

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Московский научно-практический центр наркологии Департамента
здравоохранения города Москвы»

На правах рукописи

Скрябин Валентин Юрьевич

**Персонализированный подход к назначению диазепама у пациентов с
разными клиническими вариантами синдрома отмены алкоголя
(фармакогенетические и фармакокинетические аспекты)**

14.01.27 – Наркология

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук,
профессор Е. А. Брюн

Кандидат медицинских наук
М.С. Застрожин

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Условия проведения исследования	43
2.2. Дизайн исследования	43
2.2.1. Процедура набора исследуемой когорты пациентов	45
2.2.2. Обзор процедур исследования.....	46
2.3. Методы исследования.....	49
2.3.1. Описание применявшихся психометрических шкал.....	50
2.3.2. Оценка метаболической активности изофермента CYP3A4.....	52
2.3.3. Определение полиморфизмов CYP3A4*22, CYP3A5*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3 и CYP2C19*17.....	54
2.3.4. Определение уровня микро-РНК.....	56
2.3.5. Терапевтический лекарственный мониторинг	58
2.3.6. Статистическая обработка результатов	60
2.4. Материал исследования.....	62
2.5. Этические аспекты исследования.....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
3.1. Исследование взаимосвязи между клиническими вариантами СОА и показателями эффективности и безопасности терапии	67
3.1.1. Определение клинических вариантов СОА	67
3.1.2. Изучение ассоциации клинических вариантов СОА с тяжестью его проявлений, а также с показателями эффективности и безопасности терапии	69

3.2. Фармакогенетическое исследование эффективности и безопасности терапии диазепамом у пациентов с СОА.....	76
3.2.1. Изучение влияния полиморфизмов <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> и <i>CYP2C19*17</i> на эффективность и безопасность терапии диазепамом.....	76
3.2.2. Изучение влияния полиморфизма генов <i>CYP3A4*22</i> и <i>CYP3A5*3</i> на эффективность и безопасность терапии диазепамом.....	90
3.3. Влияние активности <i>CYP3A4</i> на показатели эффективности и безопасности диазепама у пациентов с СОА	100
3.3.1. Изучение зависимости показателей эффективности и безопасности терапии СОА от активности <i>CYP3A4</i>	100
3.4. Оценка эффективности и безопасности терапии диазепамом у пациентов с синдромом отмены алкоголя посредством определения концентрации плазменной микро-РНК <i>miR-27b</i>	108
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ.....	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126
ПРИЛОЖЕНИЯ	143

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

6-β-НС	6-β-гидрокортизол
ANOVA	дисперсионный анализ (от англ. analysis of variance)
CI	доверительный интервал (от англ. confidence interval)
CIWA-Ar	международная шкала оценки тяжести состояния отмены алкоголя Клинического института фонда исследования зависимостей, пересмотренная (англ. Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol scale, Revised)
CYP2C19	цитохром P450 2C19 (соответствующий ген обозначен курсивом)
CYP3A4	цитохром P450 3A4 (соответствующий ген обозначен курсивом)
CYP3A5	цитохром P450 3A5 (соответствующий ген обозначен курсивом)
HCV	вирусный гепатит С
M	медиана
Q1	1 квартиль (соответствует 25 процентиллю)
Q3	3 квартиль (соответствует 75 процентиллю)
rs	коэффициент корреляции Спирмена
UKU	шкала оценки побочного действия UKU (англ. UKU Side-Effect Rating Scale)
X	среднее арифметическое
σ	стандартное отклонение
АГ	артериальная гипертензия
АЛТ	аланинаминотрансфераза

АСТ	аспартатаминотрансфераза
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ВЭЖХ-МС/МС	высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ»	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский научно-практический центра наркологии Департамента здравоохранения города Москвы»
ГГТ	гамма-глутамилтрансфераза
д.б.н.	доктор биологических наук
д.м.н.	доктор медицинских наук
дл	децилитр
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
к.фарм.н.	кандидат фармацевтических наук
кг	килограмм
л	литр
ЛС	лекарственное средство
м	метр
м.н.с.	младший научный сотрудник
мг	миллиграмм
микро-РНК	микрорибонуклеиновая кислота
мин	минута
МКБ-10	Международная классификация болезней Десятого пересмотра

МКМОЛЬ	микромоль
мл	миллилитры
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
нг	нанограмм
НЛР	нежелательная лекарственная реакция
НПКО	нижний предел количественного определения
п.	пункт
ПАВ	психоактивное вещество
проф.	профессор
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
СОА	синдром отмены алкоголя
ТЛМ	терапевтический лекарственный мониторинг
ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

Как показывают недавно опубликованные в России и за рубежом эпидемиологические и социологические исследования, на сегодняшний день проблема злоупотребления алкоголем и алкогольной зависимости сохраняет свою актуальность (Кошкина Е.А. и др., 2016; 2019). Многочисленные негативные медицинские, социально-демографические, экономические и морально-этические последствия алкоголизма делают его одним из наиболее тяжёлых и опасных заболеваний для всего человечества (Кошкина Е.А. и др., 2009). По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в настоящее время алкоголь употребляют 2,3 миллиарда человек (World Health Organization, 2018). В России количество больных алкоголизмом и алкогольными психозами, зарегистрированных наркологической службой в 2017 г., составило 1502174 человека (1023,2 на 100 тысяч населения), что составляет 1% от общей численности населения страны (Киржанова В.В. и др., 2019).

По данным ВОЗ, в 2016 году злоупотребление алкоголем стало причиной смерти 3 миллионов человек, что составляет 5,3% от общего числа смертей, и превышает смертность от туберкулёза, ВИЧ/СПИДа и сахарного диабета (World Health Organization, 2018). Это означает, что каждый двадцатый случай смерти в мире был связан с употреблением алкоголя, причём, более трёх четвертей этих случаев произошли среди мужчин. По данным исследования «Глобальное бремя болезней» (Global Burden of Disease, GBD) за 2017 год, проведённого Институтом по измерению показателей здоровья и оценке состояния здоровья (IHME) при Вашингтонском университете, употребление алкоголя находится на четвёртом месте из всех факторов риска преждевременной смертности и инвалидности среди мужчин в мире (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2017). Проблема смертности, прямо или опосредованно вызванной употреблением алкоголя, актуальна и для Российской Федерации (Брюн Е.А. и др., 2018).

Синдром отмены алкоголя (СОА) представляет собой состояние, при котором пациенты, имеющие сформированный синдром зависимости от алкоголя, чаще всего обращаются к психиатру-наркологу за помощью (Иващенко Д.В. и др., 2016). Клинически СОА проявляется особым симптомокомплексом, объединяющим в себе разнообразные соматические, неврологические и психические расстройства, выраженность которых обычно индивидуальна (Шамов С.А., 2007), что позволяет выделять разные клинические варианты СОА. Классическое описание СОА приведено С.Г. Жислиным, выделившим три основных характерных признака: своеобразные расстройства настроения, нарушения сна и тремор (Жислин С.Г., 1965). В настоящее время в клинической практике чаще всего пользуются классификацией СОА по группам симптомов, преобладающих в клинической картине, с выделением четырёх основных вариантов: нейровегетативного, церебрального, висцерального и психопатологического (Иванец Н.Н., 1988); при этом, последний считается наиболее тяжелым и переходным к развитию алкогольного психоза (Гофман А.Г., 2012).

Существующие программы терапии СОА обязательно включают в себя бензодиазепиновые транквилизаторы, препаратом выбора среди которых является диазепам (Цыганков Б.Д. и др., 2013; Брюн Е.А. и др., 2018). С момента внедрения в клиническую практику, бензодиазепины входят в число наиболее часто назначаемых препаратов во всём мире (Арана Д., Розенбаум Д., 2006). Эти препараты обладают наилучшей доказательной базой эффективности и считаются «золотым стандартом» для лечения алкогольного абстинентного синдрома (Sachdeva A. et al., 2015). Фармакодинамика бензодиазепинов, являющихся агонистами ГАМК-рецепторов, сходна с механизмом действия алкоголя, что объясняет их эффект облегчения симптоматики (Olsen R.W., Liang J., 2017). Однако, несмотря на высокую частоту применения данных лекарственных средств в наркологической практике, подбор их дозировок чаще всего носит эмпирический характер. Согласно литературным данным, в ряде случаев

наблюдается отсутствие терапевтического эффекта на фоне применения возрастающих доз бензодиазепиновых транквилизаторов (Benedict N.J. et al., 2018). Перекрёстная толерантность к алкоголю и бензодиазепинам зачастую является причиной применения последних в высоких дозах (так, у 10-30% пациентов отмечается СОА, резистентный к лечению), что увеличивает риск развития нежелательных лекарственных реакций (НЛР) (Иващенко Д.В. и др., 2017). У пациентов, резистентных к бензодиазепинам при их назначении в терапевтических дозах, развиваются тяжёлые формы СОА (Hack J.B. et al., 2006; Sarff M., Gold J.A., 2010). Частота их возникновения неизвестна, но установлено, что у таких пациентов чаще возникает необходимость в проведении искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ), увеличивается продолжительность пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), а также увеличивается риск развития нозокомиальных инфекций (Gold J.A. et al., 2007; Sarff M., Gold J.A., 2010). В то же время, применение у этой когорты пациентов бензодиазепинов в дозировках, превышающих среднетерапевтические, может быть сопряжено с возникновением НЛР.

По сравнению с другими бензодиазепиновыми транквилизаторами, диазепам обладает такими преимуществами, как быстрое начало действия и высокая эффективность (Воронина Т.А., Середенин С.Б., 2002). Кроме того, его активный метаболит десметилдиазепам удлиняет период действия препарата, вследствие чего их концентрация снижается постепенно, и СОА протекает в более мягкой форме (Bird R.D., Makela E.H., 1994; Weintraub S.J., 2017). Возникновение у пациентов серьёзных НЛР на фоне терапии диазепамом наблюдается чрезвычайно редко и чаще всего является следствием его взаимодействия с другими лекарственными средствами. К числу наиболее часто возникающих умеренных нежелательных реакций относятся амнезия, головокружение, атаксия, спутанность сознания, седация, депрессия и тахикардия (Calcaterra N.E., Barrow J.C., 2014).

Известно, что клиническая эффективность препаратов из группы бензодиазепиновых транквилизаторов отличается у разных людей (Fukasawa T. et al., 2007). Это связано с тем, что активность указанных ферментов генетически детерминирована, и в зависимости от генотипа выделяют «медленных», «промежуточных» и «ультрабыстрых» метаболизаторов (Кукес В.Г. и др., 2015; Насырова Р.Ф. и др., 2015). Проведённые на сегодняшний день исследования выявили влияние полиморфизмов генов *CYP2C19* и *CYP3A4* на фармакокинетику бензодиазепиновых транквилизаторов (Yang T.J. et al., 1998; Fukasawa T. et al., 2005; Lepper E.R. et al., 2005; Oneda B. et al., 2009; Jose M. et al., 2016]. Хотя изофермент *CYP3A4* вовлечен в процесс метаболизма диазепама, имеющиеся результаты исследований влияния различных аллельных вариантов *CYP3A4* и *CYP3A5* на метаболизм диазепама являются противоречивыми (He P. et al., 2005; Maekawa K. et al., 2009). Эти данные делают перспективным изучение фармакогенетики диазепама, поиск клинических и генетических маркеров эффективности и безопасности его при различных вариантах СОА. Применение комплексного клинического и фармакогенетического исследования позволит прогнозировать эффективность и безопасность лечения пациентов с СОА.

Степень разработанности проблемы

Следует отметить, что в России ранее проводилось исследование, посвящённое разработке персонализированного подхода к предупреждению НЛР при назначении бензодиазепинов пациентам с СОА (Иващенко Д.В., 2017). Указанная работа включала две основные части: фармакоэпидемиологическую и фармакогенетическую, причём, последняя была сфокусирована на исследовании безопасности терапии, в то время как оценка эффективности лечения не выполнялась. В рамках фармакогенетической части указанного исследования не применялся терапевтический лекарственный мониторинг. Кроме того, в качестве исследуемого препарата автором был выбран бромдигидрохлорфенилбензодиазепин. Вероятно, это было обусловлено

включением диазепама в 2013 году в Список психотропных веществ, оборот которых в Российской Федерации ограничен и в отношении которых допускается исключение некоторых мер контроля в соответствии с законодательством Российской Федерации и международными договорами Российской Федерации (Список III). По этой же причине в течение последних лет отмечается дефицит оригинальных русскоязычных исследований, посвящённых изучению эффективности и безопасности диазепама.

В Российской Федерации диазепам в 2012 году включён в стандарты специализированной медицинской помощи при абстинентном состоянии, вызванном употреблением алкоголя, а в 2018 году – в клинические рекомендации «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением психоактивных веществ. Синдром отмены психоактивных веществ (абстинентное состояние, вызванное употреблением психоактивных веществ)».

В последние годы практически не проводилось исследований, посвящённых изучению различных клинических вариантов СОА. В 2015 году была опубликована работа, в рамках которой был проведён сравнительный количественный анализ траектории развития алкогольной зависимости у стационарных пациентов в группах с различной преобладающей компонентой алкогольного абстинентного синдрома (Кибитов А.О., Чупрова Н.А., 2015). В указанной публикации использовалась упрощённая классификация СОА с выделением трёх клинических вариантов (психопатологического, соматовегетативного и смешанного) и не оценивалась тяжесть проявлений СОА. По результатам этого исследования определены клинические признаки, которые могут использоваться для количественной оценки риска развития психопатологического варианта СОА. В основном фокус внимания авторов был направлен на процесс течения алкогольной зависимости и формирование клинических вариантов СОА, а не на клиническую оценку их проявлений.

В целом, на сегодняшний день фармакогенетика препаратов из группы бензодиазепиновых транквилизаторов мало изучена у пациентов с СОА, в России

ранее не проводилось фармакогенетических исследований диазепама. Вследствие этого, в настоящее время в отечественной наркологической практике существует проблема: несмотря на то, что диазепам является удобным для применения в клинической практике препаратом, который назначается большому количеству пациентов, проходящих стационарное лечение СОА, его применение осуществляется эмпирически, без использования персонализированного подхода, не установлены также прогностические критерии эффективности и безопасности терапии.

Цель исследования

Разработать персонализированный подход к терапии диазепамом пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Задачи исследования

1. Установить ассоциацию клинических вариантов СОА с тяжестью его проявлений.
2. Оценить эффективность и безопасность терапии диазепамом при его назначении пациентам с разными клиническими вариантами СОА.
3. Установить зависимость показателей эффективности и безопасности терапии СОА диазепамом от генетических полиморфизмов *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*17*, *CYP3A4*22* и *CYP3A5*3* ферментов, участвующих в биотрансформации препарата.
4. Установить влияние активности изофермента *CYP3A4*, участвующего в метаболизме диазепама, на показатели эффективности и безопасности психофармакотерапии.
5. Оценить взаимосвязь между активностью изофермента *CYP3A4* и показателем уровня плазменной концентрации микро-РНК *miR-27b* для прогнозирования индивидуального ответа пациентов на терапию диазепамом.

Научная новизна результатов исследования

Результаты проведенного диссертационного исследования сопоставимы с данными, опубликованными ранее (Застрожин М.С., 2016; Иващенко Д.В., 2017), но в отличие от них, в представленной работе научной новизной характеризуются следующие данные:

Впервые в России оценена эффективность и безопасность терапии диазепамом при его назначении пациентам с разными клиническими вариантами СОА.

Впервые в мире установлены частоты распределения аллелей и генотипов по полиморфным маркерам генов *CYP2C19* (681G>A, 636 G>A и -806C>T), *CYP3A4* (C>T intron 6) и *CYP3A5* (6986A>G) у пациентов с СОА и определено их влияние на показатели эффективности и безопасности терапии диазепамом.

Впервые в мире оценена взаимосвязь между показателями эффективности и безопасности диазепама и активностью изофермента *CYP3A4*, участвующего в биотрансформации препарата. Установлено, что у пациентов с замедленной активностью *CYP3A4* повышен риск развития НЛР при назначении диазепама в стандартных дозах, в связи с чем таким пациентам рекомендуется назначение лекарств, в метаболизме которых не принимает участие *CYP3A4*, либо использование более низких доз диазепама.

Впервые в России установлена взаимосвязь показателей концентрации диазепама в разных биологических средах (слюна, моча, плазма крови) между собой у больных с СОА, что подтвердило валидность предлагаемых фармакогенетических биомаркеров.

Впервые в России оценена взаимосвязь между активностью изофермента *CYP3A4* и показателем уровня плазменной концентрации микро-РНК *miR-27b* у пациентов с СОА.

Впервые в мире разработаны критерии прогнозирования эффективности и безопасности психофармакотерапии СОА диазепамом на основе фармакогенетического тестирования.

Теоретическая значимость работы

Сформулирована концепция персонализированного подхода к терапии диазепамом у пациентов с различными вариантами СОА, в развитие которой предложена научная идея использования комплекса фармакогенетических (полиморфизмы генов *CYP2C19*, *CYP3A4* и *CYP3A5*), фармакометаболических (активность изофермента *CYP3A4*) и фармакотранскриптомных (плазменные концентрации микро-РНК *miR-27b*) биомаркёров для решения проблемы повышения эффективности и безопасности терапии диазепамом пациентов с СОА. Предложенная идея позволила выявить закономерности исследуемого явления – значение высокой/низкой активности фармакогенетических, фармакометаболических и фармакотранскриптомных биомаркеров в прогнозировании эффективности и безопасности применения диазепама при купировании различных вариантов СОА. Доказана перспективность использования их в наркологической практике с расширением границ применимости полученных результатов в других областях медицины.

Практическая значимость работы

Применение комплексного клинического и фармакогенетического исследования позволит повысить качество психофармакотерапии диазепамом, а также обеспечить оптимальный выбор начальной дозировки препарата. Учитывая, что на сегодняшний день бензодиазепины являются основой лечения СОА, и что препараты этой группы продолжают широко применяться не только психиатрами и психиатрами-наркологами, но и врачами общей практики, решение проблемы прогнозирования эффективности и безопасности психофармакотерапии приобретает важное медицинское значение, поскольку в большинстве случаев

подбор их дозировок осуществляется врачами эмпирически. Таким образом, применение разработанной прогностической модели будет отвечать существующим потребностям практического здравоохранения, и способствовать повышению качества лечения пациентов наркологического профиля.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Установлено, что наиболее лёгкое течение отмечается у пациентов с нейровегетативным вариантом синдрома отмены алкоголя, в то время как наиболее тяжёлое – в случаях церебрального и психопатологического вариантов.

2. Показатели эффективности и безопасности терапии диазепамом не зависят от клинических вариантов СОА, но зависят от полиморфизмов генов *CYP2C19*, *CYP3A4* и *CYP3A5*. Это свидетельствует о нецелесообразности использования клинических вариантов СОА для прогнозирования риска развития нежелательных лекарственных реакций и резистентности психофармакотерапии с одной стороны, и о рациональности проведения фармакогенетического тестирования для оптимизации режима дозирования диазепама, с другой стороны.

3. У носителей минорных аллелей по медленным полиморфным маркёрам отмечены большая эффективность терапии, но и большая частота возникновения НЛР, что связано с замедлением биотрансформации диазепама, обуславливающей нарастание его плазменной концентрации. Это позволяет рекомендовать проведение фармакогенетического тестирования у пациентов с синдромом отмены алкоголя перед назначением диазепама, что способствует повышению эффективности терапии, снижению риска развития нежелательных лекарственных реакций и вероятности фармакорезистентности.

Апробация работы

Проведение диссертационного исследования одобрено Локальным Этическим Комитетом ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» (протокол № 07-17 от 28

ноября 2017 года).

Тема диссертации утверждена Ученым советом ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» (протокол №10 от 29 ноября 2017 года).

Апробация диссертации состоялась на заседании Ученого совета ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» (протокол № 2 от 23 июня 2020 г.).

Основные результаты диссертационной работы доложены на Всероссийской конференции с международным участием «Междисциплинарные подходы к изучению психического здоровья человека и общества», (29 октября 2018 года, Москва); 27th Congress of the European Psychiatric Association, (06-09 апреля 2019 года, Варшава, Польша); Международном конгрессе Королевского колледжа психиатров, (01-04 июля 2019 года, Лондон, Великобритания); 32nd European College of Neuropsychopharmacology Congress, (07-10 сентября 2019 года, Копенгаген, Дания); Третьей Европейской конференции по аддиктивному поведению и зависимостям «Lisbon Addictions 2019», (23-25 октября 2019 года, Лиссабон, Португалия).

Научные публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК, и 3 англоязычных статьи в журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных литературных источников по теме исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: формулировке проблемы и обосновании степени её разработанности, постановке цели и задач исследования, разработке методологического подхода для достижения поставленных цели и задач, сборе материала, анализе и статистической обработке его, обобщении результатов.

Автором сформулированы положения, выносимые на защиту, и выводы, подготовлены публикации по основным результатам диссертационной работы.

