kargopol'tseva D.R. – data analysis, discussion of the results; Katel'nikova A.E. – data analysis, discussion of the results; Gaidai D.S. – data analysis, discussion of the results; Balabanyan V.Yu. – working out the research concept and design, discussion of the results.

Funding. The work was carried out with a financial support from the Ministry of Education and Science of Russia (State contract No. 14.N08.11.0154 dated June 02, 2017; unique contract identifier RF-N0817X0148).

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the organization.

Received 30 March 2021

Accepted 14 July 2021

Published 31 August 2021

Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (*Retroviridae*; *Orthoretrovirinae*; *Lentivirus*; *Human immunodeficiency virus* (HIV)) является этиологическим фактором одного из наиболее широко распространённых и опасных для жизни человека состояний – синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в конце 2019 г. в мире насчитывалось ~50 млн ВИЧ-инфицированных (людей, живущих с ВИЧ), из которых ~29 млн получали антиретровирусную терапию (АРТ). Число ВИЧ-позитивных лиц, проживающих в Российской Федерации, в 2020 г. приблизилось к 1,5 млн (1 452 942 согласно официальной статистике Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) [1].

В настоящее время АРТ включает комбинированное применение следующих групп препаратов: ингибиторы протеазы и интегразы ВИЧ-1; ингибиторы фузии (слияния); ингибиторы хемокиновых рецепторов; ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ). При этом ОТ представляет собой одну из наиболее важных мишеней фармакотерапевтического воздействия на вирус, а среди лекарственных средств (ЛС), ингибирующих действие данного фермента, преобладают ненуклеозидные ингибиторы ОТ (ННИОТ). Этот класс препаратов отличается высокой противовирусной активностью и относительно хорошей переносимостью [2]. Тем не менее значительный мутационный потенциал ВИЧ-1 и появление резистентных штаммов вируса диктуют необходимость дальнейшего поиска и создания ННИОТ различной химической структуры для применения в широкой клинической практике.

Работы, проведённые на кафедре фармацевтической и токсикологической химии в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» (ВолгГМУ) Минздрава России в сотрудничестве с учёными Института моле-

кулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Федерального агентства организаций науки (ФАНО) России, исследователями из Соединённых Штатов Америки (США) и Западной Европы (фармацевтическая компания ImQuest BioSciences Inc., США; Rega Institute for Medical Research, Бельгия) имели результатом открытие нового класса ННИОТ, проявляющих антиретровирусную активность *in vitro* в наномолярном диапазоне концентраций. По химической классификации соединения относятся к N-алкиламещённым производным пиримидиновых и пуриновых оснований, содержащим терминальные ненасыщенные и ароматические фрагменты [3]. Сравнительное исследование цитотоксичности и противовирусной активности позволило выделить производные бензофенона, имеющие в составе двухъядерный ароматический фрагмент на конце ациклической цепи в N1-замещённых урацилах, в качестве наиболее перспективных терапевтических кандидатов [4]. Среди молекул из группы пиримидиновых производных бензофенона было отобрано соединение-лидер – 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил.

Цель исследования – комплексная оценка специфических видов токсичности лекарственного препарата на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил для лечения инфекции, вызываемой ВИЧ-1.

Материал и методы

В ходе работы проведено экспериментальное исследование по изучению репродуктивной токсичности, эмбрио- и иммунотоксичности, генотоксических и аллергизирующих свойств ЛС на основе пиримидинового производного бензофенона – субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил (**рис. 1**). Эксперименты проведены на лабораторных животных вивария АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» с соблюдением положений Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [5]. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответ-

ствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Все исследования рассмотрены локальной биоэтической комиссией организации и одобрены для проведения. Протоколы исследований также одобрены данной комиссией (изучение иммунотоксичности: протокол № 1.3/18 от 17.01.2018; изучение репродуктивной токсичности (генеративная): протокол № 4.5/18 от 22.01.2018; изучение эмбриотоксичности: протокол № 1.16/18 от 14.03.2018; изучение аллергизирующих свойств: протокол № 1.13/18 от 02.03.2018; изучение генотоксичности: протоколы № 4.3/18 от 17.01.2018 (тест учёта микроядер), № 3.3/18 от 17.01.2018 (ДНК-комет-тест)). Использовали крыс-альбиносов (*Rattus*) (90 самцов и 290 самок в рамках изучения репродуктивной токсичности, эмбриотоксического и канцерогенного действия); мышей-альбиносов (*Mus musculus*) (95 самцов, 80 самок) с целью изучения генотоксических свойств и реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), дающей представление о характере аллергизирующего действия; мышей линии BALB/c для определения иммунотоксичности – 90 самцов и 90 самок, а также морских свинок (*Cavia porcellus*) в количестве 68 самцов и 48 самок для оценки аллергизирующих свойств в тестах реакций общей анафилаксии (РОА) и активной кожной анафилаксии (АКА). Контрольным веществом служило плацебо тестируемого агента. ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил протестировано в 2 дозах: предполагаемой терапевтической (1 ТД) и её 10-кратном эквиваленте (10 ТД). С учётом метаболических коэффициентов для крыс дозы составили 9 и 90 мг/кг, для мышей 21 и 210 мг/кг, для морских свинок – 8 и 80 мг/кг соответственно.

Все тесты проведены в соответствии со стандартными методиками [6–10]. Исследуемый препарат вводили внутривенно с помощью атравматичного зонда. Подобный способ введения был выбран как аналог перорального, планируемого в клинической практике. Продолжительность и схема введения различались в зависимости от типа исследования и были регламентированы нормативными документами [6–10].

В ходе изучения репродуктивной токсичности группы животных были сформированы таким образом, чтобы тестируемое вещество получали только самцы или только самки. После периода введения особей, получавших препарат, скрещивали с интактными самками или самцами соответственно. Была сформирована также группа плацебо, где животных скрещивали между собой. Оценивали общее клиническое состояние животных, динамику массы тела, летальность, эффективность оплодотворения (путём определения индексов плодовитости, беременности, а также оплодотворяющей способности самцов). У самцов изучали спермограмму (концентрацию, процентное соотношение живых, мёртвых и незрелых сперматозоидов; соотношение подвижных и неподвижных клеток). У самок оценивали протекание беременности (по приросту массы тела), ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус, а также пренатальное развитие плодов (посредством расчёта

пред- и постимплантационной смертности) и постнатальное развитие потомства: общее физическое состояние в соответствии с возрастом; степень физического развития; скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов; формирование эмоционально-двигательного поведения и способности к тонкой координации движений. Кроме того, выполняли гистологический анализ органов репродуктивной системы самцов (семенников и придатков) и самок (матки и яичников).

Оценка эмбриотоксичности включала в себя изучение общего клинического состояния животных, протекания беременности на фоне терапии тестируемым препаратом или плацебо, пре- и постнатального развития потомства (по аналогии с репродуктивной токсичностью). Осуществляли также гистологическое исследование плодов (степень развития скелета и внутренних органов) и репродуктивных органов самок.

Генотоксические свойства изучали в тестах учёта микроядер в эритроцитах крови и ДНК-комет. Первый из них заключается в оценке количества микроядер в полихроматофильных (ПХЭ) и нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ) периферической крови мышей после курсового введения исследуемого вещества. В данный эксперимент была включена дополнительная контрольная группа, в которой особям вводили однократно внутривенно соединение, индуцирующее образование эритроцитов с микроядрами, – циклофосфамид в дозе 50 мг/кг.

В основе ДНК-комет-теста лежит регистрация подвижности в постоянном электрическом поле молекул и/или фрагментов ДНК клеток, заключённых в агарозный гель. При этом молекулы нуклеиновой кислоты мигрируют к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы. Длина и содержание в нём ДНК зависят от количества одно- и двунитевых разрывов её молекул, а также щёлочнолабильных сайтов. Методика позволяет оценивать повреждения генетического материала на уровне от-

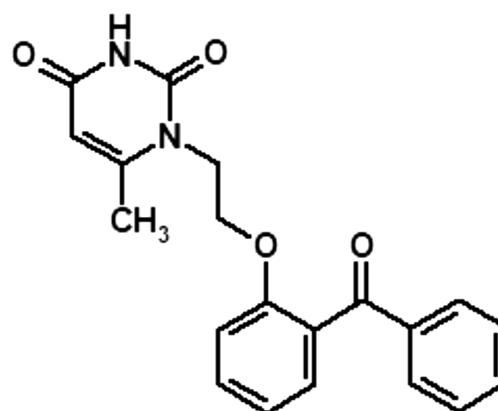


Рис. 1. Структурная формула 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила.

