

На правах рукописи

Мазурков Олег Юрьевич

**Противовирусная активность, безвредность и биодоступность
субстанции кандидатного противоопухолевого препарата НИОХ-14**

03.02.02 – вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2020

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Шишкина Лариса Николаевна, доктор биологических наук, заведующая отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: Евстропов Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России

Бабкин Игорь Викторович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск

Защита состоится «25» декабря 2020 г. в 9-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

И.о. ученый секретарь
диссертационного совета

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. На протяжении веков эпидемии «черной» (натуральной) оспы унесли в общей сложности жизни около полумиллиарда человек - больше, чем все прочие эпидемии вместе взятые. В результате проведения и успешного завершения программы глобальной ликвидации оспы под эгидой Всемирной организации здравоохранения удалось не только поставить под жесткий контроль, но и полностью элиминировать это инфекционное заболевание на Земле, и в связи с этим всеобщая вакцинация от оспы была отменена в 1980 году [Маренникова С.С., Щелкунов С.Н., 1998].

Однако в 21-м веке на фоне отсутствия у большей части людей планеты Земля иммунитета против оспы и других ортопоксвирусных инфекций сохраняется опасность возникновения вспышек этих заболеваний. Более того, есть основания опасаться повторного внедрения вируса натуральной оспы (ВНО)* в человеческую популяцию или его преднамеренного применения против людей [Anderson P.D., Bokor G., 2012]. Это может произойти из-за использования в биотеррористических целях искусственно созданного [Parker S. et al., 2012] или находящегося в нелегальных хранилищах ВНО [Henderson D.A. et al., 1999; Jahrling P.B. et al., 2005; Anderson P.D., Bokor G., 2012], а также по причине возможного выхода в циркуляцию сохранившего инфекционность ВНО при оттаивании грунтов вечной мерзлоты, в которых ранее осуществлялись захоронения погибших от оспы людей [Biagini P. et al., 2012; Herrlich A., 1960; McCollum A.M. et al., 2014].

Кроме того, существуют другие патогенные для человека ортопоксвирусы (вирус оспы обезьян - ВОО и вирус оспы коров - ВОК), которые способны заражать людей [Biagini P. et al., 2012; Damaso C.R. et al., 2000; Favier A.L. et al., 2011; Reed K.D. et al., 2004; Wienecke R. et al., 2000]. Хотя эти вирусы менее патогенны, чем ВНО, они могут вызывать серьезные заболевания и даже смерть людей [Favier A.L. et al., 2011; Reed K.D. et al., 2004].

Как известно к настоящему времени, во всем мире для лечения ортопоксвирусных инфекций у людей имеется единственный официально зарегистрированный в США препарат - Тековиримат (Tecovirimat, ТРОХХ), для создания которого использовали химическое соединение 4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид (ST-246) [FDA News Release, 2018].

В 2009 г. в Новосибирском институте органической химии Сибирского отделения Российской академии наук (НПОХ СО РАН) в сотрудничестве с ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора было синтезировано новое химическое соединение 7-[N`-(4-трифторметилбензоил)-гидразиноккарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (НПОХ-14), которое является близким аналогом ST-246 [Селиванов Б.А. и др., 2011]. Полученное соединение обладало сравнимой с ним активностью в отношении ортопоксвирусов и было рекомендовано нами в качестве субстанции для разработки отечественного противооспенного лекарственного средства [Селиванов Б.А. и др., 2011; Шишкина Л.Н. и др., 2015].

**Список сокращений приведен на обороте автореферата.*

В связи с этим изучение противовирусной эффективности химического соединения (субстанции) НИОХ-14, его влияния на показатели жизнедеятельности организма, а также характеристик его концентрации и распределения в тканях организма при введении лабораторным животным, является необходимым этапом при разработке эффективного противооспенного отечественного средства.

Степень разработанности. В 2005 году в США получено и описано химическое соединение ST-246, оказывающее антиортопоксвирусное действие [Yang G. et al., 2005]. Показано, что ST-246 проявляет противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов в первичных и перевиваемых культурах клеток животных и человека (*in vitro*), а также у различных видов модельных животных (*in vivo*) [Quenelle D.C. et al., 2007; Sbrana E. et al., 2007; Nalca A. et al., 2008; Huggins J. et al., 2009; Jordan R. et al., 2009; Jordan R. et al., 2008]. В экспериментах на различных животных (мышах, кроликах, нечеловекообразных обезьянах *супомолгус* была показана безвредность ST-246 [Chen Y. et al., 2011]. Кроме этого, при пероральном введении ST-246 обезьянам *супомолгус* оценена его биодоступность при дозах от 0,3 до 30 мг/кг, которые использовались в исследованиях эффективности. В целом, ST-246 обладал хорошей биодоступностью, варьирующей от 77 до 31 %, при введении мышам, кроликам и обезьянам [Chen Y. et al., 2011]. В июле 2018 г. после завершения доклинических и клинических исследований ST-246 администрация по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) зарегистрировала первый препарат, предназначенный для лечения натуральной оспы – Тековиримат (Tecovirimat, ТРОХХ), созданный на основе химического соединения ST-246 [FDA News Release, 2018].

Совместно с НИОХ СО РАН в 2009 году нами было получено новое химическое соединение НИОХ-14, являющееся аналогом ST-246, но обладающее патентной чистотой [Селиванов Б.А. и др., 2011; Шишкина Л.Н. и др., 2015].

При выполнении работ по программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 - 2014 годы) в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора были исследованы некоторые характеристики специфической активности химического соединения НИОХ-14 в отношении ортопоксвирусов. В результате этих научных исследований соединение НИОХ-14, проявившее высокую антиортопоксвирусную активность, было рекомендовано в качестве субстанции для создания отечественного противооспенного лекарственного средства. Поэтому более глубокое изучение свойств химического соединения (субстанции) НИОХ-14 в рамках доклинических исследований, в том числе его специфической активности, безвредности и биодоступности, является актуальным.

В связи с этим, в данной диссертационной работе были поставлены следующие цель и задачи исследования.

Цель исследования. Определить основные характеристики антиортопоксвирусной активности, безвредности и биодоступности в организме лабораторных животных химически синтезированного соединения НИОХ-14 (субстанции).

Задачи исследования:

1) изучить специфическую противовирусную активность химической субстанции НИОХ-14 при пероральном введении мышам, инфицированным вирусом экстремелии:

- провести оценку 50 %-х эффективных доз химической субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 *in vivo*;

- определить «терапевтическое окно» субстанции НИОХ-14, т.е. период времени, в течение которого введение препарата после инфицирования организма оказывается эффективным;

- исследовать влияние субстанции НИОХ-14 на продукцию вируса экстремелии в легких, слизистой носа, головном мозге, трахее, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе, а также на патоморфологическую структуру легких инфицированных мышей;

2) определить значения летальных доз и действие субстанции НИОХ-14 на основные гематологические и патоморфологические показатели лабораторных мышей и крыс при однократном и многократном введении;

3) провести исследование параметров биодоступности химического соединения НИОХ-14 (субстанция) в крови и органах лабораторных мышей:

- изучить тканевую доступность (f_T) субстанции НИОХ-14 для легких, селезенки, почек, печени, мозга мышей;

- провести оценку абсолютной биодоступности (F_{abs}) субстанции НИОХ-14 при пероральном и внутривенном введении мышам и сравнить с F_{abs} химического соединения ST-246.

Научная новизна работы. В данной работе в экспериментах на аутбредных мышах ICR, интраназально зараженных 100 %-й летальной дозой вируса экстремелии, впервые определены 50 %-е эффективные дозы химической субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 при их пероральном введении, а также определено «терапевтическое окно» для субстанции НИОХ-14.

Впервые показано, что химическая субстанция НИОХ-14 при её внутрижелудочном введении мышам относится к классу малоопасных веществ. Впервые показано отсутствие выраженного влияния однократного и многократного внутрижелудочного введения субстанции НИОХ-14 в дозе, в 3 раза превышающей терапевтическую, на гематологические показатели и микроскопическую картину внутренних органов лабораторных животных.

Впервые показано, что в растворителях, обычно используемых в масс-спектрометрии, а также в сыворотке крови, гомогенатах органов и в организме животных НИОХ-14 превращается в свой активный метаболит - ST-246 и вторичный метаболит К (4-трифторметил-бензойная кислота). То есть, НИОХ-14 является пролекарством и в организме превращается в свой активный метаболит - ST-246.

В экспериментах на мышах впервые определены и проанализированы основные фармакокинетические показатели метаболитов НИОХ-14 (субстанция): максимальная концентрация C_{max} (нг/мл); время достижения максимальной концентрации T_{max} (ч); время полувыведения $T_{1/2}$ (ч) и другие. Впервые определена тканевая доступность (f_T) субстанции НИОХ-14 при пероральном введении в дозе 50 мкг/г массы мыши, рассчитанная на основе показателей активного метаболита ST-246, для органов мышей, а именно: для легких $f_T = 100 \%$, для селезенки $f_T = 20 \%$, для почек $f_T = 63 \%$, для печени $f_T = 70 \%$, для мозга $f_T = 27 \%$.