Соответствие диссертации Паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует формуле специальности 14.01.27 – Наркология (медицинские науки) и областям исследования: п. 1 – «Биологические основы зависимости от психоактивных веществ: разработка в условиях эксперимента новых фармакологических средств и методов для профилактики и лечения зависимости от психоактивных веществ, апробация и внедрение их в клиническую практику»; п. 2 – «Клиника алкоголизма, наркоманий и токсикоманий: клинические варианты алкоголизма, наркоманий и токсикоманий»; формуле специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки) и областям исследования: п. № 4 - «Исследование взаимодействий между организмом и лекарственными средствами, изучение их фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция фармакологических параметров с биологических моделей на человека»; п. № 7 - «Исследование фармакокинетики лекарственных средств у здоровых добровольцев и пациентов»; п. № 18 - «Разработка и оптимизация методов фармакотерапии и профилактики заболеваний у различных групп пациентов с учётом их индивидуальных особенностей, включая исследование приверженности фармакотерапии (комплаентности)».

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из введения; обзора литературы; главы – материал и методы исследования; главы, посвящённой результатам собственных исследований; главы – обсуждение результатов исследования и заключение; выводов, практических рекомендаций и

списка литературы, включающего 188 источников, из которых 129 зарубежные, списка сокращений. Работа иллюстрирована 31 таблицей, 30 рисунками и 3 приложениями.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Проводимые в последние годы биомедицинские исследования направлены на установление точных механизмов действия этанола. Употребление алкоголя сопряжено с широким спектром дозозависимых физиологических и поведенческих эффектов (в порядке возрастания дозы): противотревожным действием, миорелаксацией, анальгезией, седацией, амнезией, гипотермией и анестезией (Erdozain A.M., Callado L.F., 2014). Хорошо известно, что этанол оказывает токсическое действие на большинство тканей организма, вызывая изменения со стороны сердечно-сосудистой, пищеварительной, опорно-двигательной, центральной (ЦНС) и периферической нервной систем (Калинина А.Г., 2011).

Установлено, что этанол оказывает выраженное подавляющее действие на функции нейронов, одновременно замедляя метаболизм глюкозы в головном мозге (Wang G.J. et al., 2000). При этом точный механизм, с помощью которого этанол оказывает своё действие на головной мозг, до сих пор неизвестен. Сначала была высказана гипотеза об изменении текучести мембран нейронов, вызванном липофильностью этанола. Эта теория предполагала, что острые эффекты этанола могут быть опосредованы увеличением текучести мембран нейронов, в то время как при хроническом употреблении происходит компенсаторное повышение их жёсткости, что обуславливает изменения функции нейронов (Chin J.H., Goldstein D.B., 1981; Rottenberg H., 1986). Однако в настоящее время хорошо известно, что этанол взаимодействует со специфическими белками мембраны нейронов, участвующими в передаче импульсов, приводя к изменениям в нейронной активности (Harris R.A. et al., 2008).

Главным образом, этанол взаимодействует с двумя мембранными рецепторами: рецептором γ -Аминomásляной кислоты (ГАМК, GABA) типа А (ГАМК_А, GABA_А) и NMDA-рецептором (NMDAR; НМДА-рецептор), селективно связывающим N-метил-D-аспартат (NMDA) (Erdozain A.M., Callado L.F., 2014). ГАМК считается основным тормозным нейромедиатором в ЦНС, в то время как

глутамат, напротив, является наиболее важным возбуждающим нейромедиатором. Влияние этанола на две указанных системы выражено в повышении активности ГАМК и антагонизме по отношению к глутамату, в результате чего алкоголь действует как депрессант ЦНС (Grobin A.C. et al., 1998; Wirkner K. et al., 1999). Кроме того, этанол влияет на большинство других нейрохимических и эндокринных систем (Diamond I., Gordon A.S., 1997) (Рисунок 1). Так, дофаминергическая и опиоидная системы также участвуют в формировании синдрома зависимости от алкоголя: преимущественно, в результате воздействия на системы вознаграждения мозга. Кроме того, важную роль в нейробиологии алкогольной зависимости играют серотонинергическая, норадренергическая и каннабиноидная системы, а также кортикотропин-рилизинг-фактор. Наконец, этанол также может оказывать влияние на цитоплазматические компоненты, включая вторичные посредники (Erdozain A.M., Callado L.F., 2014) (рисунок 1.1).

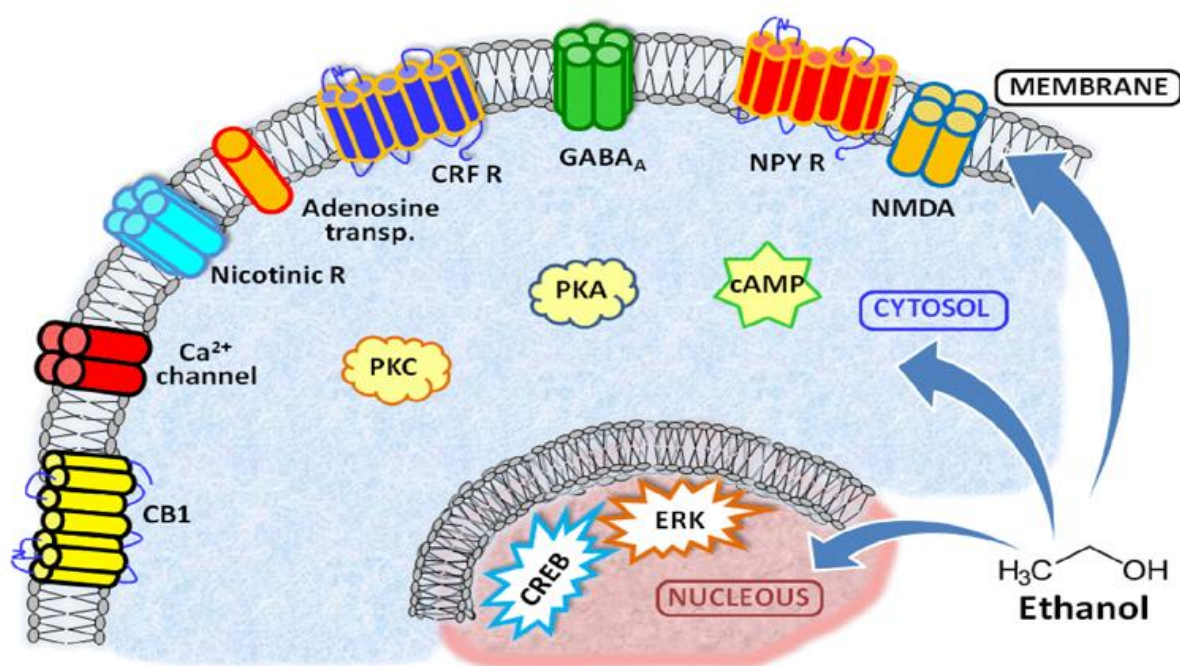


Рисунок 1.1 – Клеточные компоненты, на функционирование которых этанол оказывает прямое или косвенное воздействие: мембранные рецепторы, цитозольные сигнальные компоненты и факторы транскрипции в ядре. R: рецептор; NPY: нейропептид Y; GABA: γ-аминомасляная кислота; NMDA: N-

метил-D-аспарагиновая кислота; CRF: кортикотропин-рилизинг-фактор; CB1: каннабиноидный рецептор 1 типа; PKC и PKA: протеинкиназы C и A; cAMP: циклический аденозинмонофосфат (циклический АМФ); ERK: киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; CREB: транскрипционный фактор CREB. (Erdozain A.M., Callado L.F., 2014)

При хроническом употреблении алкоголя в ЦНС развивается компенсаторная адаптация к его депрессивным эффектам: ГАМК-опосредованное торможение ослабевает, в то время как глутамат-опосредованное возбуждение усиливается (Weintraub S.J., 2017). Это приводит к повышению концентрации глутамата, главным образом, в области полосатого тела, гиппокампа и добавочного ядра (Tsai G. et al., 1995; Tabakoff B., Hoffman P.L., 2013; Braat S., Kooy R.F., 2015). Эти нейробиологические изменения выражаются в форме развития толерантности к седативному действию алкоголя (Olsen R.W., Liang J., 2017). При резком сокращении объёмов потребляемого алкоголя или полном отказе от него может развиваться выраженное состояние гипервозбуждения, проявляющееся в виде целого спектра симптомов и осложнений синдрома отмены алкоголя (COA): от лёгкого тремора и ощущения беспокойства до судорожных приступов, алкогольного делирия и смерти (Schuckit M.A., 2014). Симптомы COA проявляются более чем у 50% пациентов, употребляющих алкоголь, которые нуждаются в медикаментозном лечении (Saitz R., 2005). На молекулярном уровне у этих больных возникают нейромедиаторные изменения, затрагивающие, в первую очередь, дофаминовую систему: активируется высокоаффинный транспортер DAT, выполняющий обратный захват дофамина, в результате чего концентрация медиатора снижается (Weiss F. et al., 1996; Knutson B. et al., 2001; De Witte P. et al., 2003). Поскольку дофамин является антагонистом ацетилхолина, концентрация последнего возрастает, вследствие чего у пациентов возникают такие симптомы, как внутренний дискомфорт, вегетативная лабильность и ощущение тревоги. Снижение тормозной ГАМКергической активности

впоследствии приводит к повышенной выработке дофамина и его накоплению в синапсах (Иващенко Д.В. и др., 2016). Гиперреактивность дофаминергической нейротрансмиссии сопровождается повышенным выбросом норадреналина, связанным с избытком глутамата. В ответ на это система кортиколиберина (кортикотропин-рилизинг-гормона, или КРГ), локализованная в гипоталамусе, миндалине и гиппокампе, осуществляет длительный выброс гормона (пик концентрации которого отмечается спустя 12 часов). Клинически выброс кортиколиберина приводит к усилению тревоги, компульсивному влечению к алкоголю и выраженной раздражительности (Slaweckі С.Ј. et al., 1999; Шабанов П.Д., Лебедев А.А., 2008; Zorrilla E.P. et al., 2014). Приём алкоголя приводит к быстрому восстановлению метаболизма нейромедиаторов и тем самым облегчает самочувствие пациентов. При возникновении повторных абстинентных эпизодов развивается т.н. «киндлинг-феномен» (от англ. *kindling* — возгорание): частая стимуляция алкоголем эмоциогенных зон гипоталамуса ведёт к формированию очага возбуждения, а повышенная возбудимость нейронов со временем приводит к утяжелению СОА (Lejoyeux M. et al., 1998; Reoux J.P. et al., 2001).

Клинически синдром отмены алкоголя представляет собой сложный симптомокомплекс, включающий разнообразные соматические, неврологические и психические расстройства, выраженность которых обычно индивидуальна (Гофман А.Г., 2012). Это позволяет классифицировать СОА в соответствии с вариантами нарушений, преобладающими в его клинической картине (Альтшулер В.Б., Кравченко С.Л., 2008; Альтшулер В.Б., 2011). В клинической практике часто используется классификация СОА по группам симптомов, преобладающих в его структуре, с выделением нескольких клинических вариантов: нейровегетативного, церебрального, висцерального и психопатологического (Иванец Н.Н., 1988). Эта классификация описывает специфические нарушения, возникающие в определённых органах и их системах, и имеет практическую ценность в качестве инструмента подбора дифференцированной и

индивидуальной терапевтической тактики для эффективного лечения СОА (Сахаров А.В. и др., 2014).

1) Нейровегетативный вариант представляет собой базовый вариант СОА, способный «обрастать» дополнительной симптоматикой. Он характеризуется астенией, вялостью, нарушениями сна, снижением аппетита, потливостью, жаждой, сухостью во рту, отечностью лица, повышением или понижением АД, тахикардией, тремором пальцев рук.

2) При церебральном варианте в дополнение к базовым нейровегетативным проявлениям СОА наблюдаются выраженная головная боль с головокружением, гиперაკузией и ощущением тошноты. Кроме того, возможно возникновение мышечных подёргиваний, резких вздрагиваний и даже обмороков, наряду с эпилептиформными судорожными припадками.

3) Висцеральный, или соматический вариант характеризуется преобладанием таких симптомов, как субиктеричность склер, тошнота, рвота, боли в животе, метеоризм, жидкий стул, нарушения сердечного ритма и одышка. Отличительная особенность этого клинического варианта СОА заключается в непропорциональности между степенью тяжести его клинических проявлений с одной стороны, и сравнительно короткой продолжительностью предшествующего употребления алкоголя – с другой (Альтшулер В.Б., 2010). Ещё одной характерной чертой висцерального варианта СОА является склонность к затяжному течению вплоть до нескольких недель, что часто затрудняет проводимую терапию.

4) Психопатологический вариант СОА определяется, если в клинической картине СОА преобладают такие психические расстройства, как тревога, страх, общая подавленность, дисфория, суицидальные мысли и поведение, идеи отношения и виновности, тотальная бессонница, слуховые и зрительные иллюзии, гипнагогические галлюцинации, яркие «приключенческие» сновидения, а также просоночные состояния с временным нарушением ориентировки в месте. По данным литературы, преобладание психических расстройств в структуре СОА

над вегетативной симптоматикой является неблагоприятным прогностическим признаком: так, Гофман А.Г. описывает этот клинический вариант как самый тяжелый и считает его переходным к развитию алкогольного психоза (Курбангалиев Р.А. и др., 2008; Гофман А.Г., 2012). Это соответствует дименсиональному подходу к оценке психических расстройств, предполагающему отсутствие жёстких границ между спектрами психических нарушений (Neznanov N.G. et al., 2008; Незнанов Н.Г. и др., 2018).

«Золотым стандартом» лечения СОА считаются препараты из группы бензодиазепиновых транквилизаторов, обладающие наилучшей доказательной базой эффективности (Sachdeva A. et al., 2015). Возможность применения бензодиазепинов при лечении СОА была впервые установлена в 1969 году при проведении исследования, в рамках которого более 500 пациентов были рандомизированы в разные группы в зависимости от назначенного им препарата: хлордиазепоксид, хлорпромазин, гидроксизин, тиамин или плацебо. Было установлено, что у пациентов, получавших хлордиазепоксид, отмечалась меньшая частота возникновения алкогольного делирия и судорожных приступов на фоне отмены алкоголя (Kaīm S. et al., 1969). Постепенно применение бензодиазепинов заменило использование барбитуратов (Dean L., 2012). Хотя эти классы препаратов обладают схожим терапевтическим действием, у барбитуратов более узкий терапевтический индекс, они вызывают более выраженную седацию при назначении в терапевтических дозах, а передозировка барбитуратами в большей степени чревата смертельным исходом (Mandrioli R. et al., 2008). Ряд рандомизированных контролируемых исследований (РКИ) показал, что лечение бензодиазепинами снижает частоту возникновения судорожных приступов на фоне отмены алкоголя и является безопасным, в то время как для барбитуратов было проведено лишь несколько РКИ, не выявивших какого-либо превосходства барбитуратов перед бензодиазепинами (Askgaard G. et al., 2017).

Таким образом, на сегодняшний день бензодиазепиновые транквилизаторы остаются препаратами «первой линии» для лечения СОА и входят в число

наиболее часто назначаемых лекарственных средств во всём мире (Арана Д., Розенбаум Д., 2006]. Эффективность бензодиазепинов обусловлена тем, что они, как и алкоголь, вызывают ГАМКергическое торможение (Perry E.C., 2014; Mirijello A. et al., 2015), а ГАМК_A-рецепторы присутствуют в 40% синапсов головного мозга (Lithari C. et al., 2012). Применение бензодиазепиновых транквилизаторов приводит к стимуляции «бензодиазепиновой» части ГАМК-рецепторов и восстановлению гиперполяризации мембран ГАМКергических нейронов (Olsen R.W., DeLorey T.M., 1999; Винникова М.А., Иванец Н.Н., 2016), что проявляется клинически исчезновением таких симптомов, как гипергидроз, тахикардия, тремор, тревога и судороги (Афанасьев В.В., 2002). Бензодиазепины одновременно подавляют симптомы СОА и сокращают продолжительность его течения, а также являются единственными препаратами, которые эффективно предотвращают развитие таких осложнений, как судорожные припадки, алкогольный делирий и смерть (Mayo-Smith M.F. et al., 2004; Perry E.C., 2014; Mirijello A. et al., 2015).

Наиболее распространёнными транквилизаторами являются 1,4-бензодиазепины. К этой группе относятся диазепам, лоразепам, бромдигидрохлорфенилбензодиазепин, нитразепам, клоназепам, медазепам и хлордiazепоксид (Ладыженский М.Я. и др., 2014).

Все производные 1,4-бензодиазепина обладают следующими эффектами (Мосолов С.Н., 1996):

- 1) анксиолитический, или транквилизирующий (успокаивающий, снимающий тревогу, страх, эмоциональную напряжённость);
- 2) седативный;
- 3) противосудорожный;
- 4) миорелаксирующий (клинически выражается слабостью, вялостью и усталостью);
- 5) гипнотический;
- 6) вегетостабилизирующий;

- 7) психостимулирующий и даже тимоаналептический;
- 8) антифобический.

Диазепам, впервые синтезированный Лео Стернбахом из компании «Hoffman-La Roche» в 1959 году, стал вторым бензодиазепином (после хлордиазепоксида), одобренным для клинического применения в 1963 году (Dean L., 2012; Calcaterra N.E., Barrow J.C., 2014). При этом выраженность его противотревожного действия оказалась минимум в три раза выше (Воробьева О.В., 2016). На сегодняшний день семейство бензодиазепинов включает более шестидесяти представителей, обладающих разными длительностью действия и фармакокинетическими профилями. В настоящее время диазепам по-прежнему остается широко используемым препаратом и включён в перечень ВОЗ основных лекарственных средств (Всемирная организация здравоохранения, 2019). Наряду с лоразепамом, диазепам наиболее часто используется для лечения СОА (Weintraub S.J., 2017). Однако диазепам более липофилен, благодаря чему он быстрее проходит через гематоэнцефалический барьер (Hollister L.E., 1981; Arendt R.M. et al., 1987; Greenblatt D.J. et al., 1989), и поэтому облегчает симптомы СОА и предотвращает прогрессирование заболевания гораздо быстрее. Кроме того, диазепам и его активный метаболит десметилдиазепам обладают наибольшей продолжительностью периода полувыведения, благодаря чему уровни их концентрации снижаются постепенно. Это приводит к тому, что СОА протекает в более мягкой форме, а также к уменьшению частоты возникновения феномена «рикошета» и обострений симптомов на фоне лечения (Bird R.D., Makela E.H., 1994; Weintraub S.J., 2017). Таким образом, в настоящее время диазепам является препаратом выбора при лечении СОА за счёт выраженного и длительного анксиолитического, седативного, гипнотического и противосудорожного действия, а также благодаря своей способности предотвращать развитие алкогольного делирия (Сиволап Ю.П., 2014).

При лечении СОА чаще всего используются три следующих режима дозирования бензодиазепиновых транквилизаторов (Holbrook A.M. et al., 1999):

1) Режим фиксированной дозы (англ. fixed tapering dose regimen, FTDR) – фиксированные дозы бензодиазепинов назначаются через определенные промежутки времени, независимо от тяжести симптомов. Начальные дозы устанавливаются в зависимости от степени тяжести СОА и количества времени, прошедшего с момента последнего употребления алкоголя. Этот вариант считается наиболее предпочтительным для амбулаторных условий, когда проведение тщательного мониторинга состояния пациента затруднено (Mayo-Smith M.F., 1997).

2) При симптом-регулируемом режиме (англ. symptom triggered regimen, STR) введение бензодиазепинов осуществляется в соответствии с выраженностью симптомов СОА, которые регулярно оцениваются с использованием стандартизированных шкал: как правило, – с помощью шкалы CIWA-Ar (шкала оценки тяжести состояния отмены алкоголя Клинического института фонда исследования зависимостей, пересмотренная), а в случае отсутствия продуктивного контакта с больным – шкалы RASS (англ. Richmond Agitation-Sedation Scale; шкала возбуждения-седации Ричмонда). При этом состояние пациента оценивается в соответствии с определённым графиком через установленные интервалы времени, а дозы бензодиазепинов назначаются исходя из тяжести СОА. Так, оценка состояния пациентов, имеющих выраженные психотические симптомы и получающих бензодиазепиновые транквилизаторы внутривенно, должна производиться каждые 10-15 минут, а после купирования острой симптоматики – каждый час (Hoffman R.S., Weinhouse G.L., 2019). В то же время, в случаях стабильного состояния пациентов, имеющих менее выраженную абстинентную симптоматику и получающих бензодиазепины перорально, оценка состояния может производиться с интервалами 4-6 часов (Hoffman R.S., Weinhouse G.L., 2019). Таким образом, для использования описанного режима медицинский персонал должен быть обучен применению необходимых шкал оценки состояния пациентов. Многие клиницисты предпочитают использование симптом-регулируемого режима дозирования, поскольку он позволяет назначать

лекарственные средства в меньших количествах при меньшей продолжительности лечения, тем самым снижая риск развития НЛР (Saitz R. et al., 1994; Daepfen J.B. et al., 2002; Cassidy E.M. et al., 2012; Holleck J.L. et al., 2019). В то же время, эффективность этой схемы лечения зависит от достоверности оценки состояния пациента.

3) Режим «нагрузочной дозы» (англ. loading dose regimen, LDR) предполагает назначение бензодиазепинов длительного действия с целью снижения риска развития осложнений, таких как судорожные приступы и алкогольный делирий (Sachdeva A. et al., 2015). Обычно применяется диазепам в дозировке 20 мг каждые 2 часа до достижения адекватной седации, с обязательной оценкой состояния пациента врачом перед введением каждой дозы (Sellers E.M. et al., 1983; Manikant S. et al., 1993; Иващенко Д.В. и др., 2016).