Fig. 1. Structural formula of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil.

дельных клеточных элементов; она обладает высокой чувствительностью, требует минимального количества экспериментального материала и применима ко всем типам клеток, содержащих ДНК. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали её процентное содержание в хвосте кометы [10]. В рамках данного исследования изучали клетки костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга самцов и самок крыс. Веществом позитивного контроля, индуцирующим повреждение нуклеиновой кислоты, служил супермутagen этилметансульфонат (ЭМС) в дозе 200 мг/кг.

Аллергизирующие свойства анализируемого соединения изучали в 3 тестах. Для оценки реакции немедленного типа были выбраны тесты РОА и АКА на самцах и самках морских свинок; оценку реакции замедленного типа проводили в тесте определения ГЗТ на аутбредных самцах и самках мышей. Данные пробы входят в перечень методов выявления сенсибилизации, технически просты и хорошо воспроизводимы. Сенсибилизацию животных выполняли тестируемым веществом и плацебо при 3-кратном внутрижелудочном способе введения в тестах РОА и АКА. В качестве разрешающей дозы использовали раствор субстанции ЛС в концентрации 0,1 мг/мл в растворе 100% диметилсульфоксида (ДМСО) + 60% полиэтиленгликоля ПЭГ-400. Разрешающую инъекцию проводили путём внутрисердечного введения в РОА. Оценку результатов осуществляли посредством вычисления анафилактического индекса Вейгля [11], отражающего интенсивность реакции в группе. В тесте АКА на стадии разрешения внутрикожно в 3 точки вводили раствор субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил. Для контроля реактивности в область другого участка кожи аналогичным образом производили инъекцию растворителя субстанции исследуемого препарата. Через 20 мин после этого животным всех групп вводили по 0,5 мл 1% раствора синего Эванса внутрисердечно для распределения красителя через системный кровоток по органам и тканям и окрашивания мест разрешающей инъекции.

Спустя 30 мин после введения раствора синего Эванса животных эвтаназировали, вскрывали и определяли диаметр синего пятна на внутренней стороне кожи в области введения препарата. Реакцию считали положительной, если указанная величина превышала 6 мм.

Постановка реакции ГЗТ предполагала однократное внутрижелудочное введение тестируемого соединения и плацебо с выявлением сенсибилизации через 5 сут путём инъекции субстанции анализируемого вещества в разрешающей концентрации под плантарный апоневроз тазовой конечности. Через 24 ч после введения животных эвтаназировали, тазовые конечности отсекали по уровню тарзотибиального сустава, взвешивали и определяли индекс реакции, характеризующий величину отёка, по которой можно сделать заключение об интенсивности развития ГЗТ [6].

Исследование иммунотоксического действия осуществляли также в 3 тестах. Влияние на гуморальный

иммунный ответ определяли по анализу титра антител (АТ) в ответ на инъекцию суспензии эритроцитов барана (ЭБ). Данную суспензию вводили внутривентриально для иммунизации, через 7 сут после этого проводили оценку титра АТ в сыворотке крови.

Анализ клеточного иммунного ответа оценивали в реакции ГЗТ к гаптену динитрохлорбензолу (ДНХБ). Экспериментальных животных иммунизировали 2% раствором этого вещества подкожно в межлопаточную область. Затем через 5 сут иммунизированным мышам под апоневроз задней конечности вводили 0,1% раствор ДНХБ. Спустя 1 сут после разрешающей инъекции животных эвтаназировали, тазовые конечности отсекали по тарзотибиальному суставу и далее определяли индекс реакции по разнице массы исследуемой и контрольной (интактной) конечностей.

Оценку неспецифического звена иммунитета выполняли по поглощению перитонеальными макрофагами мышей частиц латекса, меченных флуоресцентным красителем FITC (fluorescein isothiocyanate) («ThermoFisher Scientific», США). Для выделения макрофагов мышам однократно внутривентриально вводили 3% тиогликолевую среду; через 3 сут проводили забор перитонеального экссудата. Расчёт индекса фагоцитарной активности осуществляли по поглощению макрофагами латексных частиц диаметром 1 мкм, конъюгированных с FITC.

В соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г. всех животных эвтаназировали помещением в CO₂-камеру в условиях постепенного заполнения её диоксидом углерода. Данный вид эвтаназии сопровождается минимальной степенью болевых ощущений, страдания и выраженности дистресса.

Результаты обрабатывали статистически в программном обеспечении Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для оценки показателей применяли параметрические и непараметрические методы анализа в зависимости от типа распределения данных. Определяли среднее значение (M), статистическую ошибку среднего значения (m), медиану (Me), межквартильный интервал ($Q1$; $Q3$). С целью обработки результатов с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (analysis of variance, ANOVA), а также дисперсионный анализ с повторными измерениями и последующим межгрупповым сравнением при помощи теста Тьюки. Для показателей, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Краскела–Уоллиса с дальнейшим межгрупповым сравнением средних рангов. Различия определяли как достоверные при уровне значимости (p), равном 0,05.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов по изучению репродуктивной токсичности (влияние на генеративную функцию) показано, что тестируемое соединение на осно-

ве субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил не оказывало отрицательного воздействия на генеративную функцию самцов и самок аутобредных крыс при многократном внутривенном введении. Данный препарат в 2 исследованных дозах (1 и 10 ТД) не ухудшал оплодотворяющую способность самцов и плодовитость самок этих животных, не влиял на строение и функционирование репродуктивной системы у особей обоих полов (рис. 2). Кроме того, не установлено эмбрио- и фетотоксического действия препарата, а также отрицательного влияния на пред- и постимплантационную смертность. Наконец, не выявлено его негативного воздействия на физическое и зоопсихологическое развитие потомства.

При оценке эмбрио- и фетотоксического действия ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил показано отсутствие негативного воздействия на общее состояние беременных са-

мок крыс, эмбрио-, фетотоксических и тератогенных свойств (рис. 3), а также отрицательного влияния на пред- и постимплантационную смертность. Тестируемый препарат не вызвал увеличения уровня смертности потомства, а также не влиял на физическое и зоопсихологическое развитие выживших детёнышей.

По результатам оценки генотоксического действия изучаемое вещество в дозах 1 и 10 ТД не обладало мутагенной активностью в микроядерном тесте в эритроцитах мышей. В группе негативного контроля показатели количества НХЭ и ПХЭ с микроядрами находились в пределах нормальных значений (1–2% с учётом погрешности измерений) [6, 9]. Межгрупповой анализ данных показал значимое увеличение содержания клеток с микроядрами, а также процентного соотношения ПХЭ/НХЭ у животных, получивших однократно внутривенно циклофосфамид, по сравнению с особями группы плацебо (табл. 1). Этот факт свидетельствует о корректной постановке эксперимен-

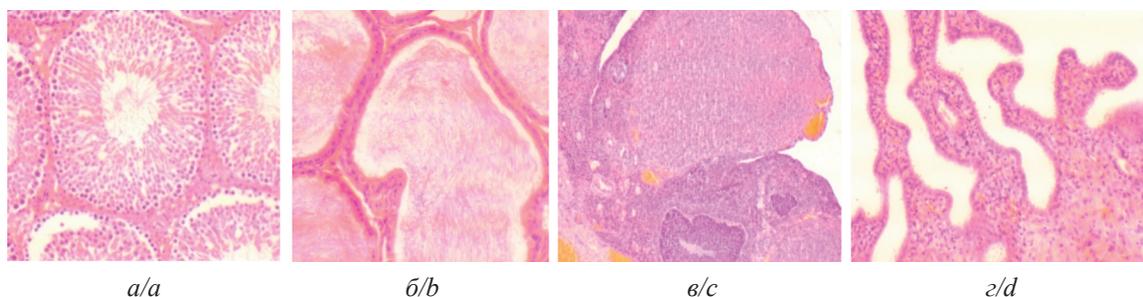


Рис. 2. Гистологические препараты репродуктивных органов крыс, получавших препарат на основе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в дозе 10 ТД.

a – срез семенника самца; *б* – срез придатка семенника самца; *в* – срез яичника самки (определяются преимущественно жёлтые тела); *г* – срез матки самки (картина эндометрия при беременности). Во всех образцах патологические изменения отсутствуют. Микрофотографии, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$ –100.