Впервые определена абсолютная биодоступность (F_{abs}) субстанции НИОХ-14 при пероральном введении мышам в дозах 10 и 50 мкг/г массы, рассчитанная на основе показателей активного метаболита ST-246, которая составила 39,2 и 22,8 % соответственно и не отличалась от F_{abs} препарата сравнения ST-246 при том же режиме его применения.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость данной диссертационной работы заключается в том, что в процессе её выполнения, для достижения цели и задач нами была разработана и использована методология определения биодоступности химической субстанции НИОХ-14 на основе показателей концентрации её активного метаболита – ST-246 в организме млекопитающих. Данная методология базируется на полученной нами информации о превращении НИОХ-14 (субстанция) в свой активный метаболит ST-246 в растворителях, обычно используемых в масс-спектрометрии, а также в сыворотке крови, гомогенатах органов и в организме животных.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что в экспериментах на лабораторных животных изучена антиортопоксвирусная активность, безвредность и биодоступность химического соединения НИОХ-14, являющегося субстанцией для отечественного противооспенного препарата. Данное изучение проведено в рамках доклинического исследования химической субстанции НИОХ-14, основные результаты которого использованы в «Отчете о доклиническом изучении безвредности, специфической активности и фармакокинетики препарата НИОХ-14 (субстанция)» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Кроме того, разработанный способ определения параметров биодоступности субстанции НИОХ-14 на основе оценки показателей концентрации её активного метаболита ST-246 в дальнейшем будет использован для изучения фармакокинетики готовой лекарственной формы препарата НИОХ-14 в клинических испытаниях.

Методология и методы исследования. Методология данной диссертационной работы основана на исследовании функций химического соединения НИОХ-14 (субстанция) и биологических систем (хозяин или вирус) при их взаимодействии. Этапами данной методологии являются изучение влияния разрабатываемого медицинского препарата на системы хозяина или вируса и действия систем организма хозяина на медицинский препарат.

При оценке противовирусной активности химической субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 в отношении ортопоксвирусов *in vitro* в работе использовали модифицированный и адаптированный нами колориметрический метод определения оптической плотности раствора прижизненного красителя – нейтрального красного, поглощенного живыми клетками монослоя в лунках 96-луночных планшетов [Baker R.O. et al., 2003]. Изучение специфического действия субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 *in vivo* проводили в экспериментах на мышах аутбредной популяции ICR, инфицированных ВЭ (штамм К-1).

При исследовании влияния субстанции НИОХ-14 на системы хозяина и/или вируса в работе были применены современные традиционные вирусологические, культуральные, гематологические, гистологические и статистические методы исследований.

В процессе изучения биодоступности химического соединения НИОХ-14 (субстанция) у мышей была обоснована и предложена методология использования фармакокинетических параметров его активного метаболита ST-246 и вторичного метаболита К. Концентрацию метаболитов НИОХ-14 в сыворотке крови и гомогенатах органов мышей определяли методом LC-MS/MS (танDEMной масс-спектрометрии - MS/MS и жидкостной хроматографии - LC). Химическая субстанция НИОХ-14 не растворяется в воде и в растворителях, используемых в масс-спектрометрии (ацетонитрил, спирты). Для построения калибровочных кривых НИОХ-14 растворяется в 10 % ДМСО в ацетонитриле. В таком растворителе, а также в сыворотке крови, гомогенатах органов и в организме животных НИОХ-14 превращается в первичный (активный) метаболит - ST-246 и вторичный (неактивный) метаболит К. При этом уже

через 15 мин после внутривенного и 1 час после перорального введения мышам субстанции НИОХ-14 в крови не удается зарегистрировать пик, соответствующий НИОХ-14. Вследствие этого ST-246 может выступать в качестве активного продукта метаболизма НИОХ-14 и характеризовать его биодоступность в организме.

Таким образом, исследование биодоступности субстанции НИОХ-14 основано на изменении и построении зависимости концентрации активного метаболита ST-246 от времени и последующем расчете его фармакокинетических параметров в программе PKSolver.

Положения, выносимые на защиту:

1) субстанция НИОХ-14 проявляет высокую, сопоставимую с химическим соединением ST-246, противовирусную эффективность в экспериментах на аутбредных мышках ICR, интраназально зараженных вирусом экстремелии, судя по отсутствию достоверного отличия 50 %-х эффективных доз этих препаратов;

2) период начала ежедневного (в течение 10 суток) перорального введения субстанции НИОХ-14 для обеспечения наиболее эффективной, 100 %-й защиты животных от гибели составляет 4 суток после заражения мышей вирусом экстремелии;

3) при пероральном введении субстанция НИОХ-14 вызывает уменьшение доли погибших, увеличение средней продолжительности жизни, снижение продукции вируса в слизистой носа, трахее, легких, головном мозге, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе, а также уменьшение патоморфологических изменений в легких мышей, инфицированным вирусом экстремелии;

4) субстанция НИОХ-14 относится к классу малоопасных веществ и при однократном или многократном (в течение 30 суток) внутрижелудочном введении мышам и крысам не вызывает гибели, выраженных или длительно сохраняющихся изменений гематологических показателей, а также существенных патоморфологических изменений в тканях внутренних органов;

5) при однократном пероральном введении субстанция НИОХ-14 является биодоступной, о чем свидетельствуют показатели концентрации её активного метаболита ST-246 в крови и органах (легких, селезенке, почках, печени и мозге) мышей.

Степень достоверности и апробация результатов. Статистическую обработку и сравнение полученных в экспериментах данных проводили стандартными методами [Закс Л., 1976] с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., USA) [Статистический анализ данных Statistica 6, 2010], «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA), Origin 8.1 и Excel.

Результаты диссертационной работы были представлены на 12 российских и международных научных конференциях: 1) 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in Barcelona (Spain), 10-13 May 2014; 2) XII Межгосударственная научно-практическая конференция «Вклад государств-участников содружества независимых государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях», г. Саратов, 25-26 ноября 2014; 3) VI Российская (итоговая) научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Авиценна-2015», посвященная 80-летию образования Новосибирского государственного медицинского университета, г. Новосибирск, 16 апреля 2015; 4) VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», Новосибирск, 21–22 апреля 2015; 5) II Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio 2015», наукоград Кольцово, 1 октября 2015; 6) II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием

«Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 2 - 5 ноября 2015; 7) VII Российская (итоговая) научно-практическая конференция с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2016», г. Новосибирск, 14 апреля 2016; 8) Всероссийская научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», Новосибирск, 26-27 сентября 2016; 9) III Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio 2016», наукоград Кольцово, 5-6 октября 2016; 10) XI съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, г. Москва, 16–17 ноября 2017; 11) Восьмая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», г. Новосибирск, 16-18 октября 2018; 12) III Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, г. Ставрополь, 24-25 апреля 2019.

По материалам диссертации опубликовано 7 научных статей, из них 5 – в отечественных журналах из списка ВАК и 2 – в зарубежных изданиях, а также 13 тезисов в материалах конференций, сборниках научных трудов и других изданиях.

Личный вклад автора в диссертационную работу. Результаты данной диссертационной работы были получены, описаны и проанализированы лично Мазурковым О.Ю. под руководством д.б.н. Шишкиной Л.Н. Автор непосредственно участвовал в исследованиях противовирусной активности химической субстанции НИОХ-14 в сравнении с ST-246 в отношении ВОВ и ВЭ *in vitro* и *in vivo*, в изучении безвредности и биодоступности субстанции НИОХ-14, а также в подготовке образцов для патоморфологического изучения органов лабораторных животных. Все эксперименты были проведены лично автором при участии сотрудников отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю д.б.н. Шишкиной Л.Н. за помощь, оказанную при планировании и организации экспериментов, а также при обсуждении и анализе результатов данной диссертационной работы. Автор также благодарит всех сотрудников отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций: особенно Бормотова Н.И., Скарнович М.О., Серову О.А., Коптеву Е.А., инженеров и лаборантов, участвующих вместе с автором во всех экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Глубокую признательность и благодарность автор выражает сотрудникам ИМБТ – филиала ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под руководством к.б.н. Даниленко Е.Д. за исследования безвредности субстанции НИОХ-14 на лабораторных животных, Таранову О.С. за проведение гистологического изучения органов лабораторных животных, н.с. центра масс-спектрометрического анализа ФГБУН ИХБФМ СО РАН, к.х.н. Черноносову А.А. за плодотворное участие в изучении биодоступности НИОХ-14 и ST-246.

Результаты данной работы были получены при выполнении и финансовой поддержке Федеральной целевой программы (2009-2014 гг.) «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации».

Структура и объем работы. Данная диссертация изложена на 152 страницах, она содержит 35 рисунков и 32 таблицы. Состоит из основных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных исследований, обсуждения результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 143 источника, среди которых 16 отечественных и 127 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. В работе использовали химическое соединение НИОХ-14 (субстанция серии 4П), синтезированное в НИОХ СО РАН. НИОХ-14 не растворяется в воде и ацетонитриле, используемом для масс-спектрометрии. В ацетонитриле с 10 % диметилсульфоксида, а также в сыворотке крови, гомогенатах органов и в организме животных НИОХ-14 превращается в свой активный первичный метаболит - ST-246 и неактивный вторичный метаболит К, который также является продуктом метаболизма ST-246.

В качестве препарата сравнения и активного метаболита НИОХ-14 было использовано химическое соединение ST-246, синтезированное для исследовательских целей в НИОХ СО РАН по описанной методике [Bailey T.R., et al., 2007].

Клеточная культура. Для наработки вирусов и оценки противовирусной активности препаратов использовали перевиваемую культуру клеток почки взрослой африканской зеленой марышки (Vero), полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Вирусы. В экспериментах использовали вирусы осповакцины (штамм ЛИВП) и оспы мышей - экстремелии (штамм К-1), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Концентрацию вирусов определяли путем титрования методом бляшек в клетках Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в мл (\lg БОЕ/мл) [Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962; Закс Л., 1976; Virology Methods, 1996]. При этом значения титров вирусов были представлены, как $M \pm I_{95}$, где M – среднее значение, I_{95} – 95 %-й доверительный интервал. Концентрация вирусов в использованных в работе образцах составляла $6,65 \pm 0,05$ и $5,75 \pm 0,05 \lg$ БОЕ/мл.

Лабораторные животные. В работе использовали аутбредных мышей ICR и крыс линии Wistar, полученных из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Содержание животных и все манипуляции с ними осуществляли в соответствии с действующими «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР. 12.08.1977 г. № 755], «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» [Washington, D.C.: National Academy Press, 1996] и протоколом исследований на лабораторных животных, одобренным биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, № ИМБТ/5-07.12 от 13 июля 2012 года.