Проведённые сравнительные исследования описанных режимов дозирования бензодиазепинов не позволили выявить явного преимущества какого-либо из них (Mayo-Smith M.F., 1997; Kattimani S., Bharadwaj B., 2013; Sachdeva A. et al., 2015). В качестве преимуществ симптом-регулируемого режима ряд авторов называют его сравнительно большую безопасность (Jaeger T.M. et al., 2001; Daepfen J.B. et al., 2002; De Carolis D.D. et al., 2007; Elholm B. et al., 2011; Cassidy E.M. et al., 2012; Sachdeva A. et al., 2014; Richman L.S. et al., 2019) и меньшую продолжительность лечения при его применении (Daepfen J.B. et al., 2002; De Carolis D.D. et al., 2007; Kattimani S., Bharadwaj B., 2013; Sen S. et al., 2017). Однако в случаях тяжёлого или осложнённого СОА эта схема лечения оказывается неэффективной и предпочтение отдаётся режимам фиксированной дозы или «нагрузочной дозы» (Hack J.B. et al., 2006; Kattimani S., Bharadwaj B., 2013; Wong A. et al., 2015). Несомненными преимуществами режима фиксированной дозы являются его универсальность и простота, позволяющие применять его и в стационарных, и в амбулаторных условиях (Elholm B. et al., 2011; Kattimani S., Bharadwaj B., 2013; Sachdeva A. et al., 2015). Таким образом, на

сегодняшний день лечащий врач имеет возможность выбирать режим дозирования, наиболее подходящий для каждого конкретного пациента.

Несмотря на это, в настоящее время проблема персонализации назначения препаратов из группы бензодиазепиновых транквилизаторов слабо разработана в научном сообществе. Широкое применение бензодиазепинов создаёт ложное впечатление, что при их назначении применение персонализированного подхода не требуется. Однако, несмотря на высокую частоту применения данных лекарственных средств в наркологической практике, подбор их дозировок носит эмпирический характер. Согласно литературным данным, в ряде случаев наблюдается отсутствие терапевтического эффекта на фоне применения возрастающих дозировок бензодиазепиновых транквилизаторов (Benedict N.J. et al., 2018). Перекрёстная толерантность к алкоголю и бензодиазепинам зачастую является причиной применения последних в высоких дозах (так, у 10-30% пациентов отмечается СОА, резистентный к лечению), что увеличивает риск развития НЛР (Иващенко Д.В. и др., 2017). У пациентов, резистентных к бензодиазепинам при их назначении в терапевтических дозах, развиваются тяжёлые формы синдрома отмены алкоголя (Hack J.B. et al., 2006; Sarff M., Gold J.A., 2010). Частота их возникновения неизвестна, но установлено, что у таких пациентов чаще возникает необходимость в проведении искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ), увеличивается продолжительность пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), а также увеличивается риск развития нозокомиальных инфекций (Gold J.A. et al., 2007; Sarff M., Gold J.A., 2010). В то же время, применение у этой когорты пациентов бензодиазепинов в дозировках, превышающих среднетерапевтические, может быть сопряжено с возникновением НЛР.

Бензодиазепины, принимаемые в токсичных дозах без одновременного приёма сопутствующей терапии, редко вызывают тяжёлую интоксикацию (Kang M., Ghassemzadeh S., 2018). В случаях развития токсичности у пациентов в первую очередь отмечается депрессия ЦНС в диапазоне от легкой сонливости до

ступора и комы. Классическим проявлением передозировки бензодиазепинами является депрессия ЦНС с нормальными показателями жизнедеятельности. В то же время возникновение у пациентов серьёзных НЛР на фоне терапии диазепамом наблюдается чрезвычайно редко и чаще всего является следствием его взаимодействия с другими лекарственными средствами. К числу наиболее часто возникающих умеренных НЛР относятся амнезия, головокружение, атаксия, спутанность сознания, седация, депрессия и тахикардия (Calcaterra N.E., Barrow J.C., 2014). Наибольшему риску возникновения указанных нежелательных реакций подвержены пожилые пациенты, что связано с более выраженной чувствительностью их ЦНС к эффектам бензодиазепиновых транквилизаторов (Воробьева О.В., 2016). Высокая сенситивность пациентов пожилого возраста к бензодиазепинам также связана с замедлением биотрансформации лекарственных средств у представителей этой популяции, вследствие чего у них повышается биодоступность препарата и повышается его концентрация в плазме (Газизов Р.М., 2010). В связи с этим у этой группы больных повышен риск падений, переломов, а также возникновения когнитивных расстройств и делирия на фоне применения бензодиазепинов (Коробов Н.В., 2015). Тем не менее, все вышеперечисленные НЛР наблюдаются и в молодом возрасте (Сычев Д.А. и др., 2019). Наиболее распространёнными причинами летального исхода являются остановка дыхания и повторяющиеся судорожные припадки, однако, указанные осложнения обычно возникают на фоне длительного приема препаратов, а не в результате передозировки.

Длительный прием бензодиазепиновых транквилизаторов сопряжён с возникновением таких явлений, как толерантность, зависимость и синдром отмены (Мосолов С.Н., 2007; Kang M., Ghassemzadeh S., 2018). Следует отметить, что скорость развития толерантности может различаться для разных эффектов препаратов: например, толерантность к снотворному эффекту развивается чрезвычайно быстро, а к противотревожному – наоборот, медленно (Воробьева О.В., 2016). Синдром отмены бензодиазепиновых транквилизаторов чаще всего

проявляется такими симптомами, как раздражительность, тревога, гипергидроз, головные боли, головокружение, расстройства сна, мышечные подёргивания и тремор (Ладыженский М.Я. и др., 2014). В настоящее время продолжается дискуссия о том, кого из пациентов и на основании каких критериев позволительно признавать зависимыми от препаратов этой группы, поскольку известно, что не каждый из пациентов, длительно принимающих бензодиазепины, становится зависимым от них (Менделевич В.Д., 2019). Кроме того, доказано (Hallfors D.D., Saxe L., 1993), что вероятность развития зависимости при употреблении бензодиазепиновых транквилизаторов связана с фармакологическими свойствами конкретного препарата. По сравнению с другими препаратами бензодиазепинового ряда, диазепам характеризуется более низким риском развития зависимости и обычно используется для лечения синдрома отмены других бензодиазепинов и алкоголя (Calcaterra N.E., Barrow J.C., 2014).

Особенности фармакокинетики, фармакодинамики и фармакогенетики бензодиазепиновых транквилизаторов

Проведённые на сегодняшний день исследования демонстрируют влияние полиморфизма генов, кодирующих элементы фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств (в том числе – бензодиазепинов), на показатели эффективности и безопасности терапии.

Химическая структура большинства бензодиазепиновых транквилизаторов включает в себя бензольное кольцо и семичленное гетероциклическое кольцо, содержащее два атома азота в положениях 1 и 4 (Patel S.I. et al., 2015). Наличие семичленного имино-лактамового кольца является существенным для проявления активности этой группы лекарственных средств в отношении ЦНС, замещение благоприятно лишь в положениях 1, 3, 7 и 2' (Илларионова Е.А., Сыроватский И.П., 2016). Кроме того, все производные 1,4-бензодиазепина, которые в настоящее время применяются в клинической практике, содержат в своей

структуре второе бензольное кольцо, соединённое с углеродом в положении 5 (Кулес В.Г. и др., 2015).

Основной мишенью бензодиазепинов являются рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК, GABA) типа А (ГАМК_A, GABA_A). ГАМК_A-рецепторы представляют собой лиганд-управляемые анионные каналы, которые активируются ГАМК, основным ингибирующим нейромедиатором в ЦНС (de Queiroz A.C., Ribeiro D.A., 1978; Nutt D.J., Malizia A.L., 2001; Riss J. et al., 2008). При стимуляции ингибирующей ГАМКергической активности эндогенными лигандами, бензодиазепинами или другими препаратами возникают седация, амнезия и атаксия, тогда как ослабление ГАМКергической активности приводит к развитию возбуждения, беспокойства, тревоги и бессонницы (Goodman L.S. et al., 2017). Являясь нейромедиатором, ГАМК осуществляет переход на пресинаптическом участке из цитоплазмы в везикулы согласно протонному градиенту, но при этом вначале переносятся ионы хлора, которые впоследствии замещаются ионами ГАМК (Митрохин К.В., Баранишин А.А., 2018). Затем ГАМК захватывается в везикулы при вспомогательной роли фермента VGAT1 (Lalli G. et al., 2003; Haller C. et al., 2006), который, однако, отсутствует в ряде ГАМКергических терминалей, а значит, не является необходимым для укомплектования ГАМК в везикулы (Митрохин К.В., Баранишин А.А., 2018). После высвобождения ГАМК в синаптическую щель с последующей активацией постсинаптических рецепторов, действие медиатора прекращается путем его удаления нейрональными транспортёрами SLC6A1, SLC6A12, SLC6A13 и SLC6A11 (ранее называемых GAT1, GAT2, GAT3 и GAT4) (Nelson N., 1998; Cohen-Kfir E. et al., 2005) обратно в пресинаптический нейрон для повторного использования и в глию, где происходит его ферментативное расщепление с участием ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т) (Москвин А.Н. и др., 2019). На сегодняшний день, из всех типов ГАМК-транспортёров наиболее важными для ЦНС считаются SLC6A1, переносящий ГАМК из синаптической щели

преимущественно в нейроны, и SLC6A11, активно транспортирующий аминокислоту, в основном, в глиальные клетки (Москвин А.Н. и др., 2019).

ГАМК воздействует на специфические рецепторы, среди которых выделяют две группы: ионотропные (ГАМК_A, ГАМК_C) и метаболотропные (ГАМК_B) (Jembrek M.J., Vlainic J., 2015). Рецепторы ГАМК_A у млекопитающих состоят минимум из 16 субъединиц, которые разделяют на семь классов: α , β , γ , δ , ϵ , π и σ (Jansen M. et al., 2008). По данным Семьянова А.В. и Казанцева В.Б., «разные сочетания указанных субъединиц дают множество изоформ рецепторов, причём, композиция субъединиц определяет специфичность эффектов аллостерических модуляторов ГАМК_A-рецепторов, таких как нейростероиды, цинк, бензодиазепины и барбитураты» (Семьянов А.В., Казанцев В.Б., 2007). Различия в аффинитете бензодиазепинов к рецепторам ГАМК могут обуславливать и разный фармакологический ответ на применение препаратов этой группы у разных пациентов (Riss J. et al., 2008). Каждый функционирующий ГАМК_A-рецептор представляет собой гетеропентамер, где все пять субъединиц имеют одинаковую третичную структуру и образуют розетку вокруг мембранного канала для ионов хлора (Сычев Д.А. и др., 2019). У каждого ГАМК_A-рецептора имеются два участка связывания для ГАМК ($\alpha\beta + \alpha\beta$) и один участок ($\alpha\gamma$) для связывания бензодиазепинов и снотворных средств небензодиазепиновой структуры (зопиклона, золпидема, и др.), которые связываются в специальном «кармане» на стыке α и γ частей. Установлено, что модуляция бензодиазепинов осуществляется преимущественно через $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ и $\alpha 5$ субъединицы ГАМК_A-рецептора (Сычев Д.А. и др., 2019). При связывании бензодиазепинов с $\alpha 1$ и $\gamma 2$ субъединицами происходит изменение конформации рецептора (Williams D.B., Akabas M.H., 2000; Sigel E., 2002), что приводит к повышению связывающей способности ГАМК-рецептора с эндогенным лигандом. Таким образом, основное действие бензодиазепиновых транквилизаторов реализуется не за счёт прямого стимулирования ГАМК-рецепторов, а вследствие аллостерического модулирования эффекта эндогенного лиганда и снижения порога концентрации

нейротрансмиттера, необходимого для открытия хлорных каналов (Sigel E., 2002; Goodman L.S. et al., 2017).

Кроме ГАМК_A-рецепторов, бензодиазепины также связываются с периферическими бензодиазепиновыми рецепторами (англ. peripheral benzodiazepine receptor, PBR). Каждый из этих рецепторов локализуется во внешней мембране митохондрий, концентрируясь в контактных сайтах. Он представляет собой тримерный комплекс, состоящий из 18 кДа белка, названного в 2006 году транслокаторным белком (англ. translocator protein, TSPO) (Paradopoulos V. et al., 2006; Мокров Г.В. и др., 2018), переносчика адениновых нуклеотидов (англ. adenine nucleotide translocase, ANT), а также потенциалзависимого анионного канала (англ. voltage-depended anion channel, VDAC) (Грачёв Д.Е., 2009). PBR присутствует во многих периферических органах и тканях, а также в ЦНС (конкретно – в клетках глии). Чаще всего изучаются его высокоафинные лиганды (искусственные, например, РКП 195 и Ro 5-4864, и эндогенные, например, протопорфирин, холестерин и ингибитор связывания диазепама (англ. diazepam binding inhibitor, DBI)) (Грачёв Д.Е., 2009). Диазепам, мидазолам и флунитразепам одинаково хорошо связываются как с рецептором ГАМК_A, так и с PBR (Zavala F., 1997; Lang S., 2002).

На рисунке 1.2 представлена общая схема механизма действия бензодиазепинов.

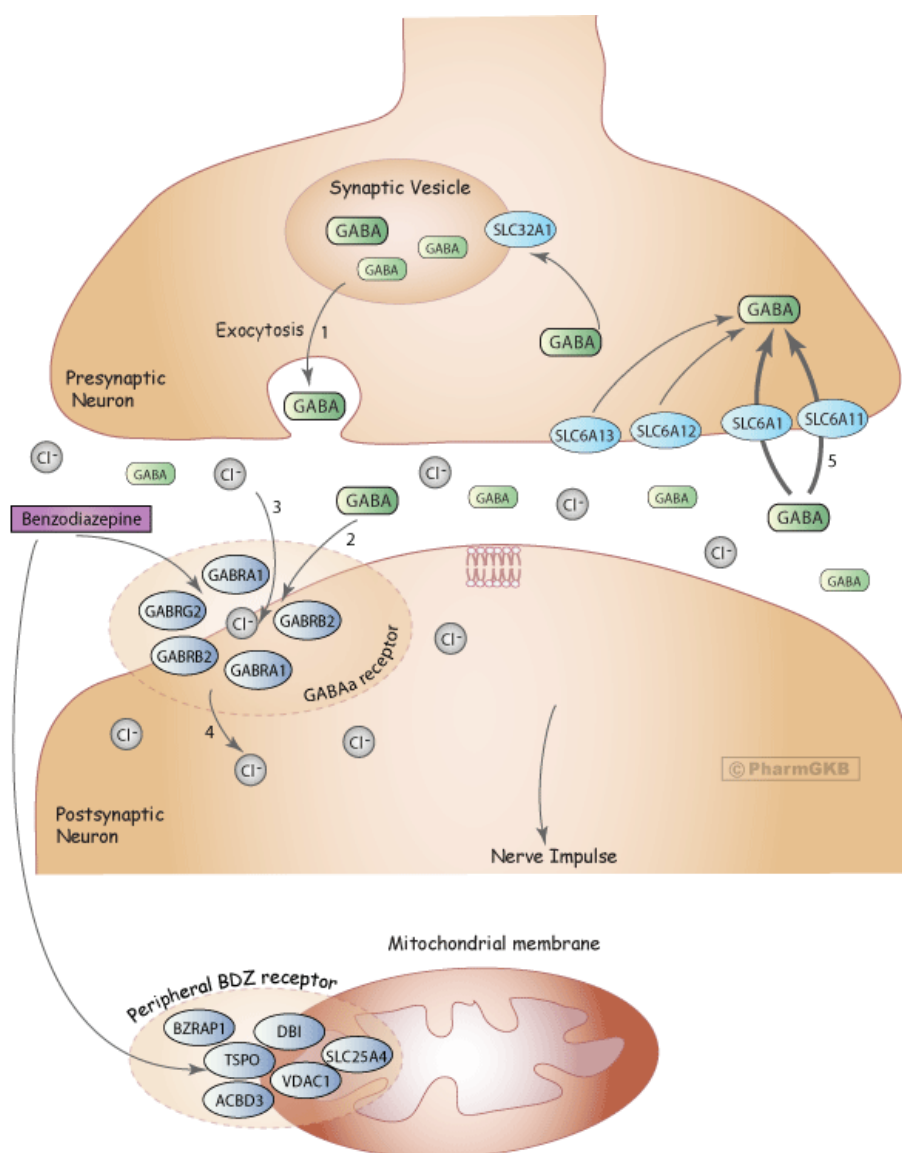


Рисунок 1.2 – Рецепторы-мишени транквилизаторов бензодиазепинового ряда (по материалам сайта www.pharmgkb.org)

Бензодиазепины различаются по своим физико-химическим свойствам, прежде всего – по степени липофильности, в результате чего препараты этой группы имеют разную скорость всасывания, а каждый из них имеет уникальный фармакокинетический профиль (Riss J. et al., 2008). При приёме внутрь бензодиазепины всасываются преимущественно в двенадцатиперстной кишке, при этом, наиболее быстро всасывается диазепам (1 час), в то время как время всасывания триазолама составляет 1,3 часа, алпразолама и лоразепама – 2 часа, а оксазепамы – 2-3 часа (Точилов В.А., 2006). Показатели биодоступности

составляют от 80% до 100% (Riss J. et al., 2008), а время достижения максимальной концентрации вещества в плазме крови после однократного приёма составляет от нескольких минут до 1-3 часов (Илларионова Е.А., Сыроватский И.П., 2016). При внутримышечном введении всасывание бензодиазепинов происходит медленнее, чем при их приёме внутрь. Равновесная концентрация при курсовом назначении достигается спустя несколько дней после начала лечения (для препаратов с коротким и средним периодом полувыведения) или в течение периода до 2 недель (для препаратов с длительным периодом полувыведения) (Кукес В.Г. и др., 2015). На скорость проникновения бензодиазепинов в ткани оказывают влияние скорость кровотока, а также градиенты концентрации и проницаемости (Илларионова Е.А., Сыроватский И.П., 2016). Препараты этой группы быстро проникают через гематоэнцефалический барьер; при этом, скорость, с которой они попадают в ЦНС, различается у разных лекарственных средств и определяется их липофильностью и степенью связывания с белками плазмы крови (Rey E. et al., 1999; Riss J. et al., 2008). Бензодиазепины интенсивно связываются с белками плазмы (от 70% для алпразолама до 98% для диазепама), причём степень связывания не зависит от уровня их плазменной концентрации (Moschitto L.J., Greenblatt D.J., 1983). Показатели уровня концентрации несвязанной фракции препарата в плазме крови находятся в диапазоне от 15% для лоразепама до 3% для диазепама (Rey E. et al., 1999). Согласно литературным данным, концентрации бензодиазепинов в спинномозговой жидкости (СМЖ) в целом соответствуют концентрациям несвязанной фракции препарата в плазме (Rey E. et al., 1999). Так, было показано, что концентрация диазепама в СМЖ составляет 2% от уровня его плазменной концентрации спустя полчаса после внутримышечного введения диазепама в дозировке 10 мг (Kanto J. et al., 1975). Благодаря высокой степени липофильности, бензодиазепины обладают высокой скоростью перераспределения из ЦНС в мышечную и жировую ткани и высоким показателем объёма распределения: так, для диазепама он составляет 1,2 л/кг (Patel S.I. et al., 2015).

Бензодиазепины в основном подвергаются биотрансформации в печени. Препараты этой группы метаболизируются путём гидроксилирования (алифатического и ароматического), деалкилирования, реакций восстановления и ацетилирования (фаза I), с последующим конъюгированием перед выделением с глюкуроновой кислотой (фаза II) (Илларионова Е.А., Сыроватский И.П., 2016). В большинстве случаев метаболиты, образовавшиеся в фазе I, обладают собственной биологической активностью, в то время как конъюгаты её лишены. Длительность терапевтического эффекта бензодиазепинов, имеющих активные метаболиты, определяется $T_{1/2}$ активных метаболитов, а не $T_{1/2}$ исходного вещества (Илларионова Е.А., Сыроватский И.П., 2016). Выводятся метаболиты преимущественно почками.

Изучение фармакогенетики препаратов из группы бензодиазепинов сосредоточено, главным образом, на генах фармакокинетических факторов – ферментов системы цитохрома P450. Известно, что эти ферменты принимают участие в 70%-80% всех химических реакций первой фазы метаболизма большинства лекарственных средств, используемых в клинической практике (Fukasawa T. et al., 2007). Реакции микросомального окисления катализируются печёночными изоферментами цитохрома P450: в первую очередь, CYP3A4, CYP3A5 и CYP2C19 (Olkola K.T., Ahonen J., 2008). Следует отметить, что хотя изофермент CYP3A4 вовлечен в процесс метаболизма бензодиазепинов, имеющиеся результаты исследований влияния различных аллельных вариантов CYP3A4 и CYP3A5 на метаболизм мидазолама являются противоречивыми (He P. et al., 2005; 2006; Maekawa K. et al., 2009). Кроме того, имеются данные о возможном участии других изоферментов в гидроксилировании препаратов бензодиазепинового ряда (Picotte J.J. et al., 2007; Mandrioli R. et al., 2008; Riss J. et al., 2008). Глюкуронирование катализируется УДФ-глюкуронилтрансферазой (уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансфераза, УДФ-ГТ) (Court M.H. et al., 2002; Mandrioli R. et al., 2008): так, глюкуронирование мидазолама осуществляется при участии UGT1A4 (Klieber S. et al., 2008; Mandrioli R. et al., 2008). Имеются данные

о том, что ацетилирование клоназепама осуществляется при участии NAT2 (Miller M.E. et al., 1981; Olivera M. et al., 2007).