Fig. 2. Histological slides of the reproductive system of rats treated with the drug based on 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil at 10 TD dose.

a, section of a male testis; *b*, section of a male epididymis; *c*, section of a female ovary (predominantly yellow bodies); *d*, section of a female uterus (endometrium during pregnancy). Pathological changes are absent in all samples. Microphotographs, hematoxylin-eosin staining, magnification $\times 40$ –100.

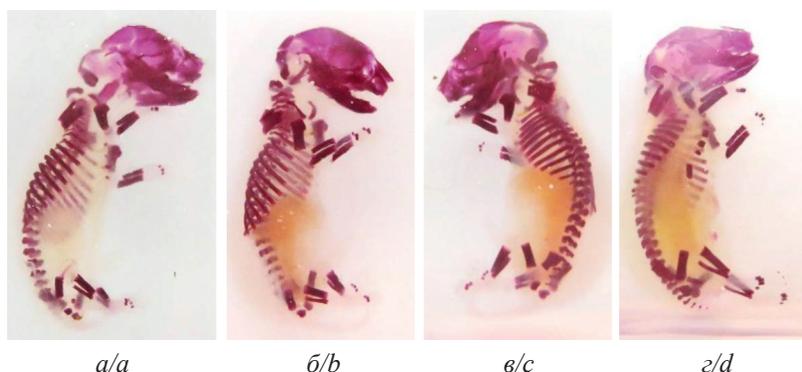


Рис. 3. Скелеты крысиных эмбрионов, окрашивание ализариновым красным.

a – интактная группа; *б* – группа плацебо; *в* – лекарственное средство на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в дозе 9 мг/кг; *г* – лекарственное средство на основе этой же субстанции в дозе 90 мг/кг. Существенные отличия между эмбрионами интактной и опытных групп, а также группы плацебо не установлены.

Pic. 3. Rat embryo skeletons, alizarin red staining.

a, intact group; *b*, placebo group; *c*, drug based on the 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil substance at dose 9 mg/kg; *d*, drug based on the same substance at dose 90 mg/kg. Significant differences between the embryos of the intact and experimental groups, as well as the placebo group, have not been observed.

та. Статистически значимых межгрупповых различий между животными, получавшими ЛС в обеих дозах, и входившими в группу плацебо не выявлено.

Результаты ДНК-комет-теста показали, что процентное содержание ДНК в хвосте комет клеток intactных животных и особей, получавших плацебо, не превышало $8,7 \pm 0,24\%$ и соответствовало внутрилабораторной норме для здоровых животных (в среднем 5–15%). Позитивный контроль ЭМС в дозе 200 мг/кг достоверно ($p < 0,05$) увеличивал этот показатель для клеток всех анализируемых органов. Полученные результаты для позитивного контроля также указывают на корректность проведения эксперимента (табл. 2). Межгрупповое сравнение данных с помощью критерия Тьюки показало отсутствие влияния тестируемого препарата в обеих дозах на величину содержания ДНК в хвосте комет ($p > 0,05$).

С целью подтверждения адекватности поставленной реакции в эксперимент по оценке аллергизирующих свойств для тестов РОА и АКА были включены группы контроля, особей которых сенсibilизировали раствором овальбумина. В результате в РОА у животных регистрировалось развитие умеренного анафилактического шока, шока тяжёлой степени и шока со смертельным исходом согласно анафилактическому индексу Вейгля. В группах морских свинок, сенсibilизированных тестируемым препаратом в исследуемых дозах и плацебо, не отмечено

признаков анафилактической реакции по индексу Вейгля после введения субстанции изучаемого ЛС в разрешающей дозе. В тесте АКА также зафиксирована реакция (большой размер окрашенных пятен) в контрольной группе с сенсibilизацией овальбумином. Применение препарата в анализируемых дозах, как и плацебо, не привело к развитию активной кожной анафилаксии у сенсibilизированных морских свинок (табл. 3).

В тесте ГЗТ в качестве контроля выступали особи, сенсibilизированные 2% раствором ДНХБ. У них отмечался достоверно более высокий индекс реакции по сравнению с получавшими тестируемый препарат и плацебо. Это подтверждает корректность выполненного теста и позволяет заключить, что однократное внутрижелудочное введение ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил не приводит к развитию ГЗТ у мышей (табл. 4).