Определение цитотоксичности и противовирусной активности субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 *in vitro*. Цитотоксичность и противовирусную активность препаратов оценивали с помощью колориметрического метода определения оптической плотности (ОП) раствора красителя (нейтрального красного), поглощенного живыми клетками в монослое культуры Vero, полученном в лунках 96-луночных планшетов [Baker R.O. et al., 2003]. По показателям ОП рассчитывали 50 %-ю токсическую концентрацию (TC_{50} , в мкг/мл), 50 %-ю ингибирующую концентрацию (IC_{50} , в мкг/мл) и терапевтический индекс (ТИ) (или индекс селективности - SI) препарата: $TI (SI) = TC_{50} : IC_{50}$.

Оценка 50 %-х эффективных доз ($ЭД_{50}$) субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 при инфицировании мышей вирусом экстремелии (ВЭ). Суспензию препаратов вводили п/о один раз в сутки в дозах 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 и 0,78 мкг/г массы мыши через 1 ч и далее в течение 9 сут после

интраназального заражения мышей ВЭ в дозе 10 ЛД₅₀. За животными наблюдали в течение 21 сут после заражения (п/з) ВЭ, ежедневно регистрируя число павших мышей. По проценту гибели инфицированных животных в каждой группе, получавших НИОХ-14 и ST-246, рассчитывали величину ЭД₅₀ препаратов и 95 %-й доверительный интервал (I₉₅) по методу Спирмена-Кербера [Закс Л., 1976].

Определение периода «терапевтического окна» для субстанции НИОХ-14. Суспензию НИОХ-14 вводили п/о один раз в сутки в дозе 50 мкг/г массы мыши за 1 сут и за 1 ч до заражения (д/з), через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 сут п/з ВЭ, а далее введение продолжали в течение 9 сут после первого введения препарата. За животными наблюдали 21 сут п/з ВЭ, регистрировали падеж, рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей в каждой группе и определяли период начала введения препарата для достижения 100 %-й защиты животных от гибели.

Определение титров ВЭ в гомогенатах органов у инфицированных мышей при введении НИОХ-14. Через 6 сут после заражения мышей ВЭ в дозе 10 ЛД₅₀ и ежедневного п/о введения препаратов в дозе 50 мкг/г массы мыши у 4-х эвтаназированных мышей из каждой группы определяли концентрацию ВЭ (в lg БОЕ/мл) в сыворотке крови и 10 %-х гомогенатах органов (слизистая носа, трахея, легкие, мозг, печень, селезенка, почки и поджелудочная железа) методом подсчета бляшек при внесении последовательных разведений образцов на монослой культуры клеток Vero [Virology Methods, 1996].

Оценка влияния субстанции НИОХ-14 на морфологические изменения легких у мышей, инфицированных ВЭ. Образцы легких, взятые через 6 сут п/з мышей ВЭ в дозе 10 ЛД₅₀, фиксировали в 4 %-м растворе параформальдегида, обезжизняли в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали в смеси ксилола с парафином и заливали в парафиновые блоки и готовили срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Микроскопическое исследование и микрофотосъемка проводилась на микроскопе Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany), оснащенном камерой высокого разрешения HRC.

Изучение безвредности субстанции НИОХ-14. Для определения величин летальных доз суспензию НИОХ-14 вводили внутрижелудочно 6 самцам мышей в дозе 5 г/кг. За мышами наблюдали 7 суток и регистрировали их гибель. Для определения влияния субстанции при однократном применении её вводили 5 особям мышей и крыс каждого пола в/ж в дозе 150 мг/кг. В течение 14 суток после введения препарата проводили ежедневное визуальное наблюдение за животными, после чего мышей выводили из эксперимента мгновенной дислокацией шейных позвонков, а крыс декапитацией, у животных обоих видов забирали кровь для анализа. В образцах крови с помощью автоматического гематологического анализатора «Немолух 19» (КНР) определяли число лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит. Определение воздействия субстанции при многократном использовании проводили в экспериментах на крысах (самцах и самках). Субстанцию вводили в/ж в течение 30 дней ежедневно в двух дозах: 50 и 150 мг/кг. Через одни и 30 суток после окончания курса введения препарата животных выводили из эксперимента декапитацией, забирали кровь на анализ и образцы органов (печень, почки, желудок, легкие и другие) для гистологического исследования. Гистологические препараты готовили стандартными методами.

Изучение биодоступности субстанции НИОХ-14 у мышей. Дозы, схемы и способы введения препаратов НИОХ-14 и ST-246 аутбредным мышам ICR массой 12-14 и 18-20 г представлены в описаниях к рисункам 3-8. Концентрации активного метаболита ST-246 и вторичного метаболита К (в автореферате не представлены) определяли методом LC-MS/MS (тандемной масс-спектрометрии - MS/MS и

жидкостной хроматографии - LC) [Chen Y. et al., 2011; Yang G. et al., 2005] с использованием жидкостного хроматографа Agilent-1200 (Agilent Technologies, США) и масс-спектрометра Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies, США). В качестве внутреннего стандарта для построения калибровочных зависимостей использовали близкое по структуре стабильное соединение N-98.

Измерение концентрации ST-246 и метаболита К в сыворотке крови и 5 %-х гомогенатах органов (легких, селезенки, печени, почек и мозга) в экспериментах по оценке тканевой доступности (f_T) препарата при п/о введении субстанции НИОХ-14 проводили в режиме SRM (selected reaction monitoring) для ионов с m/z 375 (ST-246) и 337 (внутренний стандарт N-98). При определении абсолютной биодоступности (F_{abs}) субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 посредством их в/в и п/о введения масс-спектрометрический анализ проводили в режиме MRM (multiple reaction monitoring) с регистрацией переходов от иона предшественника к определенному иону-продукту: ST-246 m/z 375 \rightarrow 283, N-98 m/z 337 \rightarrow 245.

Рассчитывали основные фармакокинетические параметры субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 в сыворотке крови или гомогенатах органов: C_{max} - максимальная концентрация вещества; T_{max} - время достижения C_{max} ; $T_{1/2}$ - время полувыведения вещества; AUC_{0-inf} - (area under the curve) площадь под кривой изменения концентрации вещества в крови (органе) от 0 до ∞ ; f_T - тканевая доступность для органов, проникновение вещества в ткани по формуле $f_T = AUC_{0-inf-T} : AUC_{0-inf-S}$, где $AUC_{0-inf-T}$ - площадь под кривой «концентрация – время» от 0 до ∞ в ткани органа, $AUC_{0-inf-S}$ - площадь под кривой «концентрация – время» от 0 до ∞ в сыворотке крови; F_{abs} - абсолютная биодоступность, часть вещества, которая достигла системного кровотока после п/о относительно в/в введения, по формуле $F_{abs} = (AUC_{0-t \text{ п/о}} \times D_{в/в}) : (AUC_{0-t \text{ в/в}} \times D_{п/о})$, где $AUC_{0-t \text{ п/о}}$ и $AUC_{0-t \text{ в/в}}$ - площади под кривой «концентрация – время» от 0 до t (время полного исчезновения) в сыворотке крови при п/о и в/в введении; $D_{п/о}$ и $D_{в/в}$ – дозы препарата при п/о и в/в введении.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962; Закс Л., 1976] в программе «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) с оценкой достоверности отличий ($p \leq 0,05$) для 95 % доверительного уровня (I_{95}) [Статистический анализ данных Statistica 6, 2010]. Величины ЭД₅₀ рассчитывали и сравнивали по методу Спирмена-Кербера [Закс Л., 1976]. Показатели СПЖ мышей, титров вируса и концентрации метаболитов НИОХ-14 в исследуемых образцах представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm S_M$). В экспериментах по изучению действия субстанции НИОХ-14 на гематологические показатели организма статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – среднее значение и ошибку среднего ($M \pm m$). Нормальность распределения показателей проверяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Сравнение доли павших животных в группах проводили по критерию χ^2 , сравнение средних величин других показателей проводили с применением параметрического t -критерия Стьюдента и/или непараметрического U -критерия Манна-Уитни [Закс Л., 1976].

При изучении биодоступности субстанции НИОХ-14 статистическую обработку данных и построение графиков проводили в программах Origin 8.1 и Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ВОВ и ВЭ в экспериментах *in vitro*

Первоначально было проведено тестирование противовирусной активности субстанции НИОХ-14 (серия 4П) и препарата сравнения ST-246 в отношении ВОВ и ВЭ *in vitro*. При помощи компьютерной программы SoftMaxPro-4.0 для каждого соединения были рассчитаны TC_{50} и IC_{50} , а также: $TI (SI) = TC_{50} / IC_{50}$. Полученные показатели были сравнимы с предыдущими данными по исследованию цитотоксичности и активности химических соединений НИОХ-14 и ST-246 в отношении ортопоксвирусов [Кабанов А.С. и др., 2013].

Исследование специфической противовирусной активности химической субстанции НИОХ-14 в экспериментах на животных

Далее была проведена сравнительная оценка $ЭД_{50}$ субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246, вводимых перорально в разных дозах мышам, инфицированным ВЭ в дозе 10 ЛД₅₀/гол. Было показано, что НИОХ-14 и ST-246 при введении в дозах 12,5 мкг/г и выше достоверно повышают относительно контроля процент выживаемости и СПЖ зараженных ВЭ мышей в группах (табл. 1).