Упрощённая схема метаболизма бензодиазепиновых транквилизаторов представлена на рисунке 1.3.

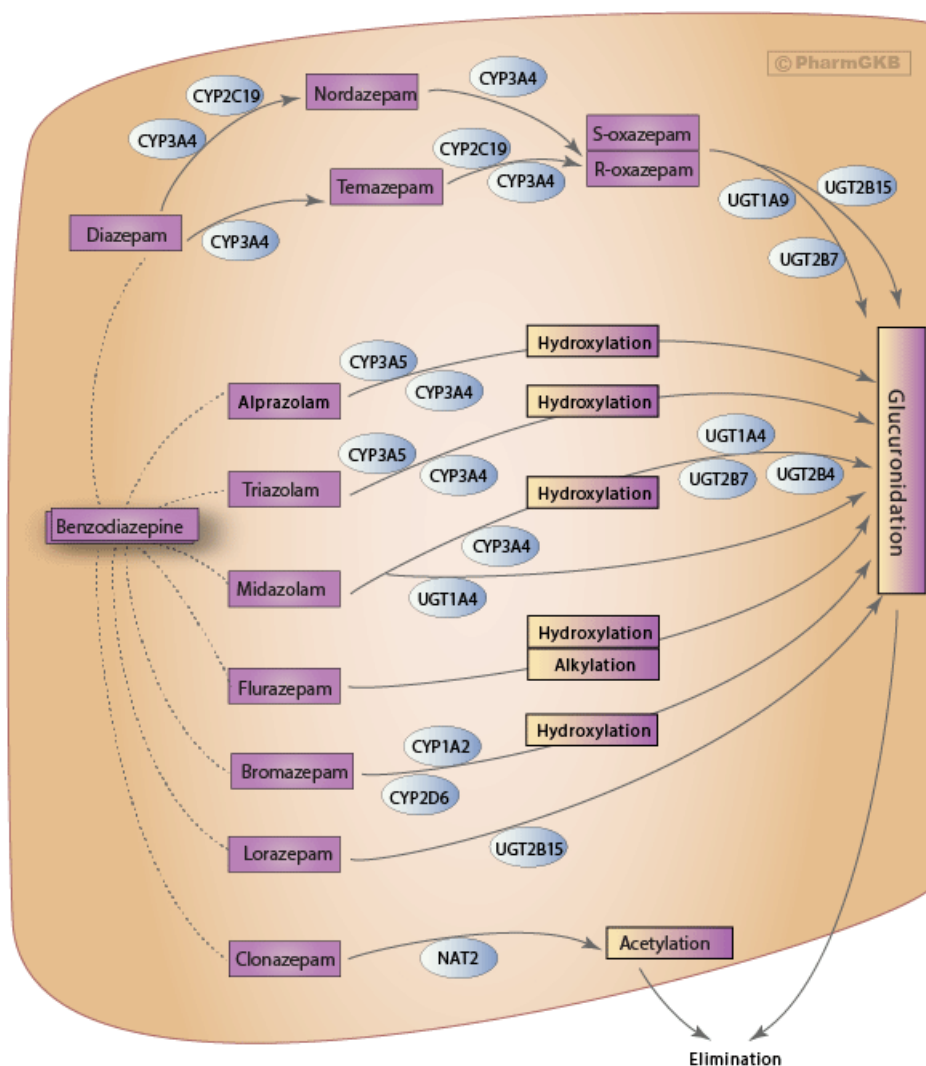


Рисунок 1.3 – Основные пути биотрансформации препаратов бензодиазепинового ряда (по материалам сайта www.pharmgkb.org)

Рассмотрим более подробно особенности фармакогенетики диазепама. После введения (перорально, внутривенно, внутримышечно или в форме суппозитория) диазепам быстро абсорбируется и метаболизируется преимущественно при участии изоферментов микросомальной цепи окисления печени CYP2C19 и CYP3A4 (Dean L., 2012). Очень небольшое количество

дiazепама выделяется в неизменённом виде (Mandrioli R. et al., 2008; Riss J. et al., 2008). Реакция N-деметилования, катализируемая изоферментами CYP2C19 и CYP3A4, приводит к образованию активного метаболита N-дезметилдiazепама (или нордiazепама), который обнаруживается в плазме крови в концентрациях, эквивалентных таковым diaзепаму, и впоследствии гидроксилируется до оксазепама при участии CYP3A4 (Andersson T. et al., 1994; Jung F. et al., 1997). Кроме того, diaзепам, при участии CYP3A4, образует минорный активный метаболит темазепам, который затем деметилируется посредством изоферментов CYP2C19 и CYP3A4 до оксазепама, или глюкуронируется и выводится из организма (Mandrioli R. et al., 2008). Ряд проведённых исследований показал, что важную роль в метаболизме diaзепаму также играют CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9; CYP2C18 и CYP3A4/5 (Ono S. et al., 1996; Jung F. et al., 1997; Yang T.J. et al., 1998; Fukasawa T. et al., 2007). Оксазепам, метаболит diaзепаму, подвергается глюкуронированию, которое катализируется УДФ-ГТ, и выводится с мочой. Глюкуронирование S-оксазепама осуществляется посредством UGT2B15 (Court M.H. et al., 2002; 2004), а R-оксазепама – с помощью UGT2B7 и UGT1A9 (Court M.H. et al., 2002).

Активность изоферментов генетически детерминирована, и в зависимости от того, к каким последствиям для скорости биотрансформации лекарственных средств приводит носительство (гетерозиготное/гомозиготное) или неносительство («дикий» генотип) однонуклеотидного полиморфизма, выделяют несколько групп пациентов (Кукес В.Г. и др., 2015; Насырова Р.Ф. и др., 2015): распространённые метаболизаторы (англ. extensive metabolizers, EMs) с нормальной скоростью метаболизма лекарственных средств (носители «дикого» генотипа), медленные метаболизаторы (англ. poor metabolizers, PMs) со сниженной скоростью биотрансформации и ультрабыстрые, или сверхактивные, метаболизаторы (англ. ultraextensive metabolizers, UMс) с ускоренным метаболизмом лекарственных средств. Так, в ряде исследований у медленных метаболизаторов по CYP2C19 было показано статистически значимое снижение

клиренса диазепама и удлинение периода его полувыведения из плазмы по сравнению с пациентами с нормальной скоростью метаболизма (Bertilsson L. et al., 1989; Zhang Y.A. et al., 1990; Sohn D.R. et al., 1992; Desta Z. et al., 2002). По результатам исследования, проведённого с участием 63 японских пациентов, подвергавшихся общей анестезии, было обнаружено, что генотип *CYP2C19* оказывает влияние на фармакокинетические показатели диазепама и выход пациентов из наркоза (Inomata S. et al., 2005).

Таким образом, проведённые на сегодняшний день исследования демонстрируют влияние полиморфизма генов, кодирующих элементы фармакокинетики и фармакодинамики бензодиазепинов, на показатели эффективности и безопасности терапии.

Однако на сегодняшний день для полноценной разработки персонализированного подхода к фармакотерапии недостаточно изучения одних лишь генетических полиморфизмов, и современные исследования должны включать, наряду с генетическими, и фенотипические биомаркёры. Это связано с тем, что генотипирование не позволяет с точностью прогнозировать реальный уровень активности изофермента (Shah R.R. et al., 2016), и информации об имеющихся у пациента генетических полиморфизмах зачастую оказывается недостаточно для адекватного прогнозирования показателей фармакокинетики, эффективности и безопасности лекарственного средства (De Andrés F. et al., 2016). Исходя из этого, сегодня особенно актуальны работы с одновременным учётом генотипических и фенотипических особенностей организма. В настоящее время в клинической практике с целью фенотипирования изоферментов системы цитохрома P450 используются эндогенные субстраты: например, отношение концентрации 6-β-гидрокортизола к концентрации кортизола в моче для оценки активности *CYP3A4*, что является максимально безопасным и малоинвазивным подходом для участников исследований (Galteau M.M., Shamsa F., 2003; Mårde Arrhén Y. et al., 2013; Lang L.M., Linnet K., 2014; Сычёв Д.А. и др., 2016; Lee J. et al., 2017).

Помимо вышеописанных методик определения активности изоферментов семейства цитохрома P450 по соотношению метаболитов в моче, существуют и более современные технологии, одной из которых является анализ экспрессии генов посредством определения уровня специфичных микро-РНК в плазме крови пациента. Микро-РНК (англ. microRNA, miRNA, miR) представляют собой короткие некодирующие цепочки РНК, состоящие в среднем из последовательности 22 нуклеотидов (Stakos D.A. et al., 2013). Они обладают способностью к регуляции экспрессии гена за счёт ингибирования трансляции матричных РНК (мРНК), что в конечном итоге приводит к снижению содержания белкового продукта гена (Bartel D.P., 2009). Установлено, что микро-РНК оказывают ингибирующее действие на экспрессию изоферментов системы цитохрома P450 (Pan Y.Z. et al., 2009), а различная экспрессия микро-РНК может влиять на вариабельность функционирования ферментов (Рыткин Э.И. и др., 2019). Наиболее активно изучаются специфичные микро-РНК, оказывающие влияние на уровень экспрессии изофермента CYP3A4 (Takahashi K. et al., 2014; Wei Z. et al., 2014; Vachirayonstien T., Yan B., 2016).

Таким образом, микро-РНК представляют собой новый перспективный вид биомаркёров, осуществляющих «мягкую» регуляцию экспрессии генов, в том числе – CYP3A4, которые могут применяться для персонализации фармакотерапии (Рыткин Э.И. и др., 2019). Несмотря на возрастающий интерес к этим биомаркёрам, на сегодняшний день практически не встречается опубликованных научных работ, в которых бы осуществлялось измерение плазменных уровней специфичных микро-РНК наряду с определением генотипической и фенотипической активности изоферментов системы цитохрома P450. В настоящее время доступно только одно такое исследование, в ходе которого осуществлялось измерение уровня микро-РНК *miR-27b* в плазме крови и гепатоцитах пациентов с последующим сопоставлением с уровнем активности изофермента CYP3A (Ekström L. et al., 2015). Исходя из вышеизложенного, включение микро-РНК в панель фенотипических биомаркёров

фармакогенетических исследований представляет собой пока малоизученную, но перспективную стратегию. При этом, валидность указанных новых биомаркёров должна подтверждаться рутинными методами, такими как фенотипирование активности изоферментов семейства цитохрома P450 и терапевтическим лекарственным мониторингом лекарственных средств.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Условия проведения исследования

Исследование проводилось на базе двух круглосуточных стационаров – клинических филиалов государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Московский научно-практический центр наркологии Департамента здравоохранения города Москвы» (президент: д.м.н., проф. Брюн Е.А., директор: к.м.н. Копоров С.Г.).

Фармакогенетические исследования выполнялись в НИИ МПМ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (ректор: д.м.н., профессор, член-корр. РАН Сычев Д.А.) д.б.н., директором НИИ молекулярной и персонализированной медицины Гришиной Е.А. и н.с. Рыжиковой К.А., а также в молекулярно-генетической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» (руководитель: к.м.н., доц. Застрожин М.С.) лаборантом-исследователем Сорокиным А.С. Фармакокинетические исследования были выполнены в химико-токсикологической лаборатории Референс-центра по мониторингу потребления ПАВ ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» (заведующий филиалом: Бурцев А.А.) к.фарм.н, врачом клинической лабораторной диагностики Петуховым А.Е. Исследования фармакометаболизма проводились в лаборатории клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения государственного научного центра «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России (и.о. директора акад. РАН, д.м.н., проф. Хаитов М.Р.) заведующим лабораторией, к. фарм.н., доцентом Смирновым В.В.

2.2. Дизайн исследования

Было проведено открытое несравнительное проспективное исследование, в рамках которого пациенты мужского пола с установленным диагнозом «F10.30. Абстинентное состояние (синдром отмены) неосложнённое, вызванное употреблением алкоголя» средней или тяжёлой степени, проходившие

стационарное лечение, получали в течение 5 суток диазепам внутримышечно в дозировке 30 мг/сут. с целью терапии СОА. Для верификации диагноза использовались следующие диагностические критерии МКБ-10^{1,2}:

1) наличие чётких данных о недавнем прекращении приема или снижении дозы алкоголя после его употребления обычно в течение длительного времени и/или в высоких дозах;

2) соответствие симптомов и признаков известным характеристикам состояния отмены алкоголя;

3) отсутствие каузальной связи между симптомами и признаками и медицинским расстройством, не имеющим отношения к употреблению алкоголя, а также невозможность их лучшего объяснения другим психическим или поведенческим расстройством.

Проведённое исследование включало следующие этапы:

I этап – клинический, в рамках которого осуществлялись отбор пациентов для участия в исследовании (методом сплошного скрининга); изучение анамнестических данных, оценка общего состояния пациентов, выявление клинико-динамических особенностей заболевания, психометрическое обследование, забор образцов биологических жидкостей для выполнения лабораторных исследований; определение структуры и тяжести СОА, а также установление клинических критериев эффективности и безопасности диазепама;

II этап – проведение лабораторных исследований полученных образцов: фенотипирование CYP3A4, определение генотипов CYP3A4, CYP3A5 и CYP2C19, а также определение концентраций плазменной микро-РНК *miR-27b* и диазепама в слюне и плазме крови;

¹ Психические расстройства и расстройства поведения (F00 - F99). (Класс V МКБ-10, адаптированный для использования в Российской Федерации). Под общей редакцией Казаковцева Б.А., Голланда В.Б. - М.: Минздрав России, 1998. - 512 с.

² Клинические рекомендации «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя. Синдром отмены алкоголя (алкогольное абстинентное состояние)» (утв. Минздравом России): <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/recommend/938>

III этап – систематизация данных, полученных в результате проведённого клинического и лабораторного исследований, их статистическая обработка и оформление результатов; формулировка положений, выносимых на защиту; установление критериев прогноза; методические рекомендации.

2.2.1. Процедура набора исследуемой когорты пациентов

Критериями включения в исследование являлись: 1. Наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании; 2. Установленный в соответствии с критериями Международной классификации болезней Десятого пересмотра (МКБ-10) диагноз «F10.30. Абстинентное состояние (синдром отмены) неосложнённое, вызванное употреблением алкоголя»; 3. Начальные проявления СОА (длительность воздержания от употребления алкоголя, по крайней мере, в течение 8 часов, но не более 48 часов до включения в исследование); 4. Балл по международной шкале оценки тяжести синдрома отмены алкоголя CIWA-Ar более 10.

Критериями невключения в исследование были: 1. Наличие острых или декомпенсированных хронических соматических и неврологических заболеваний; 2. Проведение экстренных хирургических вмешательств в течение 30 дней, предшествующих включению в исследование; 3. Наличие коморбидного психического заболевания шизофренического спектра (диагноз по МКБ: F20, F21), диагностированного ранее или выявленного в ходе проведения исследования; 4. Наличие в анамнезе других зависимостей, кроме зависимости от алкоголя и никотина; 5. Клиренс креатинина <50 мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови $\geq 1,5$ мг/дл (133 мкмоль/л); 6. Масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; 7. Возраст 75 лет и более; 8. Наличие в рационе пациентов продуктов, ингибирующих или индуцирующих CYP3A4 (грейпфрутовый сок и др.); 9. Наличие противопоказаний к применению диазепама (регламентированы в утвержденных МЗ РФ инструкциях по медицинскому применению): гиперчувствительность к производным

бензодиазепина, тяжелая форма миастении, кома, шок, закрытоугольная глаукома, синдром ночного апноэ, тяжелая хроническая обструктивная болезнь лёгких (опасность прогрессирования дыхательной недостаточности), острая дыхательная недостаточность.

2.2.2. Обзор процедур исследования

После включения пациентов в исследование в первый день стационарного лечения и до начала терапии, включающей диазепам, посредством структурированного интервью осуществлялся сбор анамнестических данных и основных социо-демографических показателей, экспертно оценивались общее состояние и психический статус пациентов, выявлялись клинико-динамические особенности течения наркологического заболевания, экспертно оценивалась структура СОА с выделением преобладающей компоненты, на основании чего определялся клинический вариант течения СОА, а также проводилось психометрическое обследование с использованием стандартизированных психометрических шкал. Всем участникам были проведены рутинные лабораторные (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, анализ крови на ВИЧ, сифилис и вирусные гепатиты) и инструментальные исследования (электрокардиография (ЭКГ) и рентгенография органов грудной клетки). Кроме того, в первый день стационарного лечения и до начала терапии диазепамом, осуществлялся забор образцов мочи для проведения фенотипирования CYP3A4.

Диазепам назначался пациентам в соответствии с инструкцией по медицинскому применению лекарственного препарата с целью терапии СОА, в форме раствора для внутримышечных и внутривенных инъекций («Реланиум раствор для инъекций 10 мг в ампулах по 2 мл», производитель «Польфа Варшавский ФЗ»), в дозировке 30 мг/сут длительностью пять суток. Введение диазепама осуществлялось внутримышечно три раза в сутки через равные интервалы времени в фиксированной дозе 10 мг (режим фиксированной дозы).

Кроме диазепама, все участники исследования в течение 5 дней получали минимизированную стандартную терапию СОА, которая предусматривала использование инфузионных и ионосодержащих растворов, а также витаминов (таблица 2.1). Назначение диазепама и других лекарственных средств проводилось в соответствии с Клиническими рекомендациями «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя. Синдром отмены алкоголя (алкогольное абстинентное состояние)».

Таблица 2.1 – Минимизированная стандартная терапия СОА

Наименование препарата	Средняя суточная доза
Раствор натрия хлорида 0,9% + калия хлорид 10% + магния сульфат 25%	800 мл
Раствор тиамина гидрохлорида 5%	100 мг
Раствор пиридоксина гидрохлорида 5%	100 мг

К неразрешённым группам препаратов относились любые психотропные препараты, кроме диазепама: другие транквилизаторы, антипсихотики, антидепрессанты, антиконвульсанты и ноотропы. Пациентов, нуждавшихся в применении препаратов, не разрешённых к приёму в ходе исследования, не включали в данное исследование. Данные препараты назначались только после завершения участия пациента в исследовании.

Динамическое наблюдение за пациентами осуществлялось на всем протяжении исследования. При необходимости пациентов консультировали врачи-специалисты (невролог, терапевт, хирург, отоларинголог, офтальмолог).

Оценка состояния участников с помощью стандартизированных психометрических шкал осуществлялась ежедневно на всём протяжении исследования. Полученные результаты оценивались в баллах.

На шестой день исследования осуществлялся забор: 1) образцов мочи для проведения фенотипирования CYP3A4; 2) образцов слюны для определения показателя концентрации диазепама; 3) образцов венозной крови для определения генотипов CYP3A4, CYP3A5 и CYP2C19, для определения концентрации плазменной микро-РНК *miR-27b*, а также для определения концентрации диазепама в плазме крови. Полученные образцы биологических жидкостей замораживались при температуре -70°C и в дальнейшем транспортировались в лаборатории в переносном холодильнике для проведения исследований.

После завершения исследования, т.е. после шестого дня, пациентам проводилось лечение, соответствующее общепринятым подходам, основанное на выделении мишени терапии. При этом, могли быть использованы различные группы препаратов: например, психотропные (антипсихотики, антидепрессанты, антиконвульсанты) и препараты других групп (гепатопротекторы, сосудистые средства, и другие).

Дизайн исследования представлен в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Дизайн исследования

День исследования	День 1	Дни 2-5	День 6
Оценка пациентов в соответствии с критериями включения / исключения	✓		
Получение письменного информированного согласия	✓		
Сбор анамнестических данных и основных социо-демографических показателей	✓		
Оценка общего состояния и психического статуса пациентов	✓	✓	✓
Лабораторная диагностика (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, анализ крови на ВИЧ, сифилис и вирусные гепатиты)	✓		

Оценка состояния участников с помощью стандартизированных шкал оценки тяжести СОА			
Международная шкала оценки тяжести синдрома отмены алкоголя «CIWA-Ar»	✓	✓	✓
Оценка степени выраженности НЛР с помощью стандартизированных шкал			
Шкала оценки побочного действия UKU (UKU Side-Effect Rating Scale)	✓	✓	✓
Забор образцов биологических жидкостей			
Забор образцов мочи для проведения фенотипирования CYP3A4	✓		✓
Забор образцов венозной крови для определения генотипов CYP3A4, CYP3A5 и CYP2C19			✓
Забор образцов венозной крови для определения концентрации плазменной микро-РНК <i>miR-27b</i>			✓
Забор образцов венозной крови для определения концентрации диазепама в плазме крови			✓
Забор образцов слюны для определения концентрации диазепама			✓

2.3. Методы исследования

Обследование пациентов осуществлялось с применением клинико-психопатологического, психометрического, лабораторного и статистического методов исследования.