Стандартным показателем активации гуморального иммунитета в ответ на введение антигена является продукция АТ В-лимфоцитами. В проведённом исследовании иммунизация мышей осуществлялась внутрибрюшинным введением модельного для иммунологических экспериментов антигена – ЭБ [6]. В результате поставленной реакции у животных развился гуморальный иммунный ответ. Установлено, что многократное внутрижелудочное введение тестируемого препарата в дозах 21 и 210 мг/кг соответственно

Таблица 1. Результаты теста учёта микроядер в эритроцитах периферической крови мышей после введения исследуемых веществ ($n = 10$)

Table 1. Results of micronucleus assay in the erythrocytes of peripheral blood of mice after administration of the test compounds ($n = 10$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Пол Sex	Соотношение ПХЭ/НХЭ, % ($M \pm m$) PCE/NCE ratio, % ($M \pm m$)	НХЭ с микроядрами, % ($M \pm m$) NCE with micronuclei, % ($M \pm m$)	ПХЭ с микроядрами, % ($M \pm m$) PCE with micronuclei, % ($M \pm m$)
Циклофосфамид (позитивный контроль) Cyclophosphamide (positive control)	50	Самцы Male	$7,6 \pm 0,53^*$	$7,3 \pm 0,91^*$	$7,0 \pm 0,72^*$
		Самки Female	$8,2 \pm 0,38^*$	$8,3 \pm 0,90^*$	$7,9 \pm 0,98^*$
Плацебо Placebo	–	Самцы Male	$1,0 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,17$	$2,3 \pm 0,30$
		Самки Female	$1,0 \pm 0,06$	$1,8 \pm 0,17$	$1,7 \pm 0,16$
Препарат на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси) этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil	21	Самцы Male	$1,2 \pm 0,07$	$1,3 \pm 0,21$	$1,3 \pm 0,16$
	Самки Female	$1,2 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,23$	$1,2 \pm 0,17$	
	210	Самцы Male	$1,2 \pm 0,05$	$1,3 \pm 0,14$	$1,0 \pm 0,12$
		Самки Female	$1,2 \pm 0,07$	$1,5 \pm 0,14$	$1,4 \pm 0,20$

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с группами животных негативного контроля (получавших плацебо) (ANOVA, критерий Тьюки); $p < 0,05$.

ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; НХЭ – нормохроматофильные эритроциты.

Note. *, the differences are statistically significant compared to the group of negative control animals (administered with placebo), ANOVA, Tukey's test; $p < 0.05$.

PCE, polychromatic erythrocytes; NCE, normochromatic erythrocytes.

Таблица 2. Результаты теста ДНК-комет ($n = 500$)

Table 2. Results of the DNA comet test ($n = 500$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Пол Sex	ДНК в хвосте комет, % ($M \pm m$) DNA in a comet's tail, % ($M \pm m$)				
			Костный мозг Bone marrow	Печень Liver	Почки Kidneys	Селезёнка Spleen	Головной мозг Brain
Интактные животные Intact animals	—	Самцы Male	7,7 ± 0,22	8,0 ± 0,22	8,0 ± 0,23	6,8 ± 0,18	7,6 ± 0,23
		Самки Female	7,2 ± 0,17	8,5 ± 0,25	7,9 ± 0,25	7,4 ± 0,20	7,9 ± 0,25
Этилметансульфонат Ethylmethanesulfonate	200	Самцы Male	39,7 ± 1,11*	35,6 ± 1,04*	36,2 ± 1,05*	51,8 ± 1,05*	42,6 ± 1,15*
		Самки Female	36,6 ± 1,13*	46,0 ± 1,09*	35,2 ± 1,10*	40,3 ± 1,16*	37,2 ± 1,12*
Плацебо Placebo	—	Самцы Male	7,4 ± 0,23	7,9 ± 0,22	7,8 ± 0,20	7,6 ± 0,19	7,6 ± 0,21
		Самки Female	7,8 ± 0,21	8,7 ± 0,24	8,0 ± 0,23	7,5 ± 0,21	7,4 ± 0,21
Препарат на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	9	Самцы Male	7,6 ± 0,22	7,7 ± 0,22	7,9 ± 0,23	7,4 ± 0,21	7,9 ± 0,21
		Самки Female	7,2 ± 0,18	9,1 ± 0,25	7,7 ± 0,19	7,1 ± 0,19	7,8 ± 0,23
	90	Самцы Male	7,2 ± 0,21	8,2 ± 0,23	8,1 ± 0,22	7,8 ± 0,21	7,4 ± 0,18
		Самки Female	7,8 ± 0,22	7,4 ± 0,21	8,4 ± 0,22	7,8 ± 0,21	7,5 ± 0,24