Таблица 1 – Противовирусная активность субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246, введенных в разных дозах мышам, инфицированным 10 ЛД₅₀ вируса экстремелии (ВЭ)

Группы мышей, получавших препараты	Доза препарата, мкг/г массы мыши	Показатели выживаемости мышей, зараженных 10 ЛД ₅₀ ВЭ			$ЭД_{50}$, мкг/г массы мыши
		Кол-во и % выживших	Коэффициент защиты (КЗ)	СПЖ (сут) $M \pm S_M$	
НИОХ-14, n=10 для каждой дозы препарата	100,0	10* (100)	100 %	21,0±0,0 ^{&}	3,59 (2,29 – 5,63) [^]
	50,0	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}	
	25,0	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}	
	12,5	8* (80)	80 %	19,7±2,98 ^{&}	
	6,25	7* (70)	70 %	17,9±5,30 ^{&}	
	3,12	6* (60)	60 %	16,8±5,59 ^{&}	
	1,56	2 (20)	20 %	12,7±4,76	
	0,78	0 (0)	0 %	9,8±2,30	
ST-246, n=10 для каждой дозы препарата	100,0	10* (100)	100 %	21,0±0,0 ^{&}	5,08 (3,04 – 8,48) [^]
	50,0	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}	
	25,0	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}	
	12,5	7* (70)	70 %	18,5±4,09 ^{&}	
	6,25	3 (30)	30 %	16,0±3,74 ^{&}	
	3,12	3 (30)	30 %	13,6±5,30	
	1,56	2 (20)	20 %	11,3±5,12	
	0,78	3 (30)	30 %	12,5±5,99	
Контроль ВЭ, n=10	-	0 (0)	-	10,2±2,78	-

Примечание: $ЭД_{50}$ - 50 %-я эффективная доза препаратов; [^] - доверительные интервалы, нет достоверных отличий по $ЭД_{50}$ препаратов НИОХ-14 и ST-246; коэффициент защиты (КЗ) = % гибели в контроле – % гибели в опыте; * - отличие от Контроля по критерию χ^2 при $p < 0,003$; [&] - отличие от Контроля по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,001$; СПЖ рассчитывали, принимая за максимальный срок жизни выживших животных 21 сут; М - среднее, S_M - стандартное отклонение; n - число животных в группе.

Установлено, что ЭД₅₀ субстанции НИОХ-14 (3,59 мкг/г массы мыши) и препарата сравнения ST-246 (5,08 мкг/г) достоверно не отличаются между собой (табл. 1). Как видно, по показателям ЭД₅₀ и СПЖ у мышей субстанция НИОХ-14 обладает сравнимой с ST-246 противовирусной эффективностью в отношении ВЭ.

После этого для субстанции НИОХ-14 проводили определение «терапевтического окна», т.е. периода времени, в течение которого введение препарата после инфицирования организма оказывается эффективным. Для определения «терапевтического окна» субстанцию НИОХ-14 использовали в дозе 50 мкг/г массы мыши при заражении мышей ВЭ в дозе 10 ЛД₅₀. Было показано, что если субстанцию НИОХ-14 начинали вводить мышам за 1 сут или за 1 ч до заражения (д/з) ВЭ, а также через 1, 2 и 4 сут после заражения (п/з) ВЭ и далее один раз в день в течение 9 сут, то выживаемость в этих группах мышей была 100 % (табл. 2).

Таблица 2 - Определение «терапевтического окна» субстанции НИОХ-14 в экспериментах на мышах, инфицированных вирусом экстремелии (ВЭ, штамм К-1) в дозе 10 ЛД₅₀

Группы мышей, получавших НИОХ-14	Показатели выживаемости мышей, зараженных 10 ЛД ₅₀ ВЭ		
	Количество и % выживших	Коэффициент защиты (КЗ)	СПЖ (сут) M±S _M
за 1 сут д/з, n=10	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}
за 1 ч д/з, n=10	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}
через 1 сут п/з, n=10	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}
через 2 сут п/з, n=10	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}
через 3 сут п/з, n=10	9* (90)	90 %	19,8±3,79 ^{&}
через 4 сут п/з, n=10	10* (100)	100 %	21,0±0,00 ^{&}
через 5 сут п/з, n=10	6* (60)	60 %	17,5±4,90 ^{&}
через 6 сут п/з, n=10	6* (60)	60 %	16,1±6,38
Контроль ВЭ, n=10	0 (0)	-	10,2±2,78

Примечание: коэффициент защиты (КЗ) = % гибели в контроле - % гибели в опыте; * - отличие от Контроля по критерию χ^2 при p<0,003; [&] - отличие от Контроля по U-критерию Манна-Уитни при p<0,001; СПЖ рассчитывали, принимая за максимальный срок жизни выживших животных 21 сут; M – среднее, S_M – стандартное отклонение; n – число животных в группе; д/з – до заражения; п/з – после заражения.

Введение субстанции НИОХ-14 через 3 сут п/з мышей ВЭ обеспечивало 90 %-ую выживаемость животных (табл. 2). Дальнейшее задерживание сроков начала введения субстанции НИОХ-14 до 5 и 6 сут после инфицирования животных ВЭ приводило к снижению их выживаемости до 60 %, хотя этот показатель все равно оставался достоверно выше, чем в контрольной группе (табл. 2). Через 7 сут после заражения ВЭ препарат не вводили, поскольку в это время всегда наблюдается пик гибели (≥ 50 %) мышей в контрольной группе.

Кроме того, через 6 сут п/з мышей ВЭ и ежедневного введения в течение 5 сут субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 в дозе 50 мкг/г массы в сыворотке крови и гомогенатах органов (слизистая носа, трахея, легкие, мозг, печень, селезенка, почки и поджелудочная железа) определяли титры ВЭ (в lg БОЕ/мл). Как видно из таблицы 3, применение субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 приводило к достоверному снижению продукции ВЭ в легких, слизистой носа и головном мозге, а также практически к полному его отсутствию в трахее, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе инфицированных мышей.

Таблица 3 - Титры ВЭ в органах у мышей через 6 сут после заражения в дозе 10 ЛД₅₀ при ежедневном введении субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 и в контроле

Органы мышей	Средние величины титров ВЭ (lg БОЕ/мл, $M \pm S_M$) в органах мышей, зараженных 10 ЛД ₅₀ ВЭ и получавших препараты		
	НИОХ-14, 50,0 мкг/г, n=4	ST-246, 50,0 мкг/г, n=4	Контроль ВЭ, n=4
Носовая полость	1,15±0,44*#	1,19±0,73*#	5,43±1,51
Трахея	0,60±0,26*#	0,60±0,26*#	2,44±0,45#
Легкие	4,85±0,39*	4,68±0,43*	6,18±0,46
Мозг	0,85±0,53*#	0,71±0,38*#	2,15±0,48#
Печень	0,60±0,26*#	0,73±0,40*#	4,61±0,91#
Селезенка	0,60±0,26*#	0,63±0,30*#	5,82±1,75
Почки	0,60±0,26*#	0,60±0,26*#	1,51±0,28#
Поджелудочная железа	0,60±0,26*#	0,60±0,26*#	3,03±0,80#

Примечание:* - отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента при $\leq 0,05$; # - отличие от титров ВЭ в легких в соответствующей группе животных по U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; M – среднее, S_M – стандартное отклонение; n – число животных. Титры ВЭ в органах определяли через 6 сут после заражения животных, накануне начала специфической гибели.

При микроскопическом исследовании структуры легких у мышей, инфицированных ВЭ, было установлено, что воспалительно-деструктивные явления при введении НИОХ-14 были выражены только у 2-х из 4-х мышей и значительно меньше, чем у всех 4-х мышей в контрольной группе.

Таким образом, в экспериментах на мышах аутбредной популяции ICR, инфицированных ВЭ, при оценке специфического противовирусного действия химической субстанции НИОХ-14 было обнаружено, что по показателю ЭД₅₀ субстанция НИОХ-14 проявляет активность, сравнимую с активностью ST-246. Период «терапевтического окна», когда начало применения НИОХ-14 обеспечивало 100 %-ую защиту мышей от гибели, составлял 4 сут после их заражения ВЭ. Кроме того, введение НИОХ-14 вызывало увеличение СПЖ, снижение титров вируса в носовой полости, трахее, легких, головном мозге, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе, а также улучшение структуры легких у мышей, инфицированных ВЭ.

Исследование влияния субстанции НИОХ-14 на показатели организма лабораторных животных

Согласно имеющимся литературным данным, аналог НИОХ-14, препарат ST-246 (Тековиримат), не вызывал гибели животных при введении в дозе 2 г/кг [SIGA Technologies Inc., 2018]. В эксперименте на лабораторных мышах было установлено, что субстанция НИОХ-14 может быть отнесена к классу малоопасных либо умеренно опасных соединений по классификации ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. ВРЕДНЫЕ ВЕЩЕСТВА. Классификация и общие требования безопасности». Показано, что однократное внутрижелудочное (в/ж) введение субстанции НИОХ-14 в дозе 5 г/кг не приводило к гибели мышей. В ходе осмотра в течение 7 сут не были обнаружены признаки интоксикации или снижения массы тела животных. Субстанция НИОХ-14 не вызывала каких-либо патоморфологических изменений в органах мышей через 7 сут после её однократного введения в дозе 5 г/кг.

В связи с тем, что величины летальных доз субстанции НИОХ-14 при в/ж введении определить не удалось, её безвредность в расширенных экспериментах на

мышьах и крысах исследовали с использованием в разовых дозах 50 и 150 мг/кг (в 3 раза больше, чем оптимальная эффективная доза, гарантирующая 100 %-ю защиту от гибели мышей, инфицированных ВЭ в дозе 10 ЛД₅₀).