В первый день стационарного лечения с пациентами проводилось структурированное интервью, включающее сведения о семейной отягощенности, данные анамнеза заболевания и жизни, а также информацию о предшествующих госпитализациях. Кроме того, осуществлялась систематизация данных, полученных из медицинской документации (медицинских карт стационарного больного), из бесед с родителями и близкими родственниками участников исследования, информации от врачей других специальностей, консультировавших этих пациентов, а также в результате тщательного клинико-психопатологического анализа. Психический статус пациентов оценивался клинически. Оценка

выраженности имевшейся у участников исследования психопатологической симптоматики осуществлялась с использованием психометрического метода.

2.3.1. Описание применявшихся психометрических шкал

Для оценки тяжести COA применялась общепризнанная валидная стандартизированная психометрическая шкала: международная шкала оценки тяжести состояния отмены алкоголя Клинического института фонда исследования зависимостей, пересмотренная (англ. Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol scale, Revised, CIWA-Ar) (Приложение 1).

Первая шкала для оценки состояния пациентов с COA, Total Severity Assessment Scale (TSA), была предложена в 1973 г. (Gross M.M. et al., 1973) и содержала 32 пункта. Впоследствии она была модифицирована, в результате чего появилась шкала SSA (англ. Selective Severity Assessment Scale), включавшая в себя уже 11 пунктов. Однако этот инструмент оказался недостаточно пригодным для объективной оценки состояния пациентов и подбора адекватной терапии, в связи с чем Shaw с соавт. в 1981 г. была предложена шкала CIWA-A (Shaw J.M. et al., 1981). Этот новый инструмент содержал в себе некоторые из параметров шкалы SSA: качество контакта с пациентом, тремор, повышенную потливость, помрачение сознания, а также наличие в клинической картине психомоторного возбуждения и судорог. В то же время, компоненты шкалы «нарушения питания» и «нарушения сна» были заменены на параметр «тошнота / рвота», поскольку это позволяло оценивать состояние пациентов не один раз в день, а каждые полчаса. Кроме того, вместо параметра «галлюцинации» были введены вопросы об имеющихся тактильных, слуховых и зрительных расстройствах (поскольку чаще всего они предшествуют возникновению галлюцинаций в рамках COA), а также компоненты «покраснение лица» и «головная боль». Спустя шесть лет, в 1981 г., шкала CIWA-A была пересмотрена (Sullivan J.T. с соавт., 1989), в результате чего появился современный инструмент CIWA-Ar, включающий 10 параметров: наличие тошноты и рвоты, тремора пальцев рук и предплечья, пароксизмальной

потливости, чувства тревоги и беспокойства, психомоторного возбуждения (ажитации), головной боли и ощущения распирания в голове, нарушений тактильного, слухового и зрительного восприятия, а также нарушений ориентировки и сенсорной сферы. Таким образом, такие компоненты, как качество контакта с пациентами, наличие покраснения лица, галлюцинаций, расстройств мышления и судорог, были исключены как излишние. При использовании шкалы производят оценку выраженности указанных компонентов в баллах, которые затем суммируют. Максимально возможное количество баллов составляет 67. Результаты оценки интерпретируются следующим образом: сумма баллов от 0 до 9 соответствует очень умеренному абстинентному синдрому, от 10 до 15 – лёгкому абстинентному синдрому, от 16 до 20 – умеренному, и свыше 20 баллов – тяжёлому абстинентному синдрому. Считается, что пациенты с суммарным количеством баллов менее 10 не нуждаются в проведении активной терапии, в то время как лицам с суммой баллов более 10 требуется проведение активной фармакотерапии, а их состояние следует оценивать каждые 2 ч (Ненастьева А.Ю., 2018). Шкала CIWA-Ar обладает высокой информативностью и валидностью, а также проста в применении: оценка состояния пациента с её помощью занимает всего 1 минуту в случае наличия опыта её использования у лица, осуществляющего оценку (Williams D. et al., 2001).

Профиль безопасности диазепама оценивался посредством анкетирования пациентов на предмет возникновения НЛР с применением шкалы оценки побочного действия «Udvald for Kliniske Undersogelser Scale» (англ. UKU Side-Effect Rating Scale, UKU) (Приложение 2).

Шкала UKU, созданная и используемая для оценки переносимости различных классов лекарственных средств (Lingjaerde O. et al., 1987), включает 48 пунктов, разделённых на четыре подшкалы: психические побочные эффекты, неврологические, вегетативные и другие побочные эффекты. Наличие и степень выраженности каждого из компонентов оценивается в баллах от 0 до 3. Применение шкалы UKU было обусловлено как установленной более высокой

выявляемостью НЛР при её использовании по сравнению с методом спонтанных сообщений (Gruwez B. et al., 2004; Потанин С.С. и др., 2015), так и возможностью оценки степени выраженности возникавших НЛР, что может способствовать повышению эффективности статистического анализа полученных данных.

Однако применение одной лишь шкалы UKU не позволяет достоверно установить наличие причинно-следственной связи между применением лекарственного средства и возникновением НЛР. Для решения этой проблемы применялся алгоритм Наранжо (Busto U. et al., 1982) (Приложение 3), с помощью которого оценивалась достоверность причинно-следственной связи между применением диазепама и возникновением НЛР. Степень достоверности взаимосвязи «ЛС-НЯ» по алгоритму Наранжо определяется как определённая при сумме баллов 9 и более; вероятная – при сумме 5-8 баллов; возможная – 1-4 балла и сомнительная – при сумме 0 баллов и менее.

После определения степени достоверности причинно-следственной связи «диазепам-НЛР» дальнейшему анализу подвергались только случаи с высокой степенью достоверности (определённая, вероятная и возможная).

Критериями оценки эффективности и безопасности терапии диазепамом являлась динамика выраженности симптоматики в соответствии с вышеуказанными психометрическими шкалами.

2.3.2. Оценка метаболической активности изофермента CYP3A4

Метаболическая активность изофермента CYP3A4 определялась при помощи валидированной методики (Смирнов В.В. и др., 2010; Смирнов В.В., 2011), в соответствии с которой «активность CYP3A4 оценивается по концентрации в биологических жидкостях эндогенных метаболитов, образующихся исключительно под действием CYP3A4, что исключает необходимость введения какого-либо ЛС и делает метод на 100% безопасным для пациента; при этом в качестве субстрата используется кортизол – стероидный гормон коры надпочечников» (Смирнов В.В. и др., 2010). Определение

активности CYP3A4 осуществляется по отношению концентрации 6-β-гидрокортизола к концентрации кортизола (метаболическое отношение 6β-гидрокортизол / кортизол), поскольку 6-β-гидрокортизол образуется только под влиянием изофермента CYP3A4. Таким образом, высокие значения показателя метаболического отношения соответствуют высокому уровню активности изофермента CYP3A4, а низкие – низкому уровню его активности. Описанный метод включён в российские Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств в качестве способа оценки активности CYP3A4 в условиях *in vivo* (Сычёв Д.А., 2009) и ранее успешно применялся в ряде проведённых исследований (Застрожин М.С., 2016; Иващенко Д.В., 2017).

Поскольку как кортизол, так и его эндогенный метаболит экскретируются почками, в ходе исследования у пациентов осуществлялся забор образцов утренней мочи в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры без добавления консерванта. Полученные образцы мочи замораживались при температуре -70° С и впоследствии транспортировались в лабораторию в переносном холодильнике.

В лаборатории осуществлялась разморозка образцов до комнатной температуры, после чего из каждого контейнера отбиралось по 2 мл мочи. В качестве метода пробоподготовки использовалась жидко-жидкостная экстракция. К отобраным 2 мл мочи добавлялось 4 мл экстрагента, которым выступала смесь этилацетат/изопропанол в объемном соотношении 85/15. Полученную смесь встряхивали в течение 10 минут для обеспечения полноты экстракции, после чего центрифугировали при скорости 3000 об./мин в течение 5 минут. Затем отделяли органический слой и повторно проводили ту же процедуру с водным слоем. После повторного отделения органического слоя его объединяли с ранее полученным, а в объединённый органический слой с целью очистки и улучшения экстракции добавляли 2 мл 1М раствора NaOH. Далее в течение 10 минут смесь встряхивали, а затем центрифугировали при скорости 3000 об./мин в течение 5

минут. После этого осуществлялось отделение органического слоя с последующим его упариванием на вакуумно-выпарительном аппарате. Полученный сухой остаток растворяли в 1 мл этилового спирта.

Определение концентраций 6-β-гидроксикортизола и кортизола осуществлялось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на жидкостном хроматографе фирмы «Agilent 1200 LC/MS» (США). В состав подвижной фазы входили:

- 1) 55% - вода, подкисленная HCOOH (в соотношении 1 мл муравьиной кислоты на 1 л воды);
- 2) 45% - ацетонитрил.

Аликвота вводилась в хроматограф в объеме 10 мкл; при этом, скорость потока подвижной фазы составляла 0,5 мл/мин. Температура обращённо-фазной колонки Waters (5 мкм; 4,6 × 150 мм) составляла 35° С. Длина волны ультрафиолетового детектора составляла 246 нм. Режим работы масс-детектора – сканирование в позитивной полярности. В качестве метода количественного определения использовался метод абсолютной калибровки.

2.3.3. Определение полиморфизмов *CYP3A4*22*, *CYP3A5*3*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* и *CYP2C19*17*

Для проведения генотипирования использовалась венозная кровь, собранная на шестые сутки после начала применения диазепама в вакуумные пробирки VACUETTE® (Greiner Bio-One, Австрия). Полученные образцы крови замораживались при температуре -70° С и впоследствии транспортировались в лаборатории в переносном холодильнике.

Определение полиморфных вариантов генов *CYP3A4*22* (*C>T intron 6*, *rs35599367*), *CYP3A5*3* (*6986A>G*, *rs776746*), *CYP2C19*2* (*681G>A*, *rs4244285*), *CYP2C19*3* (*636 G>A*, *rs4986893*) и *CYP2C19*17* (*-806C>T*, *rs12248560*) осуществлялось с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на детектирующих амплификаторах «DTlite» производства

компании «ДНК-Технология» и CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System с ПО CFX Manager от компании «Bio-Rad» (США) с применением коммерческих наборов реагентов «SNP-Скрин» (производитель: ООО «Синтол»). Каждый из наборов реактивов «SNP-Скрин» включал два аллель-специфичных зонда, что позволяло отдельно детектировать одновременно по два аллеля изучаемого полиморфизма на двух каналах флуоресценции. По результатам реакции на двух каналах определялось наличие каждого из аллелей.

Идентификация генетических полиморфизмов с помощью коммерческих наборов реагентов «SNP-Скрин» осуществлялась в несколько этапов, включавших выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови; проведение аллель-специфичной ПЦР; анализ и интерпретация результатов. Выделение геномной ДНК из цельной крови осуществлялось с использованием реагентов «ДНК-ЭКСТРАН-1». После этого осуществлялась аллель-специфичная ПЦР, в то время как параллельно с этим проводились две реакции амплификации с аллель-специфичными праймерами.

2.3.3.1. Анализ и интерпретация полученных результатов

Результаты анализа данных по выявлению однонуклеотидного генетического полиморфизма (ОНП, англ. Single nucleotide polymorphism, SNP) *C>T intron 6* гена *CYP3A4* (*rs35599367*), исходя из расположения кривых на графике, позволяют дать три типа заключений: нормальная гомозигота с генотипом *CC*, гетерозигота с генотипом *CT*, мутантная гомозигота с генотипом *TT*, что, в свою очередь, позволило отнести пациентов к группе медленных, промежуточных или распространённых метаболизаторов.

Анализ данных по выявлению SNP *6986A>G* гена *CYP3A5* (*rs776746*), согласно расположению кривых на графике, может дать три типа результатов: нормальная гомозигота с генотипом *AA*, гетерозигота с генотипом *AG*, мутантная гомозигота с генотипом *GG*, что, в свою очередь, позволило отнести пациентов к группе медленных, промежуточных или распространённых метаболизаторов.

Данные по определению SNP 681G>A гена *CYP2C19* (rs4244285), согласно расположению кривых на графике, может дать три типа результатов: нормальная гомозигота с генотипом GG, гетерозигота с генотипом GA, мутантная гомозигота с генотипом AA, что, в свою очередь, позволило отнести пациентов к группе медленных, промежуточных или распространённых метаболизаторов.

Анализ данных по определению SNP 636 G>A гена *CYP2C19* (rs4986893), согласно расположению кривых на графике, может дать три типа результатов: нормальная гомозигота с генотипом GG, гетерозигота с генотипом GA, мутантная гомозигота с генотипом AA, что, в свою очередь, позволило отнести пациентов к группе медленных, промежуточных или распространённых метаболизаторов.

Результаты анализа данных по выявлению SNP -806C>T гена *CYP2C19* (rs12248560), исходя из расположения кривых на графике, позволяют дать три типа заключений: нормальная гомозигота с генотипом CC, гетерозигота с генотипом CT, мутантная гомозигота с генотипом TT, что, в свою очередь, позволило отнести пациентов к группе быстрых, промежуточных или распространённых метаболизаторов.

2.3.4. Определение уровня микро-РНК

2.3.4.1. Выделение тотальной РНК из плазмы крови

Забор крови для проведения исследования осуществлялся в одноразовые стерильные вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Содержимое пробирки перемешивали, осторожно переворачивая, но не встряхивая. Пробирку с кровью центрифугировали с ускорением 2000 g в течение 10 минут, после чего отбирали супернатант и переносили его в стерильные полипропиленовые пробирки объёмом 1,5 или 2 мл. Полученные образцы хранили при температуре -80°C.

Экстракция суммарной РНК (включая микро-РНК) осуществлялась с использованием реагента Тризол (от компании «Life Technologies», США) и набора miRNeasy Mini Kit (от компании «Qiagen», Германия) в соответствии с

протоколом производителей. Тризол добавлялся к 500 мкл образцов плазмы в объемном соотношении 2:1. Затем в пробирку вносился хлороформ, после чего пробирку центрифугировали для разделения фаз. Полученную водную фазу переносили в новую пробирку и добавляли в неё 1,5 объема 100% этанола. Раствор, содержащий РНК, загружали в колонку miRNeasy и обрабатывали ДНКазой в соответствии с инструкциями производителя. Окончательный объем элюции составлял 15 мкл.

Концентрация и чистота полученной РНК оценивались с помощью спектрофотометра для микрообъемов NanoDrop 2000 (от компании «Thermo Fisher Scientific», США). Процесс выделения повторяли для каждого образца до получения достаточного количества РНК для следующих этапов.

2.3.4.2. Количественная оценка уровня экспрессии микро-РНК ПЦР-анализом в реальном времени

Обратная транскрипция выполнялась с использованием набора MiScript II RT Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендованным протоколом. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) использовали 300 нг суммарной РНК, выделенной из каждого образца, которую добавляли к реакционной смеси (4 мкл 5x miScript HiFlex Buffer, 2 мкл 10x miScript Nucleic Mix, 1 мкл miScript Reverse Transcriptase Mix и свободная от РНКаз вода до 20 мкл) и инкубировали при температуре 37°C в течение часа, с последующим увеличением температуры до 95°C на 5 минут для инактивации транскриптазы.

Экспрессия анализируемой микро-РНК и эндогенного контроля RNU6B определялась ПЦР-анализом в реальном времени в трех повторностях с использованием набора MiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) и пресинтезированных праймеров miScript Primer Assay (Qiagen) в объеме реакционной смеси 12 мкл (2 мкл полученной кДНК, 5 мкл 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 мкл 10x miScript Universal Primer, 1 мкл 10x miScript Primer Assay к анализируемым микро-РНК и свободная от РНКаз вода до 12 мкл).

ПЦР-анализ в реальном времени выполнялся с помощью аппарата CFX96 Real-Time PCR Detection System (от компании «Bio-Rad», США) по рекомендованной производителем программе (15 минут при 95°C для активации HotStarTaq DNA Polymerase и 40 трехступенчатых циклов (94°C - 15 сек., 55°C – 30 сек., 70°C – 30 сек.)).

2.3.5. Терапевтический лекарственный мониторинг

Калибровочные и контрольные образцы (QC) готовили из рабочих стандартных растворов путем растворения точной навески стандартного образца в метаноле с последующим разведением для получения требуемых концентраций.

Для построения калибровочной кривой готовили калибровочные образцы с концентрацией диазепама 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 нг/мл, а также контрольные образцы с концентрацией диазепама 5 (нижний предел количественного определения, НПКО, LLOQ), 15 (низкий QC), 1000 (средний QC), 1500 нг/мл (высокий QC). В качестве внутреннего стандарта (ВС) использовался диазепам в концентрации 250 нг/мл в ацетонитриле.

2.3.5.1. Пробоподготовка

Пробоподготовку плазмы крови проводили путём осаждения белков ацетонитрилом: в 1,5 мл пробирку вносили 200 мкл плазмы и 600 мкл ацетонитрила, содержащего ВС. Затем пробы встряхивали на вортексе в течение 10 мин, после чего центрифугировали с ускорением 14500 g в течение 10 мин при температуре 4°C. После этого полученный супернатант переносили в вials и помещали в автосамплер хроматографа. Исследование проводилось с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 (от компании «Agilent Technologies», США) и tandemного масс-селективного детектора Agilent 6460 (от компании «Agilent Technologies», США) с источником Jet Stream Electrospray Ionization.

2.3.5.2. Условия хроматографического анализа

В настоящем исследовании в качестве неподвижной фазы использовалась колонка Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7 мкм, 3,0 x 50 мм) с предколонкой InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2,7 мкм, 3,0 x 5,0 мм) (от компании «Agilent Technologies», США). Температура термостата колонок составляла 50°C.

Подвижная фаза включала элюент А (10 mM водный раствор формиата аммония с 0,1% муравьиной кислотой) и элюент В (метанол с 0,1% муравьиной кислотой). Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Элюирование происходило в градиентном режиме. В таблице 2.3 представлен градиент подвижной фазы по составу. Время анализа для каждого образца составляло 9,0 мин. Объем вводимой пробы составил 2 мкл. Время удерживания составило 4,75 мин для диазепама и 4,84 мин для внутреннего стандарта диазепама.

Таблица 2.3 – Градиент подвижной фазы элюента

Время анализа, мин	Объемная доля элюента А, %	Объемная доля элюента В, %
0,00	95	5
0,50	95	5
1,00	50	50
1,50	5	95
3,00	5	95
3,01	95	5
5,00	95	5

2.3.5.3. Условия масс-селективного определения

Масс-селективное детектирование осуществлялось посредством положительной электроспрейной ионизации. В режиме мониторинга множественных реакций (MRM) были выбраны переходы для диазепама с 349,0 m/z [M+H⁺] на 206,1 m/z (энергия в ячейке соударения 40 В) и с 349,0 m/z [M+H⁺]

на 184,0 m/z (энергия в ячейке соударения 32 В), для диазепама (внутренний стандарт) с 285,1 m/z [M+H⁺] на 193,1 m/z (энергия в ячейке соударения 32 В) и с 285,1 m/z [M+H⁺] на 154,1 m/z (энергия в ячейке соударения 24 В). Напряжение на фрагменторе для диазепама и внутреннего стандарта диазепама составляло 156 и 166 В, соответственно.

Напряжение на капилляре составляло 3.5 кВ, температура осушающего газа составляла 350°C, скорость потока азота – 6 л/мин. Давление на небулайзере составляло 45 psi, температура sheath gas составляла 375°C, а его скорость потока – 11 л/мин.

2.3.5.4. Валидация методики

Валидация биоаналитической методики осуществлялась в соответствии с руководством FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. Калибровочные кривые носили линейный характер во всем диапазоне определяемых концентраций 0,5 нг/мл – 2000 нг/мл. Полученные коэффициенты корреляции соответствуют норме (не менее 0,99). Точность и прецизионность исследовались внутри цикла и между циклами. Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20% на уровне НПКО, не более 15% - для остальных точек). Матричный эффект не оказывал влияния на ионизацию аналита.

2.3.6. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ полученных результатов работы осуществлялся посредством методов параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA v10.0 от компании «StatSoft Inc.» (США). Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$ (при статистической мощности $> 80\%$). Доверительный интервал (англ. confidence

interval, CI) включал интервал значений, в пределах которого находился ожидаемый результат исследуемого параметра с вероятностью, равной 95%.

Непрерывные (количественные) данные представлены в виде количества наблюдений, среднего арифметического, 95 % доверительного интервала (ДИ) для среднего (если не указано иное), стандартного отклонения, медианы, интерквартильного размаха (ИКР), минимума и максимума. Порядковые, категориальные и качественные данные представлены в виде абсолютных частот (количества наблюдений) и относительных частот (процентов).

Для сравнения качественных и порядковых показателей применялись точный критерий Фишера и критерий χ^2 Пирсона (хи-квадрат), для сравнения количественных показателей – t-критерий Стьюдента либо критерий Манна-Уитни (в зависимости от характера распределения количественных показателей). Нормальность распределения выборок оценивали с помощью W-теста Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test), однородность дисперсий - с помощью Т-теста Фишера (при сравнении двух выборок) или теста Левена (при сравнении нескольких выборок). При отсутствии равенства дисперсий между выборками t-критерий Стьюдента дополнялся поправкой Уэлча. Сравнение нескольких выборок непрерывных данных производили с помощью одно- или многофакторного дисперсионного анализа ANOVA/MANOVA (для нормально распределенных данных) или H-теста Краскелла-Уоллиса (для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения).