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с группами животных негативного контроля (получавших плацебо) (критерий Тьюки); $p < 0,05$.

Note. *, the differences are statistically significant compared to the group of negative control animals (administered with placebo), Tukey's test; $p < 0.05$.

Таблица 4. Результаты теста реакции гиперчувствительности замедленного типа на самцах и самках мышей ($n = 10$)

Table 4. Results of the test of delayed-type hypersensitivity reaction on the mice male and female ($n = 10$)

Сенсибилизация (агент) Sensitization (compound)	Доза Dose	Разрешение (агент) Provocation (agent)	Концентрация Concentration	Индекс реакции, % ($M \pm m$) Reaction index, % ($M \pm m$)	
				Самцы Male	Самки Female
2% раствор динитрохлорбензола 2% dinitrochlorobenzene solution	4 мг на мышшь в объёме 0,2 мл на мышшь 4 mg per mouse in a volume of 0.2 ml per mouse	Динитрохлорбензол Dinitrochlorobenzene	0,1% раствор, 1 мг/мл в объёме 50 мкл на мышшь 0.1% solution, 1 mg/ml in 50 µl per mouse	14,1 ± 1,34	16,9 ± 0,59
Плацебо Placebo	—	Субстанция 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	0,1 мг/мл в объёме 50 мкл 0.1 mg/ml in a volume of 50 µl	3,5 ± 0,79*	2,5 ± 0,21*
Лекарственное средство на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	21 мг/кг 21 mg/kg			3,0 ± 0,85*	3,4 ± 0,45*
	210 мг/кг 210 mg/kg			4,6 ± 0,90*	4,2 ± 0,46*

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших 2% раствор динитрохлорбензола (ANOVA, критерий Тьюки); $p < 0,05$.

Note. *, the differences are statistically significant compared to the group of animals treated with 2% dinitrochlorobenzene solution, ANOVA, Tukey's test; $p < 0.05$.

Таблица 5. Результаты оценки иммунного ответа самцов и самок мышей линии BALB/c при внутрижелудочном введении субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в 3 тестах ($n = 10$)Table 5. Results of assessing the immune response of male and female BALB/c mice after intragastric administration of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil substance in three tests ($n = 10$)

Агент Compound	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Титр антител к эритроцитам барана (log ₂ n), Me (Q1; Q3) Titer of antibodies to sheep erythrocytes (log ₂ n), Me (Q1; Q3)		Индекс реакции, % ($M \pm m$) Reaction index, % ($M \pm m$)		Индекс фагоцитарной активности ($M \pm m$) Phagocytic activity index ($M \pm m$)	
		Самцы Male	Самки Female	Самцы Male	Самки Female	Самцы Male	Самки Female
Плацебо Placebo	–	7,0 (7,0; 8,0)	7,0 (7,0; 8,0)	40,0 ± 1,6	40,0 ± 2,0	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
Лекарственное средство на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	21	7,0 (7,0; 8,0)	7,0 (7,0; 8,0)	42,0 ± 2,2	37,0 ± 1,7	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1
	210	7,5 (7,0; 8,0)	7,5 (7,0; 8,0)	39,0 ± 2,2	35,0 ± 1,6	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,1

и плацебо не повлияло на титр АТ и формирование гуморального иммунного ответа (табл. 5).

Согласно данным статистического анализа плацебо и изучаемый препарат при курсовом внутрижелудочном введении в дозах 1 и 10 ТД не влияли на развитие неспецифических иммунологических реакций у мышей линии BALB/c (как самцов, так и самок) в тесте по определению фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов с помощью флуоресцентной микроскопии, а также с использованием конъюгированных с FITC частиц латекса диаметром 1 мкм. Не отмечено также воздействия ЛС на основе субстанции на формирование клеточного иммунного ответа у самцов и самок этих животных (табл. 5).