Показано, что однократное введение субстанции НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг вызывало снижение числа лейкоцитов в крови самцов мышей (на 23 % относительно контрольной группы, получавшей в/ж физиологический раствор, $p \leq 0,05$) без изменения лейкоцитарной формулы. В опытной группе самок мышей отмечено повышение числа тромбоцитов (на 28 % относительно контроля при в/ж введении физиологического раствора, $p \leq 0,05$). При этом субстанция НИОХ-14 не влияла на число эритроцитов, содержание гемоглобина, показатели гематокрита и СОЭ в крови самцов и самок мышей. Каких-либо гематологических изменений у крыс, получавших субстанцию НИОХ-14 однократно в/ж в дозе 150 мг/кг массы, не наблюдалось.

Установлено, что многократное применение субстанции НИОХ-14 у крыс в дозах 50 и 150 мг/кг массы не оказывало существенного влияния на гематологические показатели у самцов и самок через 1 сут (табл. 4) и через 30 сут (данные не представлены) после прекращения введения препарата.

Таблица 4 - Показатели крови у крыс линии Wistar через 1 сутки после окончания внутрижелудочного введения субстанции НИОХ-14 один раз в день в течение 30 суток

Показатели крови	Группы крыс, препараты, доза							
	самцы				самки			
	1-й контроль	2-й контроль	НИОХ-14, мг/кг		1-й контроль	2-й контроль	НИОХ-14, мг/кг	
			50	150			50	150
Гемоглобин, г/л	144,8± 4,9	158,6± 2,1	144,3± 3,2	146,0± 2,6	144,4± 2,0	141,4± 1,3	146,3± 1,0	141,5± 2,9
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,0±0,2	7,6±0,2	7,0±0,1	6,9±0,2	6,7±0,2	6,7±0,1	6,9±0,1	6,7±0,1
Гематокрит, %	38,2± 1,3	42,3± 0,5	38,2± 0,9	38,1± 0,8	37,0± 0,7	37,6± 0,4	38,7± 0,3	37,4± 0,8
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	725±36	828±51	795±24	723±34	793±54	712±40	701±47	742±39
СОЭ, мм/ч	2,6±0,2	2,4±0,2	1,8±0,3	1,8±0,3	1,6±0,2	1,6±0,4	1,3±0,2	1,7±0,3
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	10,6±0,9	6,8±0,5	7,4±0,3	9,1±0,8	6,5±0,7	7,2±0,8	6,6±0,5	6,1±0,6
Эозинофилы, %	1,2±0,5	4,2±1,0	3,2±1,4	2,3±0,6	3,8±1,2	4,8±0,9	3,5±1,1	1,8±0,5
Моноциты, %	4,6±0,8	6,0±1,0	5,5±0,8	3,8±0,8	4,2±0,4	4,2±0,4	4,7±1,0	6,2±0,5
Лимфоциты, %	54,4± 3,7	43,2± 4,1	48,2± 4,0	54,7± 5,6	38,6± 5,2	49,2± 3,8	49,8± 3,0	46,0± 1,6
Нейтрофилы палочкоядерные, %	0,8±0,4	2,2±1,1	1,3±0,4	1,0±0,6	0,6±0,4	1,0±0,6	0,5±0,3	0,8±0,3
Нейтрофилы сегментоядерные, %	39,0± 3,4	44,4± 3,1	41,8± 2,8	38,2± 5,3	52,8± 4,7	40,8± 3,5	41,3± 4,0	45,2± 1,7
Примечание: 1-й контроль – группа крыс, которым вводили физиологический раствор; 2-й контроль – группа крыс, которым вводили раствор для приготовления суспензии препарата НИОХ-14, содержащий метилцеллюлозу (0,75 %) и твин-80 (1 %). Данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего (M±m); число животных в каждой группе = 5.								

При гистологическом исследовании печени самцов и самок крыс, которым вводили субстанцию НИОХ-14 в дозах 50 или 150 мг/кг массы 1 раз в день в течение

30 суток, обнаружены изменения, заключающиеся в неспецифических дистрофическо-некротических изменениях гепатоцитов. Эти изменения выявляются в обеих группах, получавших НИОХ-14, но наиболее отчетливо проявляются в группах животных обоих полов, получавших НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг.

Изменения в слизистой оболочке дна желудка, как у самцов, так и у самок заключались в отечности и мононуклеарной инфильтрации подслизистого слоя, увеличении секреции слизи, а также наличии единичных поверхностных эрозий. Данные проявления характеризуются как острый катаральный гастрит, развитие которого связано с длительным внутрижелудочным введением препарата. Следует подчеркнуть, что более выраженное проявление этой патологии наблюдается в опытной группе крыс, которым НИОХ-14 вводили в дозе 150 мг/кг массы.

При изучении гистологических препаратов желудка самок крыс были выявлены полнокровие слизистой оболочки желудка, отек и мононуклеарная инфильтрация его подслизистого слоя, а также умеренно выраженная очаговая десквамация поверхностного эпителия.

Кроме того, у двух самцов из обеих групп крыс, получавших НИОХ-14, отмечались изменения в слизистой оболочке дна желудка, выражающиеся в отечности и диффузной инфильтрации мононуклеарами подслизистой основы желудка, полнокровии слизистой оболочки желудка, признаках гиперсекреции желез и участках десквамации поверхностного эпителия. Эти изменения были более выраженными у животного из группы, получавшей НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг массы (рис. 1).

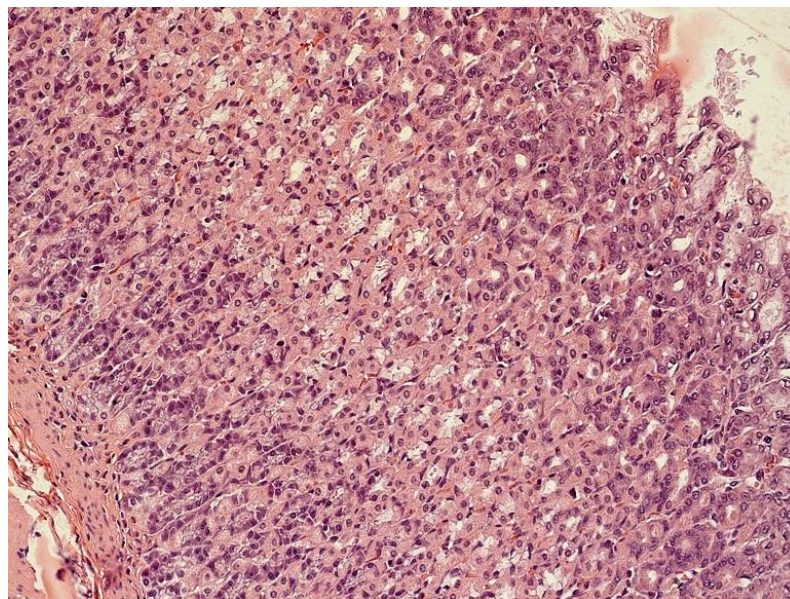


Рисунок 1 - Слизистая оболочка дна желудка самца крысы через 1 сут после окончания многократного введения субстанции НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг массы 1 раз в день в течение 30 сут. Отек подслизистого слоя, полиморфноклеточная инфильтрация собственной пластинки. Увеличение x200. Окраска гематоксилином и эозином.

Патологические изменения также коснулись мочевыделительной системы крыс, самцов (рис. 2) и самок (данные не приведены), которые проявились в дистрофическо-некротических изменениях эпителия коркового слоя почек. Эти изменения также в большей степени проявились у животных в группе, многократно получавшей НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг массы. Регистрировались признаки полнокровия коркового вещества почек, дистрофически-некротические изменения эпителия проксимальных канальцев в корковом веществе. Все перечисленные изменения наблюдались в обеих опытных группах, но наиболее отчетливо они были выражены в группе, многократно

получавшей НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг массы. В паренхиме почек крыс обеих опытных групп наблюдались нарушения микроциркуляции, венозное полнокровие и дистрофические изменения нефроцитов, степень выраженности которых была больше в опытной группе крыс, которым НИОХ-14 вводили в дозе 150 мг/кг. Характер выявленных нарушений дает основание заключить, что патологические изменения почек носят неспецифический характер и, скорее всего, связаны с раздражающим действием препарата в процессе его экскреции.

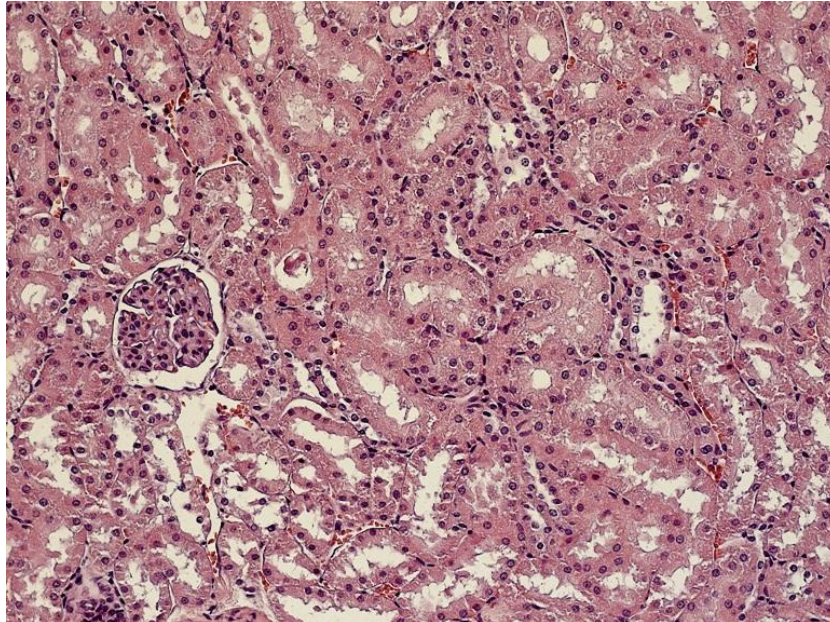


Рисунок 2 - Кортикальный слой почки самца крысы через 1 сут после окончания многократного введения субстанции НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг массы 1 раз в день в течение 30 сут. Полнокровие, дистрофические изменения эпителия проксимальных канальцев. Увеличение $\times 200$. Окраска гематоксилином и эозином.