Для определения корреляции между непрерывными переменными вычисляли коэффициент корреляции Пирсона (для выборок, имеющих нормальный характер распределения) или ранговый коэффициент корреляции Спирмена (для выборок, имеющих ненормальный характер распределения). Коэффициент корреляции r от 0,3 до 0,7 при $p < 0,05$ означал положительную умеренную, но статистически значимую корреляцию между переменными; $r > 0,7$ при $p < 0,05$ – сильную и статистически значимую связь; отрицательное значение r соответствовало обратной корреляции.

2.4. Материал исследования

Для выявления различий в 2 балла по шкале CIWA-Ar с ошибкой первого рода на уровне 0,05 и показателем мощности 80%, принимая во внимание стандартное отклонение равным 3,5 балла, было необходимо включить в исследование не менее 50 человек в каждую группу (всего 100 человек).

В исследование были включены 100 пациентов мужского пола в возрасте от 25 до 62 лет, средний возраст составил $42,66 \pm 9,8$ лет.

Наследственная отягощённость по болезням зависимости была выявлена у 71 пациента (71%). Данные приведены в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Наследственная отягощённость

Родитель	Отец	Мать	Оба родителя
	Абс. (%), n = 100	Абс. (%), n = 100	Абс. (%), n = 100
Наследственная отягощённость алкогольной зависимостью	58	8	3
Наследственная отягощённость наркотической зависимостью	2	0	0
Итого	60	8	3

Таким образом, наследственная отягощённость болезнями зависимости встречалась преимущественно по линии отца (60%), причём, в подавляющем большинстве случаев была выявлена отягощённость алкогольной зависимостью, и лишь в двух случаях – наркотической зависимостью. По линии матери наследственная отягощённость выявлялась исключительно по алкогольной зависимости (8%).

Сведения, касающиеся социального статуса больных, приведены в таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Социальный статус больных

Характеристика	Абс. (%), n = 100
Работающие	54 (54)
Не работающие	46 (46)
Состоят в браке	69 (69)
Разведены	14 (14)
Холосты	17 (17)

Более половины пациентов на момент включения в исследование имели место работы (54%), большинство из них состояли в браке (69%).

В таблице 2.6 представлены структурированные данные анамнеза заболевания пациентов. Длительность злоупотребления алкоголем на момент обследования составила в среднем $16,95 \pm 8,01$ лет, при этом, длительность существования СОА составила $9,85 \pm 5,87$ лет. Средняя продолжительность запоев составила $10,38 \pm 4,33$ дня со «светлыми промежутками» длительностью $11,36 \pm 5,88$ дней.

Таблица 2.6 – Данные анамнеза заболевания

Анамнестические данные	n = 100
Длительность злоупотребления алкоголем, лет	$16,95 \pm 8,01$
Длительность существования СОА, лет	$9,85 \pm 5,87$
Средняя длительность одного запоя, дней	$10,38 \pm 4,33$
Средняя продолжительность «светлых промежутков», недель	$4,1 \pm 1,55$
Длительность последнего запоя, дней	$11,36 \pm 5,88$
Суточная толерантность, литров водки	$0,78 \pm 0,37$

Пациенты госпитализировались после многодневного периода злоупотребления алкоголем (в среднем, $11,36 \pm 5,88$ дней) и имели разную степень выраженности сомато-вегетативных, неврологических и психопатологических проявлений СОА. Последнее употребление алкоголя пациентами происходило накануне или утром в день поступления в стационар.

При первичном осмотре пациенты чаще всего жаловались на общую слабость, «внутренний дискомфорт», дрожь в руках или во всём теле, потливость, влечение к алкоголю, снижение настроения (часто – с ощущением сильной внутренней тревоги и беспокойства), снижение аппетита (вплоть до его полного отсутствия), а также нарушения сна в форме позднего засыпания или поверхностного сна с ранними пробуждениями, без чувства отдыха.

В неврологическом статусе пациентов наиболее часто отмечались шаткость и неустойчивость походки, нарушение координации произвольных мышечных движений, затруднения при выполнении координационных проб, неустойчивость в позе Ромберга, а также установочный горизонтальный нистагм, в более тяжёлых случаях наблюдалось присоединение симптомов мышечной дистонии, усиление рефлексов и появление патологических рефлексов.

В психическом статусе чаще всего обращали на себя внимание тревога, суестьливость, иногда – психомоторное возбуждение. В ряде случаев выявлялся дисфоричный фон настроения, проявлявшийся мрачностью, напряжённостью, раздражительностью, а также лёгкостью проявления агрессии и нетерпимости по отношению к окружающим. Помимо аффективной симптоматики, у пациентов часто отмечались неврозоподобные расстройства: психическая истощаемость, утомляемость и раздражительность.

Информация об имевшихся у пациентов осложнениях основного заболевания и сопутствующих хронических заболеваниях представлена в таблице 2.7.

Таблица 2.7 – Осложнения и сопутствующие заболевания

Нозологии	Абс., n = 100	%, n = 100
Токсическая энцефалопатия	49	49
Токсическая полинейропатия нижних конечностей	9	9
Токсическая кардиомиопатия	21	21
Артериальная гипертензия	30	30
Язвенная болезнь желудка	3	3
Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки	4	4

Как видно из таблицы, наиболее часто встречавшимися осложнениями основного заболевания являлись токсическая энцефалопатия (49%) и токсическая кардиомиопатия (21%), а самым частым сопутствующим заболеванием была артериальная гипертензия (30%).

Всем пациентам выполнялись рутинные лабораторные исследования; в таблице 2.8 приведены средние значения основных показателей биохимического анализа крови, выполненного в день госпитализации.

Таблица 2.8 – Основные показатели биохимического анализа крови

Показатели	Полученные значения	Референсные значения
Глюкоза, ммоль/л	5,1±1,15	4,10-5,90
Билирубин общий, мкмоль/л	20,05±11,51	3,0-17,1
ГГТ, ЕД/л	218,53±244,14	15,0-85,0
Мочевина, ммоль/л	3,36±1,23	2,5-8,3
Креатинин, мкмоль/л	77,55±11,38	62,0-115,0
АЛТ, ЕД/л	64,01±47,92	5,0-40,0
АСТ, ЕД/л	79,14±75,05	5,0-40,0

Выбранные показатели биохимического анализа крови являются не только лабораторными биомаркерами хронической алкогольной интоксикации, но и позволяют оценить тяжесть токсического поражения внутренних органов, в первую очередь – печени. Как показывают данные таблицы, полученные средние значения концентрации ГГТ превышают верхнюю границу нормы в 2,5 раза, а значения АЛТ и АСТ – в 1,5 и 2 раза, соответственно.

2.5. Этические аспекты исследования

Исследование выполнялось в соответствии с этическими принципами, приведёнными в Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (с изменениями, принятыми на 59-й Генеральной Ассамблее WMA в Сеуле (Южная Корея) в октябре 2008 г.) и ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика».

Исследуемое лекарственное средство (диазепам) зарегистрировано в Российской Федерации и разрешено к применению в клинической практике. Назначение исследуемого лекарственного средства осуществлялось в соответствии с инструкцией по медицинскому применению лекарственного препарата, а также с Приказом Минздрава России от 04.09.2012 г. №135н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при абстинентном состоянии, вызванном употреблением психоактивных веществ».

В ходе проведения исследования были предприняты необходимые меры предосторожности для защиты конфиденциальности информации, позволяющей идентифицировать субъектов исследования, и их личных данных.

Исследование одобрено Локальным Этическим Комитетом ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ», протокол № 07-17 от 28 ноября 2017 года.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование взаимосвязи между клиническими вариантами СОА и показателями эффективности и безопасности терапии

3.1.1. Определение клинических вариантов СОА

Выделение разных клинических вариантов СОА имеет высокую практическую ценность, поскольку указывает на имеющиеся у пациентов нарушения со стороны определённых органов, и, соответственно, позволяет лечащему врачу подобрать наиболее эффективную индивидуальную терапевтическую тактику, а кроме того, в рутинной практике может служить показателем тяжести СОА.

У пациентов, включенных в исследование, на основании особенностей клинической картины экспертно определялись четыре основных клинических варианта СОА: нейровегетативный, висцеральный, церебральный и психопатологический; распределение участников исследования представлено на рисунке 3.1.1.

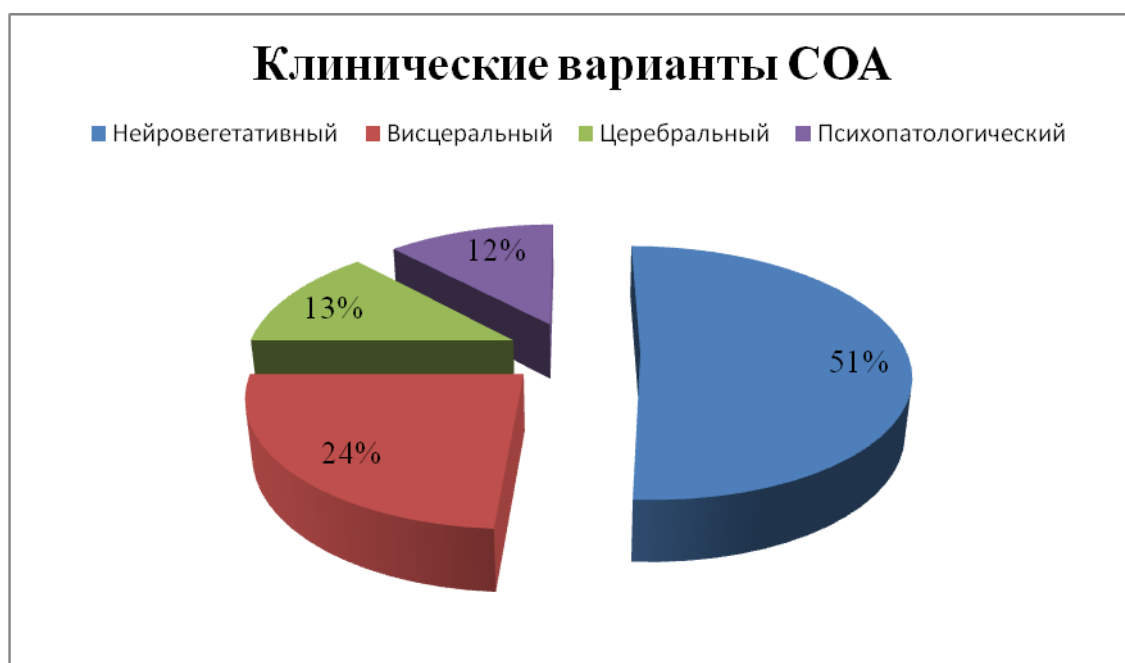


Рисунок 3.1.1 – Распределение клинических вариантов СОА

В большинстве случаев (51 участник, 51%) у пациентов встречался нейровегетативный вариант СОА, который проявлялся такими симптомами, как общая слабость, гипергидроз, расстройства сна и аппетита, тремор пальцев рук, языка и век, тахикардия, а также чувство жажды, сухость и неприятный вкус во рту.

У 24 участников (24%) был зарегистрирован висцеральный вариант СОА. При этом, у 13 из них в клинической картине обращали на себя внимание одышка, неприятные ощущения или боли в области сердца, нарушения сердечного ритма и высокие значения АД, что может объясняться имевшимися у этих пациентов нарушениями со стороны сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертония, алкогольная кардиомиопатия). В остальных 11 случаях ведущими симптомами являлись субиктеричность склер, тошнота, рвота, боли в животе, тяжесть в правом подреберье, метеоризм и жидкий стул. У этих пациентов отмечались сопутствующие заболевания органов желудочно-кишечного тракта: алкогольный панкреатит, хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки.

В 13 случаях (13%) был отмечен церебральный вариант СОА: пациенты жаловались на сильную головную боль, головокружение, гиперакузию и мышечные подёргивания.

В оставшихся 12 случаях (12%) был диагностирован психопатологический вариант СОА. В этих случаях отмечались выраженные психические расстройства: сильная тревога, беспокойство, неусидчивость, суетливость, страх (особенно в вечернее и ночное время), ощущение общей подавленности, снижение настроения и дисфория. Кроме того, у этих больных отмечались нарушения сна, варьировавшие от поверхностного ночного сна с частыми пробуждениями до тотальной бессонницы. В семи случаях пациенты жаловались на возникновение гипнагогических галлюцинаций, носивших устрашающий характер, и беспокойный сон с кошмарными сновидениями. Гипнагогические зрительные галлюцинации сопровождались ощущением «проваливания» пациента и

окружающих предметов. Кроме того, у этих пациентов наблюдались просоночные состояния по ночам, сопровождавшиеся временным нарушением ориентировки в месте: проснувшись в страхе, они не понимали, что с ними происходит, и где они находятся, а утром чувствовали себя истощёнными и жаловались на отсутствие чувства отдыха и разбитость.

3.1.2. Изучение ассоциации клинических вариантов СОА с тяжестью его проявлений, а также с показателями эффективности и безопасности терапии

В рамках проведённого исследования при сопоставлении клинических вариантов СОА, диагностированных у участников, с тяжестью СОА, оценённой по сумме баллов по шкале CIWA-Ar до лечения, было установлено, что у всех пациентов, независимо от клинического варианта, течение СОА было умеренно тяжёлым (16-20 баллов) и тяжёлым (свыше 20 баллов) (таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1 – Тяжесть СОА, оценённая по сумме баллов по шкале CIWA-Ar до лечения, у пациентов с разными клиническими вариантами СОА

Клинические варианты СОА	Медиана [Квартиль 1; Квартиль 3]	p-value*
Нейровегетативный	19,00 [18,00; 22,00]	<0,05
Висцеральный	23,00 [21,00; 24,00]	0,217
Церебральный	23,50 [20,75; 26,25]	0,05
Психопатологический	24,50 [22,00; 27,00]	<0,05

*p-value по результатам теста Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественное сравнение

Более низкие значения суммы баллов по шкале CIWA-Ar до лечения по сравнению с остальными вариантами СОА отмечались у пациентов с нейровегетативным вариантом СОА (19,00 [18,00; 22,00] vs 24,00 [21,00; 26,00], $p < 0,05$) (рисунок 3.1.2).

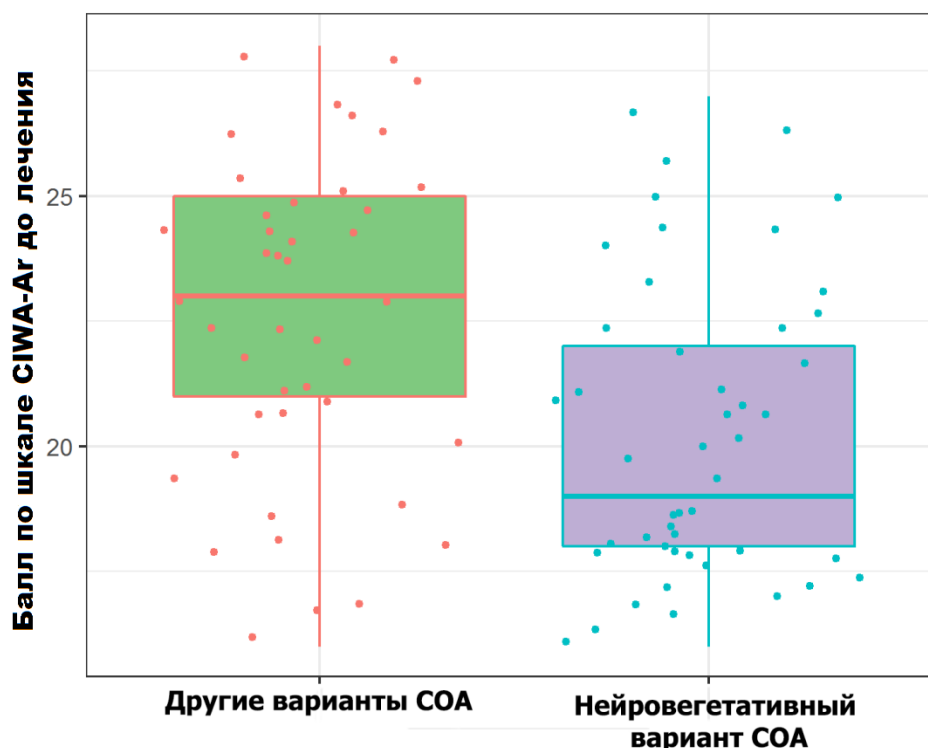


Рисунок 3.1.2 – Тяжесть СОА, оценённая по сумме баллов по шкале CIWA-Ar до лечения, у пациентов с нейровегетативным вариантом СОА в сравнении с остальными клиническими вариантами

У пациентов с висцеральным вариантом тяжесть СОА была более высокой (23,00 [21,00; 24,00] vs 21,00 [18,00; 24,50], $p = 0,217$). Наиболее тяжёлое течение СОА наблюдалось в случаях церебрального (сумма баллов по шкале CIWA-Ar до лечения по сравнению с остальными вариантами: 23,50 [20,75; 26,25] vs 21,00 [18,00; 24,00], $p = 0,05$) и психопатологического вариантов (сумма баллов по шкале CIWA-Ar до лечения по сравнению с остальными вариантами: 24,50 [22,00; 27,00] vs 21,00 [18,00; 24,00], $p = 0,012$).

На следующем этапе было проведено сопоставление клинических вариантов СОА с эффективностью проведённой терапии. Для этого был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включавший клинический вариант СОА и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы CIWA-Ar для пациентов с разными клиническими вариантами СОА представлены в таблице 3.1.2.

Таблица 3.1.2 – Данные шкалы CIWA-Ar у пациентов с разными клиническими вариантами СОА с 1-го по 6-й дни исследования

Клинические варианты СОА	Количество баллов по шкале CIWA-Ar					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
Нейровегетативный	19,04 [15,68; 25,62]	19 [15,75; 23,25]	18 [14,75; 23]	16,5 [13; 21]	15,5 [12; 19,25]	12,07 [8,84; 15,29]
Висцеральный	22,69 [16,09; 28,41]	17 [15; 21]	15 [14; 21]	12 [11; 19]	11 [9; 18]	10,48 [8,21; 11,18]
Церебральный	23,3 [17,89; 25,43]	16 [11,5; 19,5]	15 [9,5; 18]	12 [6; 17,5]	11 [3,5; 16]	12,2 [9,49; 15,65]
Психопатологический	25,26 [19,77; 28,12]	18,5 [16,5; 21,25]	17 [13,75; 19,5]	12 [9,5; 17,25]	9,5 [8; 17]	10,37 [7,46; 12,83]

На рисунке 3.1.3 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

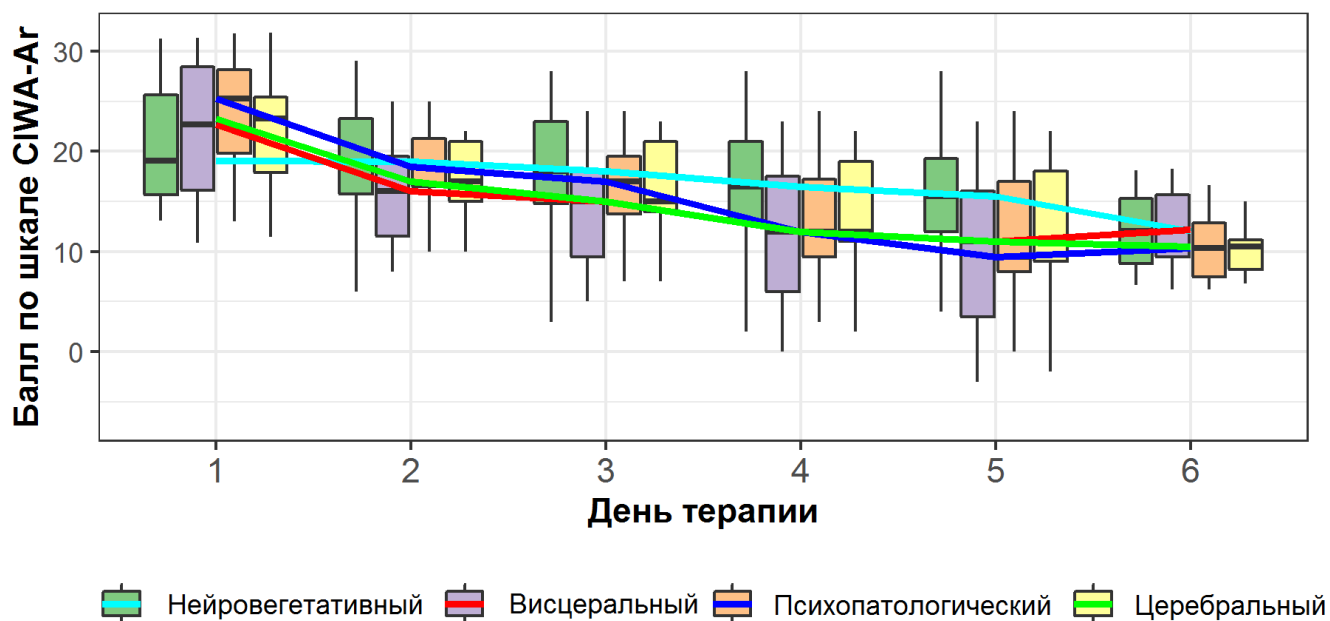


Рисунок 3.1.3 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными клиническими вариантами COA с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 3.1.3.