Заключение

По результатам исследований репродуктивной токсичности установлено, что ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил не оказало негативного влияния на генеративную функцию самцов и самок аутбредных крыс и их потомство при многократном внутрижелудочном введении до спаривания. Кроме того, препарат не имел эмбрио-, фетотоксического и тератогенного действия при указанном характере введения самкам в период беременности.

На основании изучения генотоксических свойств (тест учёта микроядер в эритроцитах крови мышей), а также данных ДНК-комет-теста можно констатировать отсутствие в эксперименте генотоксических и канцерогенных свойств у препарата, предназначенного для лечения инфекции ВИЧ. У данного ЛС отсутствовали также сенсibilизирующие свойства. Препарат не влиял на формирование гуморального, неспецифического и клеточного иммунитета лабораторных моделей.

Поскольку в клинической практике АРТ назначается для пожизненного приёма, крайне важным представляется доказанное отсутствие у анти-ВИЧ-препаратов репродуктивной токсичности, аллергизирующих,

генотоксических свойств и канцерогенного потенциала. Установленный в ходе изучения специфической токсичности благоприятный профиль безопасности ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил позволяет рассматривать его в качестве перспективного терапевтического кандидата, предназначенного для лечения вызванной ВИЧ-1 инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВИЧ/СПИД в мире. Available at: <http://aids-centr.perm.ru/Статистика/ВИЧ/СПИД-в-мире> (accessed August 8, 2021).
2. Озеров А.А. Пиримидиновые нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 – история разработки и перспективы. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2012; (3): 10–7.
3. Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Temburnikar K., et al. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19(19): 5794–802.
4. Озеров А.А., Новиков М.С., Луганченко А.И., Хартман Т., Бухайт Р.У. Новые N-[2-(Бензоилфенокси)этил]производные нуклеиновых оснований – синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro*. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2012; (4): 15–8.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.
6. Миронов А.Н., ред. *Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств*. М.; 2012.
7. OECD Guidelines for testing of chemicals. Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en (accessed August 8, 2021).
8. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-415-one-generation-reproduction-toxicity-study_9789264070844-en (accessed August 8, 2021).
9. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus test. Available at: <https://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.htm> (accessed August 8, 2021).
10. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en (accessed August 8, 2021).

11. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol.* 1960; 85: 469–77.

REFERENCES

- HIV/AIDS in the world [VICH/SPID v mire]. Available at: <http://aids-centr.perm.ru/Статистика/ВИЧ/СПИД-в-мире> (accessed August 8, 2021). (in Russian)
- Ozerov A.A. Pyrimidine non-nucleoside HIV-1 Inhibitors: history of their development and perspectives [Pirimidinovye nenukleozidnye inhibitory obratnoy transkriptazy VICH-1 – istoriya razrabotki i perspektivy]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2012; (3): 10–7. (in Russian)
- Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Temburnikar K., et al. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19(19): 5794–802.
- Ozerov A.A., Novikov M.S., Luganchenko A.I., Khartman T., Bukkhayt R.U. New N-[2-(Benzoylphenoxy)ethyl] derivatives of nucleic bases – synthesis and anti-HIV-1 activity *in vitro* [Novye N-[2-(Benzoilfenoksi)etil]proizvodnye nukleinykh osnovaniy – sintez i anti-VICH-1 aktivnost' *in vitro*]. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2012; (4): 15–8. (in Russian)
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union.* 20.10.2010. I. 276/33–79. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> (accessed August 8, 2021).
- Mironov A.N., ed. *Guide to Preclinical Research of Medicines [Rukovodstvo po doklinicheskim issledovaniyam lekarstvennykh sredstv]*. Moscow; 2012. (In Russian)
- OECD Guidelines for testing of chemicals. Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en (accessed August 8, 2021).
- OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No.415: One-Generation Reproduction Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-415-one-generation-reproduction-toxicity-study_9789264070844-en (accessed August 8, 2021).
- OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus test. Available at: <https://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.htm> (accessed August 8, 2021).
- OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en (accessed August 8, 2021).
- Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol.* 1960; 85: 469–77.