Таким образом, при 30-дневном введении субстанции НИОХ-14 было обнаружено её влияние на гистологическую структуру печени, слизистой оболочки дна желудка и коркового слоя почек крыс. Все значимые патоморфологические изменения более выражено проявились в группе крыс, которые получали субстанцию НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг. Значительно меньшее влияние субстанции НИОХ-14 на гистологическую структуру печени, желудка и почек регистрировалось у единичных животных, которым её вводили в дозе 50 мг/кг массы крысы. Влияния субстанции НИОХ-14 на структуру других органов крыс (легкие, сердце, поджелудочная железа, селезенка, тимус, головной и спинной мозг, тонкий и толстый кишечник, мочевой пузырь, надпочечники) не было обнаружено при введении любой из используемых доз.

Исследование биодоступности химической субстанции НИОХ-14

Изучение биодоступности химической субстанции НИОХ-14 в виде его активного метаболита ST-246 в организме мышей проводили в два этапа.

На первом этапе определяли концентрации активного метаболита ST-246 в крови и органах мышей массой 12-14 г после п/о применения субстанции НИОХ-14 в трех различных схемах. На основании полученных данных рассчитывали тканевую доступность (f_T) субстанции НИОХ-14 для легких, печени, селезенки, головного мозга и почек этих лабораторных животных при её однократном п/о введении в дозе 50 мкг/г массы мыши.

На рисунках 3, 4, 5 и 6 представлены графики изменения концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови, тканях легких, почек и печени мышей при трех различных схемах п/о применения субстанции НИОХ-14 в зависимости от времени после прекращения её перорального введения.

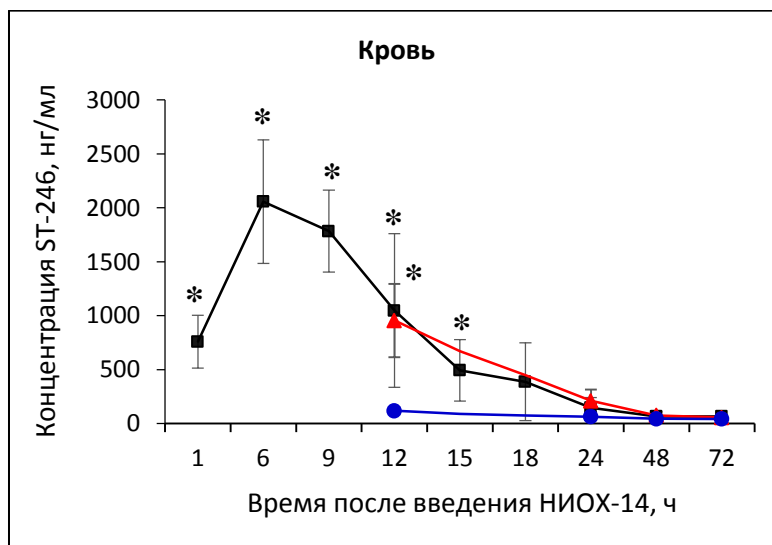


Рисунок 3 - Изменение концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей в зависимости от времени после прекращения перорального введения субстанции НИОХ-14. Однократное введение НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы (■). Введение НИОХ-14 по 50 мкг/г в течение 10 суток (▲). Введение НИОХ-14 по 5 мкг/г в течение 10 суток (●). Значения в каждой точке представлены как $M \pm S_M$. * - отличие от порогового уровня (50 нг/мл) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

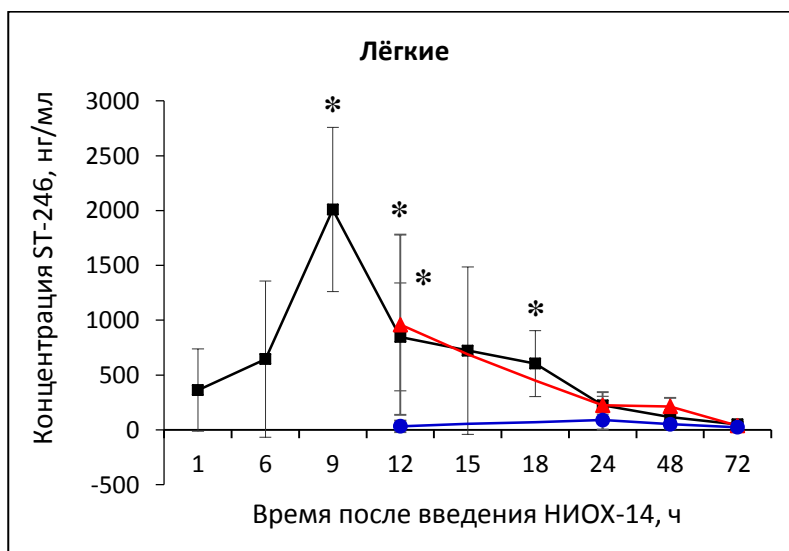


Рисунок 4 - Изменение концентрации активного метаболита ST-246 в ткани легких у мышей в зависимости от времени после прекращения введения субстанции НИОХ-14. Однократное введение НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы (■). Введение НИОХ-14 по 50 мкг/г в течение 10 суток (▲). Введение НИОХ-14 по 5 мкг/г в течение 10 суток (●). Значения в каждой точке представлены как $M \pm S_M$. * - отличие от порогового уровня (50 нг/мл) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Как видно из рисунков 3, 4, 5 и 6, при п/о введении субстанции НИОХ-14 в дозе 5 мкг/г массы мыши в течение 10 сут концентрация активного метаболита ST-246 в сыворотке крови, тканях легких, почек и печени не отличалась от порогового уровня (50 нг/мл) при данном способе определения методом LC-MS/MS.

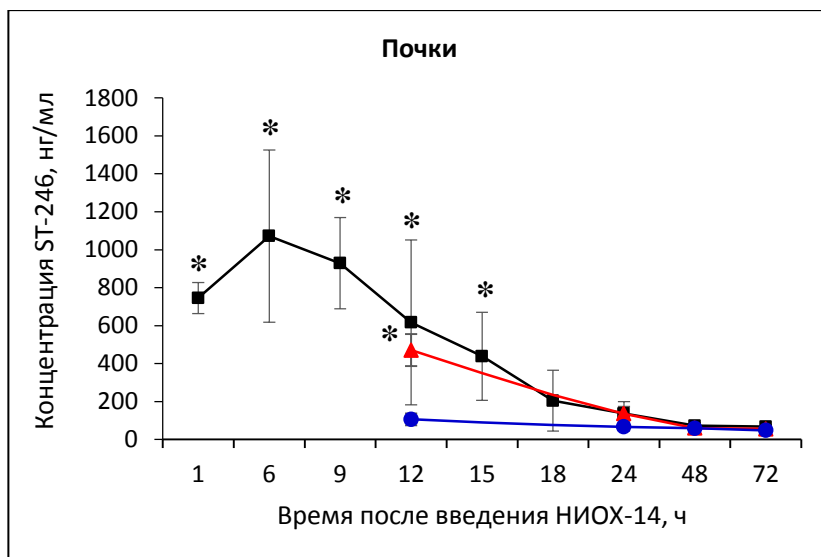


Рисунок 5 - Изменение концентрации активного метаболита ST-246 в ткани почек мышей в зависимости от времени после прекращения п/о введения субстанции НИОХ-14. Однократное введение НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы (■). Введение НИОХ-14 по 50 мкг/г в течение 10 суток (▲). Введение НИОХ-14 по 5 мкг/г в течение 10 суток (●). Значения в каждой точке представлены как $M \pm S_M$. * - отличие от порогового уровня (50 нг/мл) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

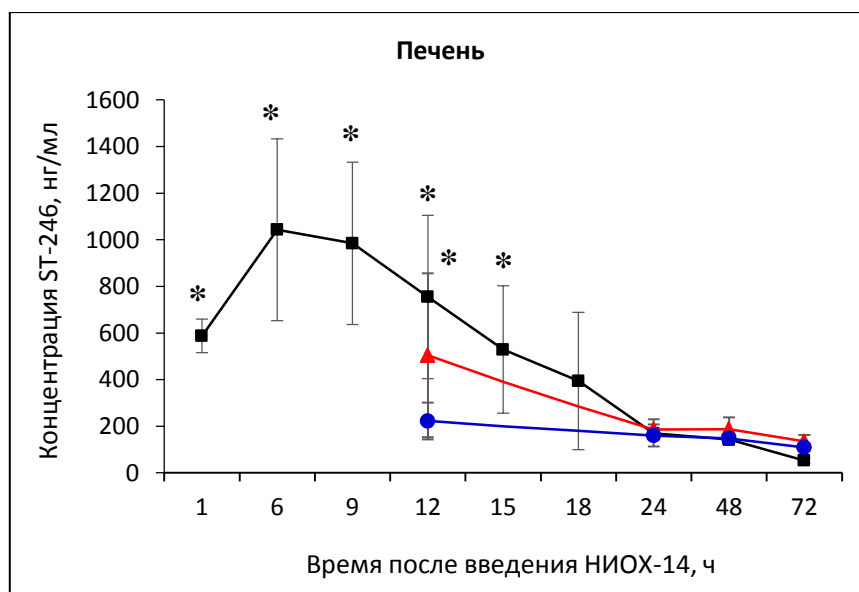


Рисунок 6 - Изменение концентрации активного метаболита ST-246 в ткани печени мышей в зависимости от времени после прекращения п/о введения субстанции НИОХ-14. Однократное введение НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы (■). Введение НИОХ-14 по 50 мкг/г в течение 10 суток (▲). Введение НИОХ-14 по 5 мкг/г в течение 10 суток (●). Значения в каждой точке представлены как $M \pm S_M$. * - отличие от порогового уровня (50 нг/мл) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Кроме того, п/о введение субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г в течение 10 сут не вызывало повышения концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови, тканях легких, почек и печени ни до (данные не представлены), ни через 12 ч и далее после прекращения введения субстанции НИОХ-14 относительно показателей, наблюдаемых при её однократном введении в дозе 50 мкг/г массы (рис. 3, 4, 5 и 6).