Таблица 3.1.3 – Результаты сравнения баллов по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными клиническими вариантами COA с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	p-value*
День	43,73	<0,001
Вариант COA	5,08	0,42
День + Вариант COA	1,06	0,38

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 43,73$, $p < 0,001$), в то время как для показателя клинического варианта COA статистически значимых различий выявлено не было ($F = 5,08$, $p = 0,42$).

Таким образом, по результатам проведённого исследования установлено, что наиболее лёгкое течение СОА отмечалось в группе пациентов с диагностированным нейровегетативным его вариантом по сравнению с остальными участниками, в то время как наиболее тяжёлое течение СОА наблюдалось в случаях церебрального и особенно – психопатологического вариантов. Это подтверждает уже известные ранее приведённые литературные данные (Альтшулер В.Б., 2010; Гофман А.Г., 2012; Кибитов А.О., Чупрова Н.А., 2015).

Кроме того, в исследовании показано отсутствие статистически значимых различий по показателю эффективности терапии (оценённой по динамике баллов по шкале CIWA-Ar) у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Изучение профиля безопасности терапии диазепамом пациентов с СОА позволило выявить следующие НЛР типа А (предсказуемые реакции, часто возникающие, зависящие от дозы): психические побочные эффекты, такие как астения/вялость/повышенная утомляемость, сонливость/седация, увеличение продолжительности сна, нарушения концентрации, нарушения памяти в форме ухудшения кратковременной памяти и антероградной амнезии, а также эмоциональная индифферентность; неврологические и вегетативные побочные эффекты, такие как нарушения аккомодации, сухость во рту, тошнота, ортостатизм, запоры, учащенное сердцебиение/тахикардия, усиление мочеиспускания, головные боли.

Все из указанных НЛР приведены в инструкции по медицинскому применению лекарственного средства «Диазепам» в качестве возможных нежелательных реакций. Анализ по шкале Наранжо показал наличие высокой степени достоверности причинно-следственной связи между введением пациентам диазепама и зафиксированными НЛР.

По результатам анализа не было выявлено статистически значимых различий в частоте встречаемости НЛР типа А у пациентов с разными вариантами СОА.

Исследование динамики баллов по шкале оценки выраженности НЛР UKU, с помощью которой оценивалась выраженность каждой НЛР, проводилось посредством двухфакторного дисперсионного анализа, включавшего клинический вариант СОА и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы оценки выраженности НЛР UKU для пациентов с разными клиническими вариантами СОА представлены в таблице 3.1.4.

Таблица 3.1.4 – Данные шкалы оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными клиническими вариантами СОА с 1-го по 6-й дни исследования

Клинические варианты СОА	Количество баллов по шкале UKU					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
Нейровегетативный	0 [0; 0]	3 [2; 3,25]	4 [3; 5]	6,5 [4; 7,25]	9 [6; 10]	9 [6; 10]
Висцеральный	0 [0; 0]	2 [2; 3]	3 [3; 4]	5 [4; 6]	7 [6; 9]	7 [6; 9]
Церебральный	0 [0; 0]	3 [2; 3]	4 [3; 5]	6 [5; 7]	9 [7; 9]	9 [7; 9]
Психопатологический	0 [0; 0]	2 [2; 3]	3,5 [3; 4]	5,5 [4,75; 6]	7,5 [6,75; 8]	7,5 [6,75; 8]

На рисунке 3.1.4 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

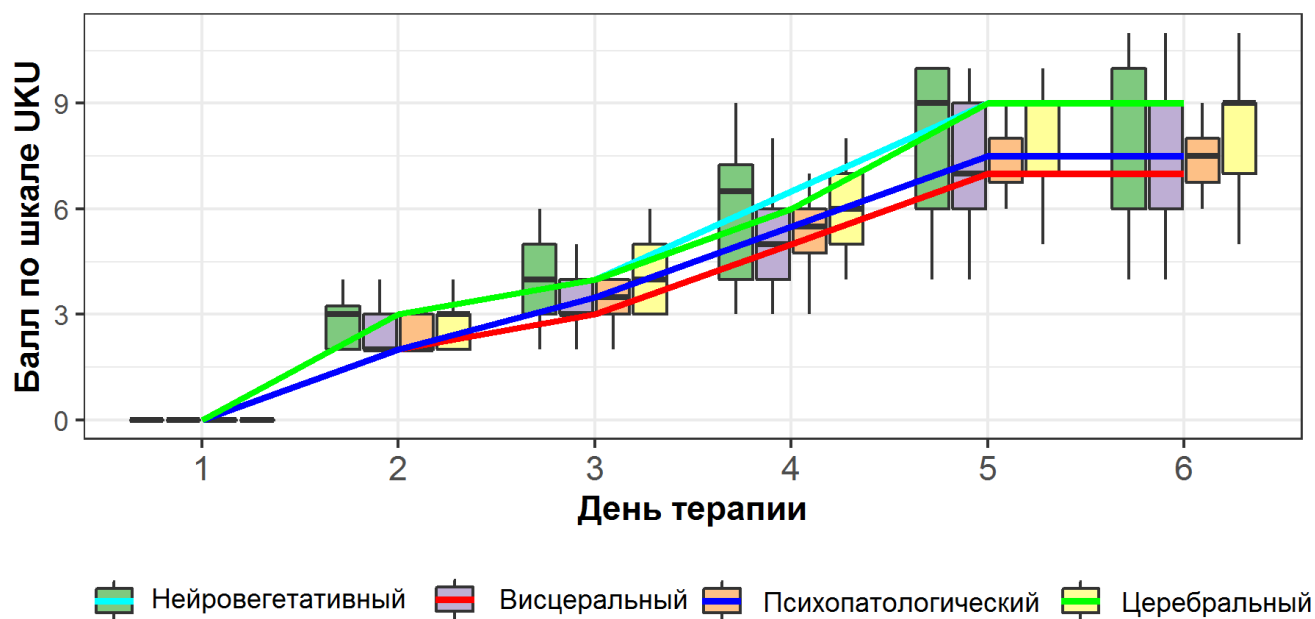


Рисунок 3.1.4 – Динамика симптоматики по шкале оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными клиническими вариантами СОА с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 3.1.5.

Таблица 3.1.5 – Результаты сравнения баллов по шкале UKU у пациентов с разными клиническими вариантами СОА с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	p-value*
День	442,35	<0,001
Вариант СОА	8,84	0,48
День + Вариант СОА	0,63	0,16

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 442,35$, $p < 0,001$), в то время как для показателя клинического варианта СОА статистически значимых различий выявлено не было ($F = 8,84$, $p = 0,48$).

Таким образом, установлено, что у пациентов с разными клиническими вариантами СОА, независимо от исходной тяжести его проявлений, отсутствуют статистически значимые различия в показателях эффективности и безопасности терапии диазепамом. Из этого было сделано предположение о том, что у этих пациентов эффективность и безопасность фармакотерапии может зависеть от генетических факторов, которые оказывают влияние на фармакокинетику и фармакодинамику диазепама. Для того чтобы выявить особенности метаболизма диазепама у пациентов с различными клиническими вариантами СОА и найти общие закономерности, был проведен следующий этап диссертационного исследования.

3.2. Фармакогенетическое исследование эффективности и безопасности терапии диазепамом у пациентов с СОА

3.2.1. Изучение влияния полиморфизмов *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* и *CYP2C19*17* на эффективность и безопасность терапии диазепамом

По результатам генотипирования *CYP2C19* по полиморфному маркеру $681G>A$ ($rs4244285$) у 100 испытуемых, были получены следующие данные:

- Количество пациентов, являющихся носителями немутантного генотипа *CYP2C19*2* (генотипа *GG*), составило – 79 (79%);
- Количество пациентов, являющихся носителями генотипов *GA* или *AA*, составило – 21 (21%).

Распределение генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга для европейской популяции (результат теста $\chi^2 = 2,18$, $p < 0,001$).

Значимых различий в клинико-демографических характеристиках, данных анамнеза и лабораторных показателях между носителями разных генотипов установлено не было.

По результатам статистического анализа отсутствовала разница в частотах генотипов по полиморфному маркеру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19* у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Для изучения эффективности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркеру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы CIWA-Ar для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19* представлены в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1 – Данные шкалы CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале CIWA-Ar					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
GG	21 [18; 24]	14 [12; 16]	14 [11; 16]	13 [10; 14.75]	12 [10; 14]	13 [10; 15]
GA + AA	24 [22; 26]	19 [16; 22]	17 [14; 19]	14 [11; 16]	12 [9; 14]	12 [9; 14]

На рисунке 3.2.1 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19*.

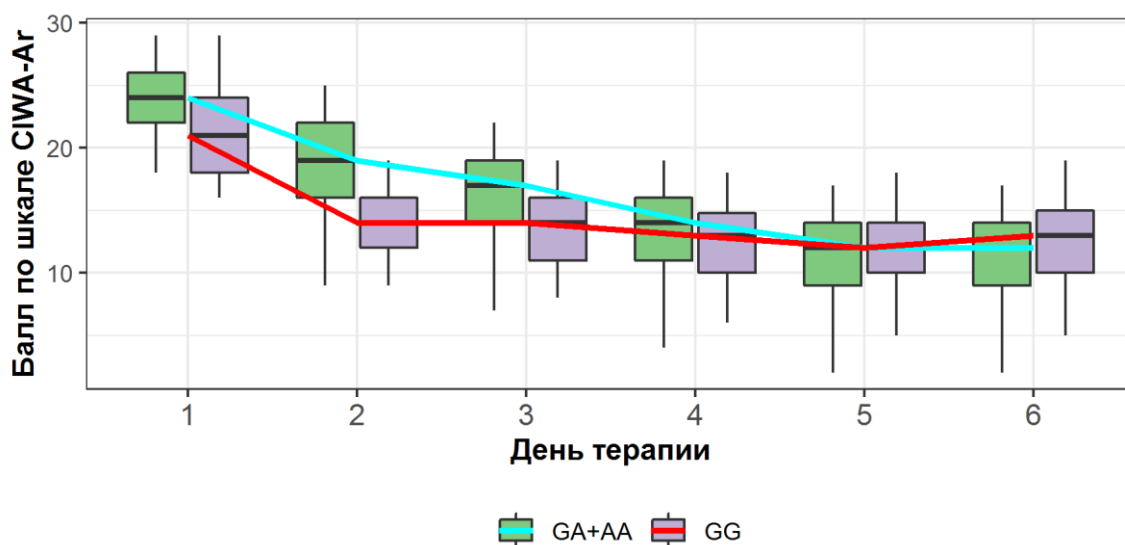


Рисунок 3.2.1 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 3.2.2.

Таблица 3.2.2 – Результаты сравнения баллов по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	P-value*
День	114,93	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру 681G>A (<i>rs4244285</i>)	10,60	<0,001
День + Генотип по полиморфному маркёру 681G>A (<i>rs4244285</i>)	7,79	<0,001

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 114,93$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 10,60$, $p < 0,001$).

Проведённый анализ безопасности терапии не позволил выявить статистически значимых различий в частоте встречаемости НЛР типа А у пациентов с разными генотипами. Однако сравнение баллов шкалы UKU, с помощью которой оценивалась выраженность каждой НЛР, позволило получить статистически значимые результаты.

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы UKU для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19* представлены в таблице 3.2.3.

Таблица 3.2.3 – Данные шкалы оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале UKU					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
GG	0 [0; 0]	3 [3; 4]	4 [4; 5]	6 [5; 7]	7 [6; 8]	7 [6; 8]
GA + AA	0 [0; 0]	3 [3; 3]	5 [4; 5]	7 [7; 7]	10 [9; 10]	10 [9; 10]

На рисунке 3.2.2 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19*.

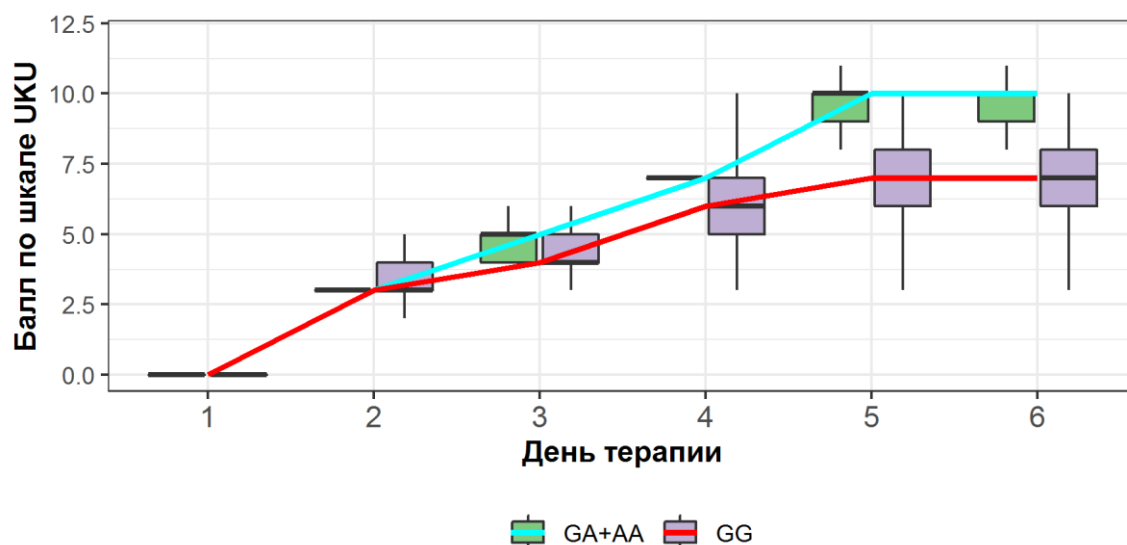


Рисунок 3.2.2 – Динамика симптоматики по шкале оценки выраженности НЛР (UKU) у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 3.2.4.

Таблица 3.2.4 – Результаты сравнения баллов по шкале UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	P-value*
День	516,60	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру 681G>A (<i>rs4244285</i>)	79,09	<0,001
День + Генотип по полиморфному маркёру 681G>A (<i>rs4244285</i>)	14,54	<0,001

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 516,60$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 79,09$, $p < 0,001$).

Полученные результаты подтверждаются данными терапевтического лекарственного мониторинга. Так, было установлено, что показатель концентрации диазепама в плазме крови у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19* имеет статистически значимые отличия ((GG) 199,83 [82,92; 250,58] vs (GA+AA) 313,47 [288,99; 468,33], $p=0,040$). Сравнение значений уровня концентрации диазепама в плазме крови у пациентов с разными генотипами представлено на рисунке 3.2.3.

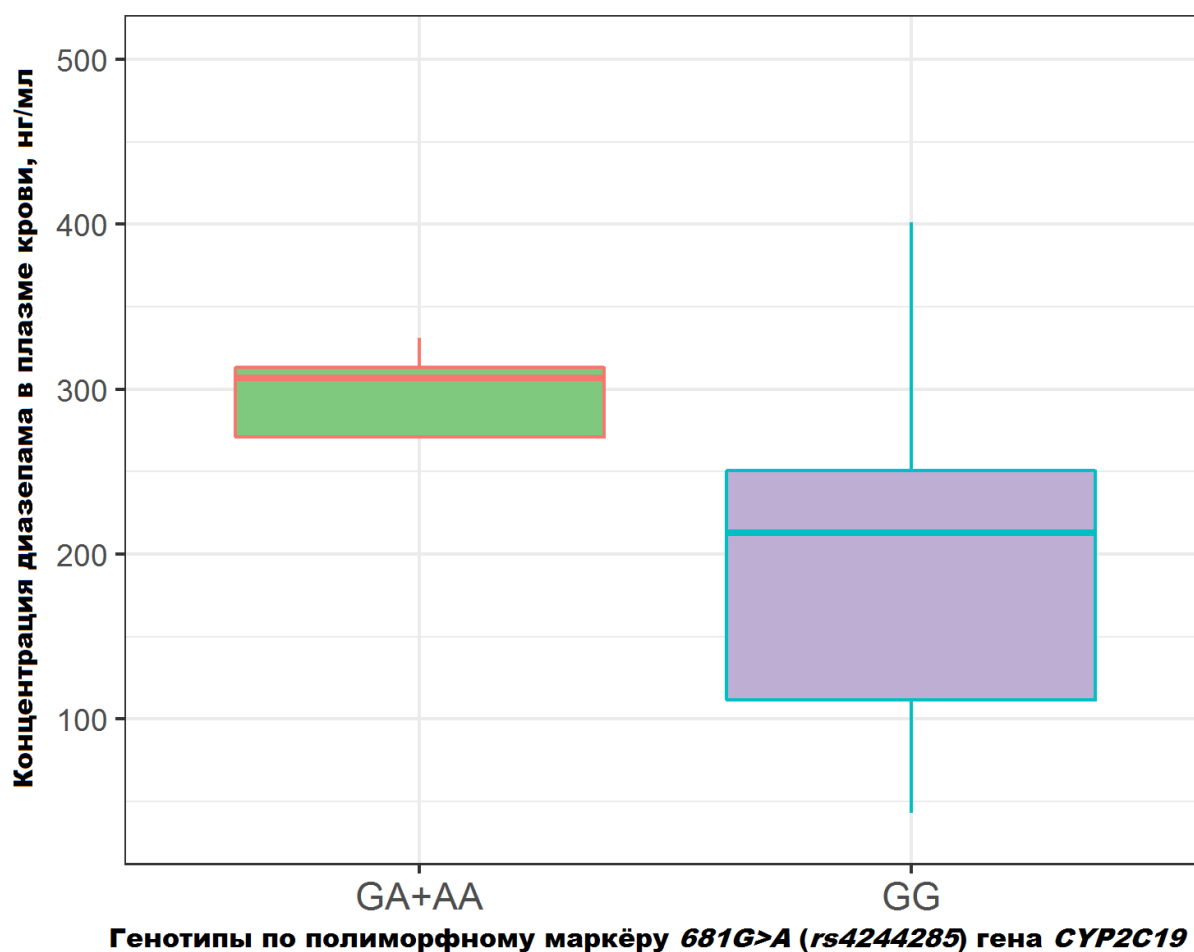


Рисунок 3.2.3 – Динамика уровня концентрации диазепама в плазме крови у пациентов с разными генотипами

Проведённое фармакокинетическое исследование выявило, что показатель концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $681G>A$ ($rs4244285$) гена *CYP2C19* также имеет

статистически значимые отличия ((GG) 2,80 [0,73; 3,80] vs (GA+AA) 5,33 [5,14; 6,00], $p=0,003$). Сравнение значений уровня концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами представлено на рисунке 3.2.4.

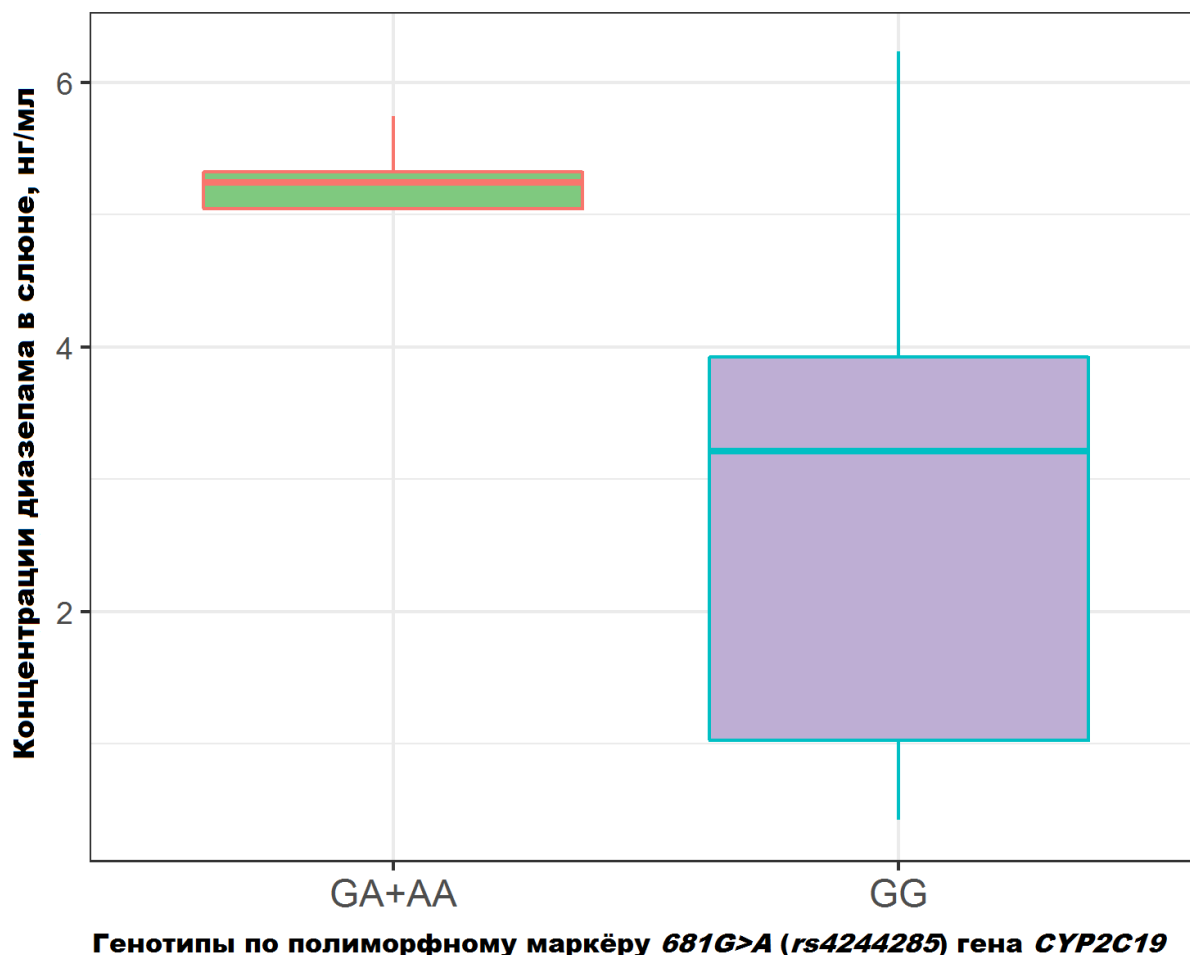


Рисунок 3.2.4 – Динамика уровня концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами

Таким образом, у носителей генотипов GA и AA по полиморфному маркёру 681G>A гена CYP2C19 отмечено повышение уровня концентрации препарата в плазме крови и его концентрации в слюне, что, вероятно, связано с замедлением скорости биотрансформации и элиминации диазепама. Это может привести к повышению риска развития НЛР у таких пациентов. Соответственно, с целью снижения данного риска у таких пациентов необходимо снижение стартовой дозы диазепама.