При этом после однократного п/о введения НИОХ-14 концентрация ST-246 достигала максимальных значений в крови, почках и печени через 6 ч, а легких – через 9 ч (рис. 3, 4, 5 и 6). В таблице 5 представлены рассчитанные итоговые фармакокинетические параметры активного метаболита ST-246 в сыворотке крови и органах мышей при однократном п/о применении субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы мыши. На основании полученных данных рассчитывали тканевую доступность (f_T) субстанции НИОХ-14 для тканей органов – % проникновения вещества из крови в ткани по формуле: $f_T = AUC_{0-inf-T} : AUC_{0-inf-S}$.

Таблица 5 - Фармакокинетические параметры активного метаболита ST-246 в сыворотке крови и органах мышей при однократном п/о применении субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы мыши

Параметры (размерность)	Сыворотка крови	Легкие	Печень	Селезенка	Мозг	Почки
$t_{1/2}$ (ч)	4,2	12,5	5,6	8,5	13,2	5,5
T_{max} (ч)	6	9	6	9	9	6
C_{max} (нг/мл)	2058± 641	2009± 1746	1043± 514	286± 158	252± 38	1072± 453
AUC_{0-t} (нг/мл)×ч	22666	21880	15026	3989	4277	13813
AUC_{0-inf} (нг/мл)×ч	23551	23972	16391	4786	6314	14910
f_T (%)	-	100	69,6	20,3	26,8	63,3
Примечание: C_{max} представлена как $M \pm S_M$, число животных n=6.						

Как видно из таблицы 5, тканевая доступность составляла для легких 100 %, для печени 69,6 %, для селезенки 20,3 %, для мозга 26,8 %, для почек 63,3 %.

Далее на втором этапе были проведены исследования концентраций активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей при п/о введении субстанции НИОХ-14 в дозах 10 и 50 мкг/г массы и препарата сравнения ST-246 при его п/о введении в дозе 50 мкг/г массы, а также при в/в введении обоих соединений в дозе 2 мкг/г массы мыши.

На рисунках 7 и 8 представлены графики изменения концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей в зависимости от времени после однократного в/в введения субстанции НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г массы (рис. 7) и после однократного п/о её введения в дозе 50 мкг/г массы (рис. 8).

В таблице 6 представлены рассчитанные итоговые фармакокинетические параметры активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей при однократном введении субстанции НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г массы внутривенно и в дозах 10 и 50 мкг/г массы перорально.

На основании полученных данных о концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей рассчитывали абсолютную биодоступность (F_{abs}) субстанции НИОХ-14 – часть лекарственного препарата, которая достигла системного кровотока по формуле: $F_{abs} = (AUC_{0-t \text{ п/о}} \times D_{в/в}) : (AUC_{0-t \text{ в/в}} \times D_{п/о})$ (табл. 6).

Было показано, что F_{abs} субстанции НИОХ-14 составляла 39,2 % при п/о введении в дозе 10 мкг/г массы мыши и 22,8 % при п/о введении в дозе 50 мкг/г массы мыши относительно в/в введения субстанции НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г массы (табл. 6).

В работе также были получены графики изменения концентрации препарата сравнения ST-246 в сыворотке крови мышей в зависимости от времени после

однократного в/в введения в дозе 2 мкг/г массы и однократного п/о введения в дозе 50 мкг/г массы (в автореферате не представлены).

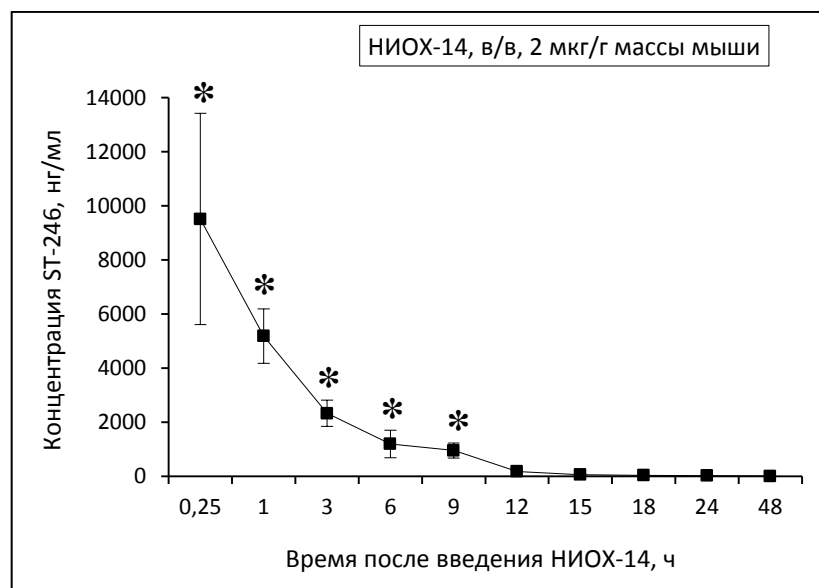


Рисунок 7 - Изменение концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей в зависимости от времени после однократного в/в введения субстанции НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г массы. Значения в каждой точке представлены как $M \pm S_M$. * - отличие от порогового уровня (20 нг/мл) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

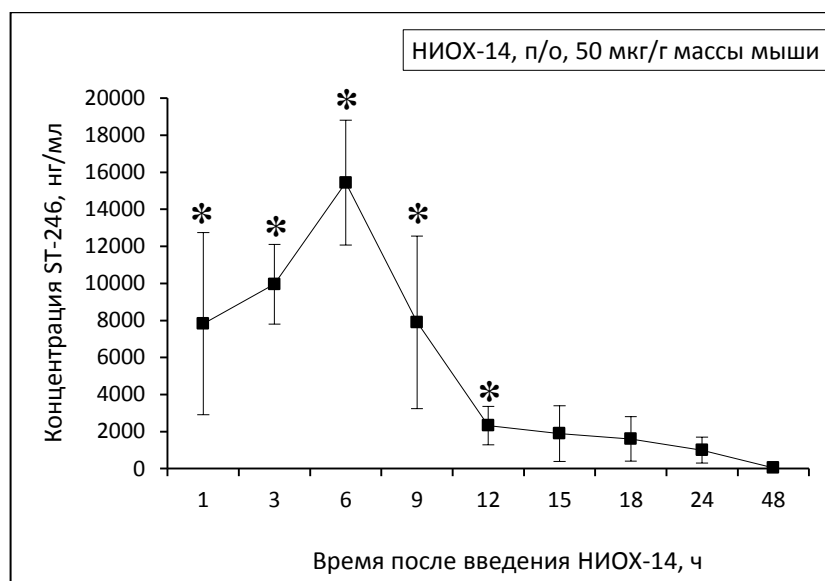


Рисунок 8 - Изменение концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей в зависимости от времени после однократного п/о введения субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы. Значения в каждой точке представлены как $M \pm S_M$. * - отличие от порогового уровня (20 нг/мл) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

В таблице 7 представлены рассчитанные итоговые фармакокинетические параметры препарата сравнения ST-246 в сыворотке крови мышей при его однократном введении в дозе 2 мкг/г массы внутривенно и в дозе 50 мкг/г массы перорально.

На основании фармакокинетических показателей препарата сравнения ST-246 в сыворотке крови мышей была рассчитана его F_{abs} по формуле: $(AUC_{0-t \text{ п/о}} \times D_{в/в}) : (AUC_{0-t \text{ в/в}} \times D_{п/о})$, которая составляла 12,1 % (табл. 7).

Таблица 6 - Фармакокинетические параметры активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей при однократном введении субстанции НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г массы внутривенно и в дозах 10 и 50 мкг/г массы перорально

Параметры (размерность)	Внутривенное введение (2 мкг/г)	Пероральное введение (10 мкг/г)	Пероральное введение (50 мкг/г)
$t_{1/2}$ (ч)	2,3	4,7	5,7
T_{max} (ч)	0,25	3	6
C_{max} (нг/мл)	9515±3903	5349±1428	15439±3373
AUC_{0-t} (нг/мл)×ч	24918	48848	141883
AUC_{0-inf} (нг/мл)×ч	25038	48912	142220
F_{abs} (%)	-	39,2	22,8
Примечание: C_{max} представлена как $M \pm S_M$, число животных n=6.			

Таблица 7 - Фармакокинетические параметры препарата сравнения ST-246 в сыворотке крови мышей при его однократном введении в дозе 2 мкг/г массы внутривенно и в дозе 50 мкг/г массы перорально

Параметры (размерность)	Внутривенное введение (2 мкг/г)	Пероральное введение (50 мкг/г)
$t_{1/2}$ (ч)	2,0	3,4
T_{max} (ч)	0,25	3
C_{max} (нг/мл)	13200±4287	15495±3227
AUC_{0-t} (нг/мл)×ч	34254	103661
AUC_{0-inf} (нг/мл)×ч	34318	105405
F_{abs} (%)	-	12,1
Примечание: C_{max} представлена как $M \pm S_M$, число животных n=6.		

Полученные данные о концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови мышей при п/о введении субстанции НИОХ-14 свидетельствуют о том, что её абсолютная биодоступность была не меньше, чем у препарата сравнения ST-246 при его п/о введении.

Таким образом, результаты, полученные при оценке тканевой доступности и абсолютной биодоступности химически синтезированной субстанции НИОХ-14, позволяют характеризовать её как биодоступную при п/о применении в экспериментах на мышах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изучена противовирусная активность, безвредность и биодоступность субстанции кандидатного противооспенного препарата НИОХ-14. В экспериментах на мышах, интраназально зараженных вирусом эктромелии, показано, что НИОХ-14 проявлял высокую, сопоставимую с ST-246, противооспенную эффективность, судя по показателям 50 %-х эффективных доз, увеличению средней продолжительности жизни, снижению титров вируса в органах и нормализации патоморфологической структуры легких у инфицированных мышей. Период наиболее эффективного применения – «терапевтического окна» НИОХ-14 составлял 4 суток после инфицирования мышей вирусом эктромелии. По своему влиянию на организм субстанция НИОХ-14 может быть отнесена к классу малоопасных соединений (по

ГОСТ 12.1.007-76), поскольку её однократное внутрижелудочное введение в дозе 5 г/кг не приводило к гибели лабораторных мышей и появлению признаков интоксикации или снижения массы тела животных. При однократном и многократном внутрижелудочном введении мышам и крысам субстанции НИОХ-14 не наблюдалось гибели животных и каких-либо критически выраженных изменений гематологических показателей, а также микроскопической картины внутренних органов животных. При изучении биодоступности субстанции НИОХ-14 на основе показателей концентрации её активного метаболита ST-246 у мышей было установлено наличие тканевой доступности для легких, селезенки, почек, печени и мозга, а также абсолютной биодоступности при пероральном введении.

Это позволяет сделать заключение, что химически синтезированная субстанция НИОХ-14 является эффективной в отношении ортопоксвирусов, безвредной и биодоступной при пероральном применении у лабораторных животных и может быть рекомендована для разработки пероральной лекарственной формы отечественного противооспенного препарата.

ВЫВОДЫ

1 В экспериментах на аутбредных мышах ICR, интраназально зараженных 100 %-й летальной дозой вируса эктромелии, показано, что 50 %-е эффективные дозы химической субстанции НИОХ-14 (3,59 мкг/г массы мыши) и препарата сравнения ST-246 (5,08 мкг/г) при их пероральном введении достоверно не отличались между собой.

2 Установлено, что «терапевтическое окно» – время начала ежедневного применения субстанции НИОХ-14 для эффективной защиты животных от гибели составляло от 4 сут до 6 сут после заражения вирусом эктромелии для достижения от 100 до 60 % выживаемости соответственно, достоверно отличающейся от контроля.

3 Применение субстанции НИОХ-14 и препарата сравнения ST-246 вызывало достоверное снижение продукции вируса в легких, слизистой носа, головном мозге, трахее, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе мышей, инфицированных вирусом эктромелии. Введение субстанции НИОХ-14 уменьшало микроскопические патологические изменения в легких у мышей при заражении вирусом эктромелии по сравнению с гистологической картиной в контрольной группе.

4 Химическая субстанция НИОХ-14 не вызывала гибели и признаков интоксикации при однократном внутрижелудочном введении в дозе 5 г/кг массы мышей. Однократное внутрижелудочное введение мышам и крысам субстанции НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг массы (в 3 раза выше, чем оптимальная эффективная доза) не оказывало существенного влияния на изменение гематологических показателей.

5 Внутрижелудочное введение крысам субстанции НИОХ-14 в дозах 50 и 150 мг/кг массы один раз в день в течение 30 суток не приводило к их гибели и появлению патоморфологических изменений в легких, сердце, поджелудочной железе, селезенке, тимусе, головном и спинном мозге, тонком и толстом кишечнике, мочевом пузыре и надпочечниках. При этом наблюдались патологические признаки в гистологической структуре тканей желудка, печени и почек, более выраженные после многократного введения НИОХ-14 в дозе 150 мг/кг массы крысы.

6 Тканевая доступность химической субстанции НИОХ-14 при пероральном применении в дозе 50 мкг/г массы мыши, рассчитанная на основании концентраций её активного метаболита ST-246, составляла для легких 100 %, для печени 69,6 %, для почек 63,3 %, для мозга 26,8 %, для селезенки 20,3 %.

7 Абсолютная биодоступность субстанции НИОХ-14 составляла 22,8 и 39,2 % при её пероральном введении в дозах 50 и 10 мкг/г массы мыши соответственно и не отличалась от данного показателя для препарата сравнения ST-246 при том же режиме его применения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1) **Мазурков О.Ю.**, Кабанов А.С., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Скарнович М.А., Серова О.А., Шишкина Л.Н. Фармакодинамика противооспенного химического соединения НИОХ-14 у мышей, инфицированных вирусом экстремелии // Медицина и образование в Сибири. - 2015. - № 3. - С. 91; Doi: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1799.

2) Кабанов А.С., Шишкина Л.Н., **Мазурков О.Ю.**, Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Серова О.А., Сергеев Ал.А., Сергеев Ар.А., Селиванов Б.А., Тихонов А.Я., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Оценка лечебно-профилактической эффективности химического соединения НИОХ-14 в отношении вируса экстремелии *in vivo* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - № 1. - С. 58-65.

3) **Mazurkov O.Yu.**, Kabanov A.S., Shishkina L.N., Sergeev Al.A., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Skarnovich M.A., Ovchinnikova A.S., Titova K.A., Galahova D.O., Bulychev L.Ye., Sergeev A.A., Taranov O.S., Selivanov B.A., Tikhonov A.Ya., Zavjalov E.L., Agafonov A.P., Sergeev A.N. The new effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14 // Journal of General Virology. - 2016. - N 97. - P. 1229-1239; Doi:10.1099/jgv.0.000422.

4) Селиванов Б.А., Тихонов А.Я., Беланов Е.Ф., Бормотов Н.И., Кабанов А.С., **Мазурков О.Ю.**, Серова О.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Синтез и противовирусная активность 1-арил-3-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло-[5.3.2.0^{2,6}.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}мочевин // Химико-фармацевтический журнал. - 2017. - Т. 51, № 6. - С. 13-17.

5) Селиванов Б.А., Бормотов Н.И., Шишкина Л.Н., Беланов Е.Ф., Серова О.А., Кабанов А.С., **Мазурков О.Ю.**, Тихонов А.Я. Синтез и противовирусная активность полициклических N-аминоимидов на основе 4-

оксатетрацикло[5.3.2.0^{2,6}0^{8,10}]додец-11-ен-3,5-диона // Химико-фармацевтический журнал. - 2018. - Т. 52, № 10. - С. 3-7. Doi: 10.30906/0023-1134-2018-52-10-3-7.

6) Selivanov B.A., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Belanov, E.F., Serova O.A., Kabanov A.S., **Mazurkov O.Yu.**, Tikhonov A.Ya. Synthesis and Antiviral Activity of Polycyclic N-Amidoimides Based on 4-Oxatetracyclo- [5.3.2.0(2,6).0(8,10)]Dodec-11-Ene-3,5-Dione // Pharmaceutical Chemistry Journal. - 2019. - V. 52, №10. - P. 820-824. Doi: 10.1007/s11094-019-1907-1909.

7) **Мазурков О.Ю.**, Шишкина Л.Н., Бормотов Н.И., Скарнович М.О., Мазуркова Н.А., Черноносков А.А., Тихонов А.Я., Селиванов Б.А. Оценка абсолютной биодоступности химической субстанции противоопухолевого препарата НИОХ-14 в экспериментах на мышах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2020. - Т. 170, № 8. - С. 173-177. Doi: <http://iramn.ru/journals/bbm/2020/8/5903/>.

Материалы конференций и тезисы докладов

По результатам диссертации опубликовано **13 тезисов докладов** в сборниках научных трудов, материалах конференций и других изданиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ	- бляшкообразующая единица
в/в	- внутривенно
в/ж	- внутрижелудочно
ВНО	- вирус натуральной оспы
ВОВ	- вирус осповакцины
ВОК	- вирус оспы коров
ВОО	- вирус оспы обезьян
ВЭ	- вирус экстремелии
д/з	- до заражения
ДМСО	- диметилсульфоксид
и/н	- интраназально
КЗ	- коэффициент защиты животных от гибели
ЛД ₅₀	- 50 %-я летальная доза
ОП	- оптическая плотность
п/з	- после заражения
п/о	- перорально
СОЭ	- скорость оседания эритроцитов
СПЖ	- средняя продолжительность жизни
ЭД ₅₀	- 50 %-я эффективная доза
AUC _{0-inf}	- (area under the curve) площадь под кривой «концентрация–время»:
AUC _{0-inf-S}	- в сыворотке крови (S) от 0 до ∞
AUC _{0-inf-T}	- в ткани органа (T) от 0 до ∞
AUC _{0-t}	- площадь под кривой «концентрация–время» от 0 до t, используемого в расчетах в крови (органе)
C _{max}	- максимальная концентрация вещества в крови (органе)
D _{в/в}	- доза препарата при в/в введении
D _{п/о}	- доза препарата при п/о введении
F _{abs}	- абсолютная биодоступность, часть вещества, достигшая системного кровотока после п/о относительно в/в введения
f _T	- тканевая доступность, % проникновение вещества в ткани
IC ₅₀	- 50 %-я ингибирующая концентрация препарата, при которой сохраняется 50 % клеток в инфицированном монослое
I ₉₅	- 95 %-й доверительный интервал
lg	- десятичный логарифм
M	- среднее значение
m	- стандартная ошибка среднего
n	- число повторов, число животных в группе
p	- вероятность ошибки, уровень значимости
SI (TI)	- индекс селективности (терапевтический индекс) препарата
S _M	- стандартное отклонение
TC ₅₀	- 50 %-я токсическая концентрация препарата, при которой разрушается 50 % клеток в неинфицированном монослое
T _{max}	- время достижения C _{max} в крови (органе)
T _{1/2}	- время полувыведения вещества
TI (SI)	- терапевтический индекс (индекс селективности) препарата