По результатам генотипирования *CYP2C19* по полиморфному маркёру 636 *G>A* (*rs4986893*) у 100 испытуемых, были получены следующие данные:

- Количество пациентов, являющихся носителями немутантного генотипа *CYP2C19*2* (генотипа *GG*), составило – 100 (100%).

Поскольку полиморфизм *CYP2C19*3* был невариативен (все 100 участников исследования оказались носителями «дикого» генотипа *GG*), в дальнейший анализ включались только различия по генотипам *CYP2C19*2* и *CYP2C19*17*.

По результатам генотипирования *CYP2C19* по полиморфному маркёру -806*C>T* (*rs12248560*) у 100 испытуемых, были получены следующие данные:

- Количество пациентов, являющихся носителями немутантного генотипа *CYP2C19*17* (генотипа *CC*), составило – 65 (65%);
- Количество пациентов, являющихся носителями генотипов *CT* или *TT*, составило – 35 (35%).

Распределение генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга для европейской популяции (результат теста $\chi^2 = 0,39$, $p < 0,001$).

Клиническо-демографические характеристики, анамнестические данные и лабораторные показатели между носителями разных генотипов значимо не различались. По результатам статистического анализа отсутствовала разница в частотах генотипов по полиморфному маркёру -806*C>T* (*rs12248560*) гена *CYP2C19* у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Для изучения эффективности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру -806*C>T* (*rs12248560*) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы CIWA-Ar для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру -806*C>T* (*rs12248560*) гена *CYP2C19* представлены в Таблице 3.2.5.

Таблица 3.2.5 – Данные шкалы CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале CIWA-Ar					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
CC	22 [18,75; 25]	14 [11; 16]	14 [10,75; 16]	12 [9; 14]	11 [8; 13]	12 [8; 14]
CT + TT	21 [18; 24]	19 [15; 20]	17 [14,5; 19,5]	15 [13; 17,5]	14 [12; 16,5]	14 [12; 16,5]

На рисунке 3.2.5 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $-806C>T$ ($rs12248560$) гена *CYP2C19*.

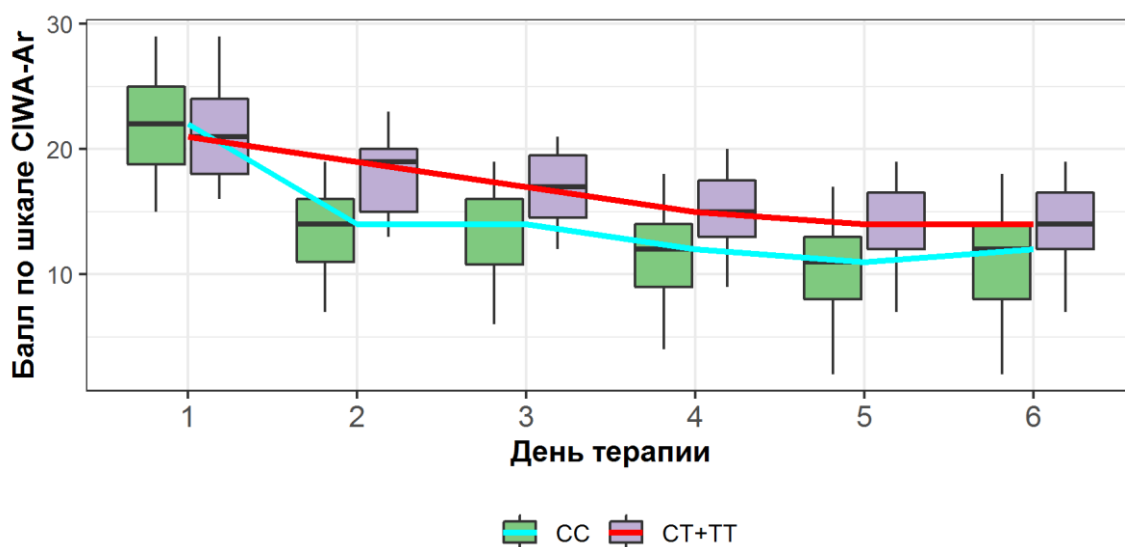


Рисунок 3.2.5 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведенного двухфакторного дисперсионного анализа представлены в Таблице 3.2.6.

Таблица 3.2.6 – Результаты сравнения баллов по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	P-value*
День	118,13	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру -806C>T (rs12248560)	99,22	<0,001
День + Генотип по полиморфному маркёру -806C>T (rs12248560)	6,58	<0,001

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 118,13$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 99,22$, $p < 0,001$).

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру -806C>T (rs12248560) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы UKU для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру -806C>T (rs12248560) гена *CYP2C19* представлены в таблице 3.2.7.

Таблица 3.2.7 – Данные шкалы оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале UKU					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
CC	0 [0; 0]	4 [3; 4]	5 [4; 5]	7 [6; 8]	8 [7; 9]	8 [7; 9]
CT + TT	0 [0; 0]	2 [2; 3]	3 [3; 4]	4 [4; 6]	6 [6; 8]	6 [6; 8]

На рисунке 3.2.6 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $-806C>T$ ($rs12248560$) гена *CYP2C19*.

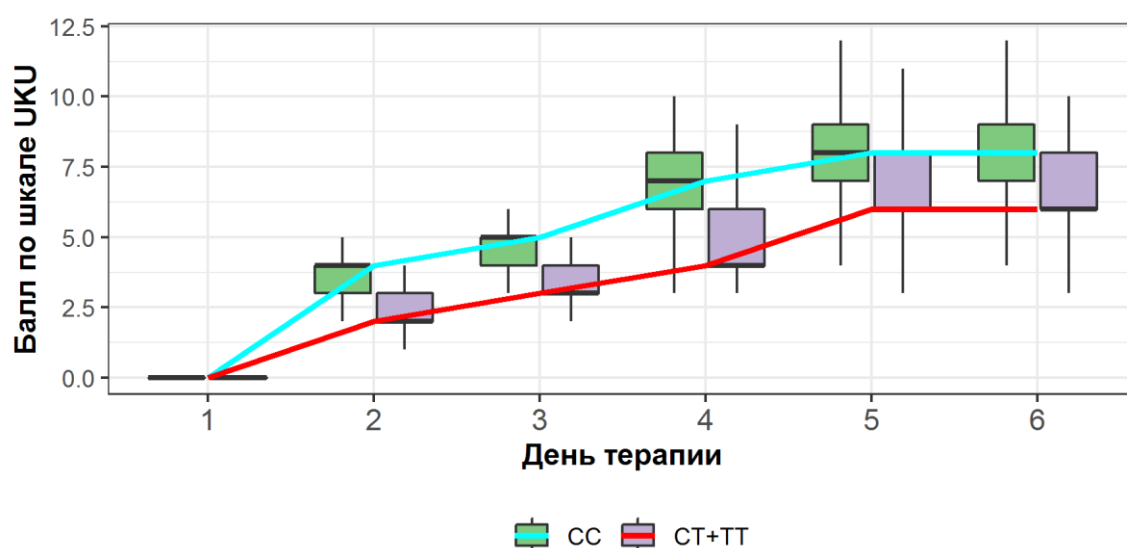


Рисунок 3.2.6 – Динамика симптоматики по шкале оценки выраженности НЛР (UKU) у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 3.2.8.

Таблица 3.2.8 – Результаты сравнения баллов по шкале UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	P-value*
День	442,84	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру $-806C>T$ ($rs12248560$)	124,46	<0,001
День + Генотип по полиморфному маркёру $-806C>T$ ($rs12248560$)	5,65	<0,001

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 442,84$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 124,46$, $p < 0,001$).

Эти результаты также подтверждаются данными терапевтического лекарственного мониторинга. Его результаты показали, что уровень концентрации диазепама в плазме крови у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру $-806C>T$ ($rs12248560$) гена *CYP2C19* имеет статистически значимые отличия ((*CC*) 250,70 [213,34; 308,53] vs (*CT+TT*) 89,12 [53,26; 178,07], $p=0,002$). Сравнение значений уровня концентрации диазепама в плазме крови у пациентов с разными генотипами представлено на рисунке 3.2.7.

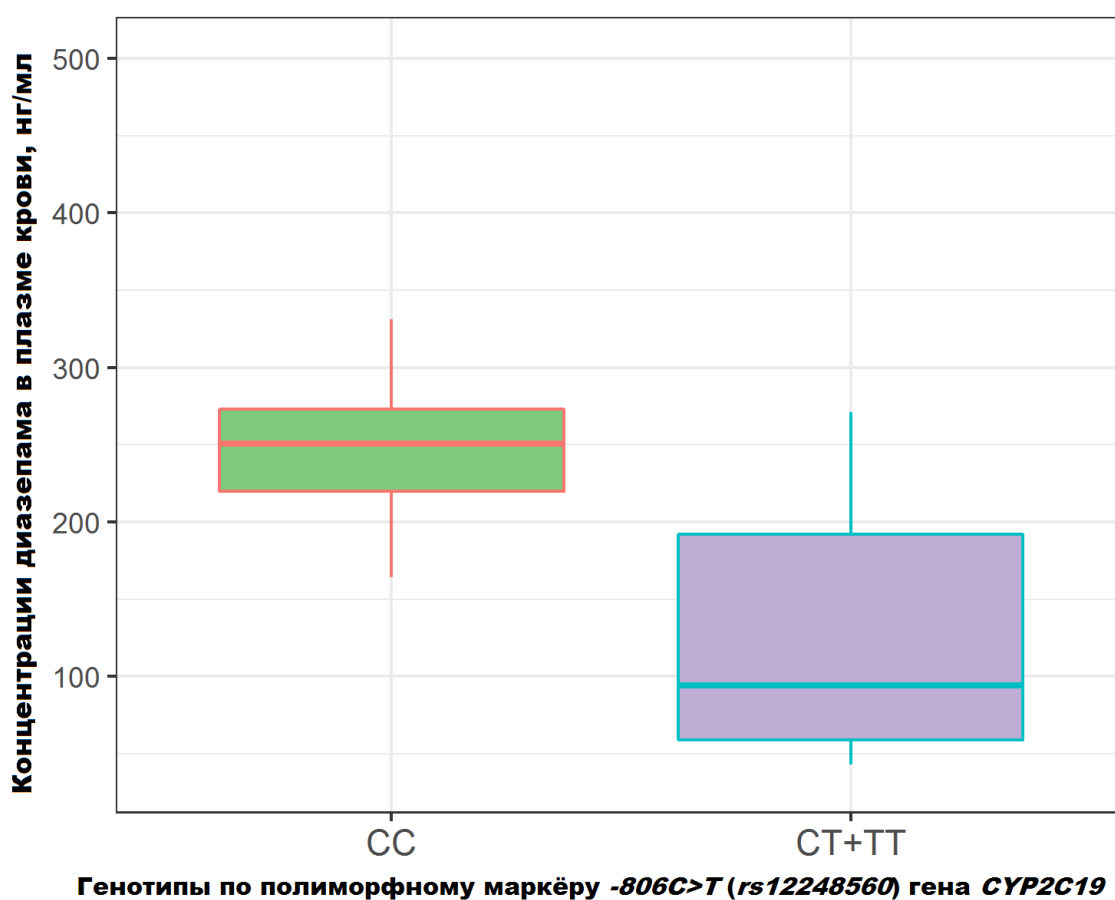


Рисунок 3.2.7 – Динамика уровня концентрации диазепама в плазме крови у пациентов с разными генотипами

Проведённое фармакокинетическое исследование выявило, что показатель концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $-806C>T$ ($rs12248560$) гена *CYP2C19* также имеет статистически значимые отличия ((*CC*) 3,86 [3,22; 5,12] vs (*CT+TT*) 0,79 [0,44; 1,56], $p=0,003$). Сравнение значений уровня концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами представлено на рисунке 3.2.8.

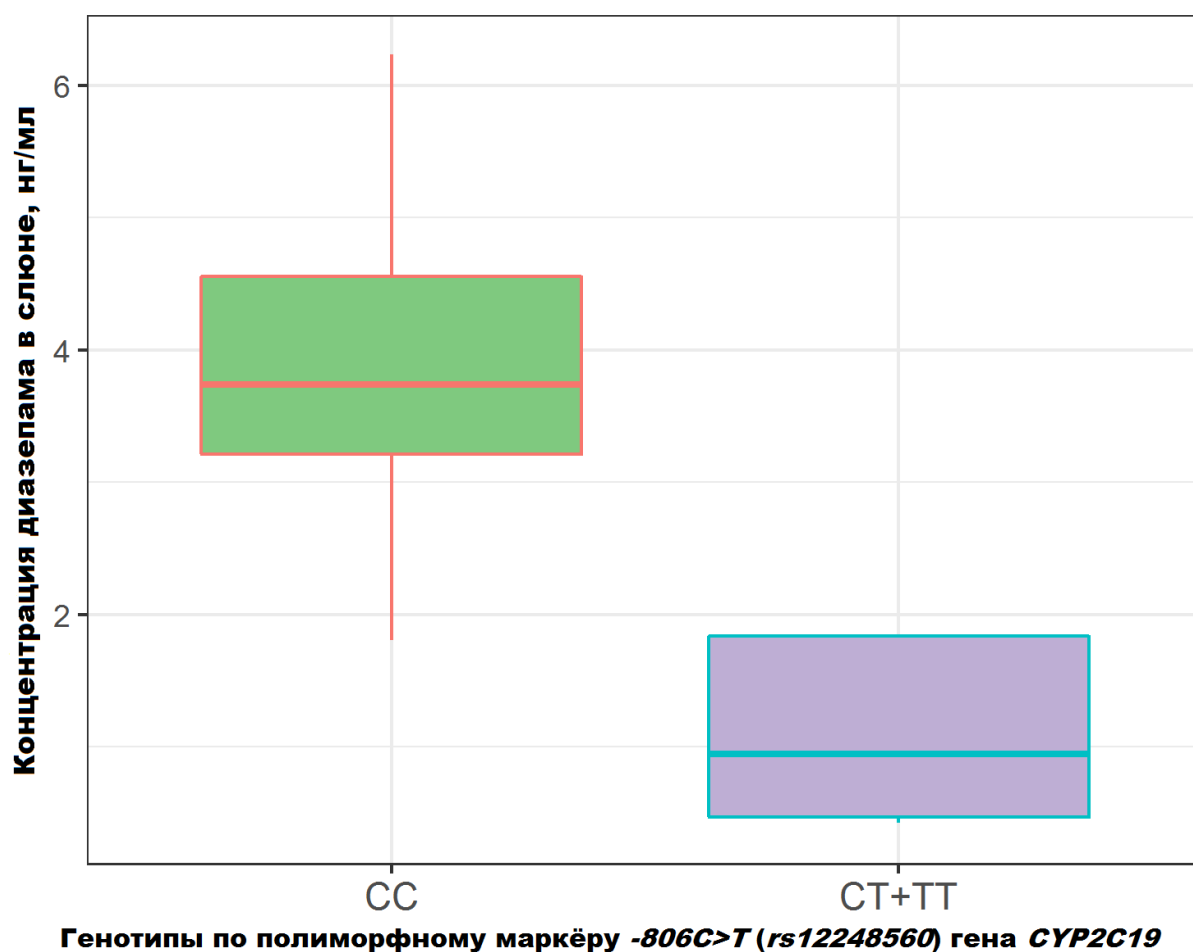


Рисунок 3.2.8 – Динамика уровня концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами

Как показано на рисунке, у носителей «дикого» генотипа отмечен более высокий уровень концентрации диазепама в плазме крови и в слюне, что,

вероятно, связано с ускорением биотрансформации диазепама у носителей минорного аллеля *T*.

Таким образом, по результатам исследования было статистически показано, что профиль эффективности и безопасности диазепама у пациентов с СОА различался у пациентов с разными генотипами по полиморфным маркерам $681G>A$ (*rs4244285*) и $-806C>T$ (*rs12248560*) гена *CYP2C19*.

Эффективность терапии диазепамом у пациентов с СОА, являющихся носителями разных генотипов по полиморфному маркеру $681G>A$ (*rs4244285*) гена *CYP2C19*, статистически значимо отличалась: разница баллов по шкале CIWA-Ar в динамике у пациентов с генотипом *GG* была ниже, чем у пациентов с генотипами *GA* и *AA*. Это может быть обусловлено сниженной активностью изофермента *CYP2C19* у пациентов, являющихся носителями генотипов *GA* и *AA*, что, в свою очередь, приводит к замедлению биотрансформации диазепама, его накоплению в плазме и более выраженному терапевтическому эффекту.

У пациентов, являющихся носителями генотипов *GA* и *AA* по тому же полиморфному маркеру, отмечалось более быстрое нарастание баллов по шкале UKU в динамике, что свидетельствует о том, что у этих пациентов терапия диазепамом сопряжена с развитием более выраженных нежелательных реакций, чем у носителей генотипа *CC*. Вероятнее всего, это может быть связано с замедлением активности изофермента *CYP2C19* у носителей минорного аллеля *A* по полиморфному маркеру $681G>A$ (*rs4244285*) гена *CYP2C19*. Снижение активности изофермента *CYP2C19* приводит к замедлению биотрансформации диазепама, что обуславливает нарастание плазменной концентрации ЛС и, в свою очередь, приводит к тому, что до рецепторов-мишеней доходит больше ЛС, что повышает риск развития НЛР.

У носителей разных генотипов по полиморфному маркеру $-806C>T$ (*rs12248560*) гена *CYP2C19* также было выявлено статистически значимые различия в параметрах эффективности и безопасности терапии диазепамом. У носителей генотипов *CT* и *TT*, отмечалось более медленное нарастание баллов по

шкале UKU в динамике, что свидетельствует о том, что у этих пациентов терапия диазепамом сопряжена с меньшей вероятностью развития нежелательных реакций, чем у носителей генотипа *CC*. Вероятнее всего, это может быть связано с увеличением активности изофермента CYP2C19 у носителей минорного аллеля *T* по полиморфному маркёру *-806C>T (rs12248560)* гена *CYP2C19*. В то же время, эффективность терапии диазепамом у пациентов с СОА, являющихся носителями разных генотипов по данному полиморфному маркёру, также статистически значимо отличалась: разница баллов по шкале CIWA-Ar в динамике у пациентов с генотипом *CC* была выше, чем у пациентов с генотипами *CT* и *TT*. Это предположительно связано с повышенной активностью CYP2C19 у пациентов, являющихся носителями генотипов *CT* и *TT*.

3.2.2. Изучение влияния полиморфизма генов *CYP3A4*22* и *CYP3A5*3* на эффективность и безопасность терапии диазепамом

По результатам генотипирования *CYP3A4* по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* у 100 испытуемых, были получены следующие данные:

- Количество пациентов, являющихся носителями генотипа *CC*, составило – 92 (92%);
- Количество пациентов, являющихся носителями генотипов *CT* или *TT*, составило – 8 (8%).

Распределение генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга для европейской популяции (результат теста $\chi^2 = 3,44$, $p < 0,001$).

Между носителями разных генотипов не было выявлено значимых различий в клинико-демографических характеристиках, данных анамнеза и лабораторных показателях.

По результатам статистического анализа отсутствовала разница в частотах генотипов по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4* у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Для изучения эффективности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру $C>T$ *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4* и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы CIWA-Ar для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $C>T$ *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4* представлены в таблице 3.2.9.

Таблица 3.2.9 – Данные шкалы CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале CIWA-Ar					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
CC	22 [18; 24,5]	17 [15; 21]	16 [14; 19]	14 [11,5; 16,5]	13 [10; 15]	13 [10; 15]
CT + TT	20,5 [18,75; 25,5]	11,5 [10,75; 14,75]	10,5 [9,75; 14,25]	8 [7,75; 13]	7 [7; 11]	7 [7; 12]

На рисунке 3.2.9 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру $C>T$ *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4*.

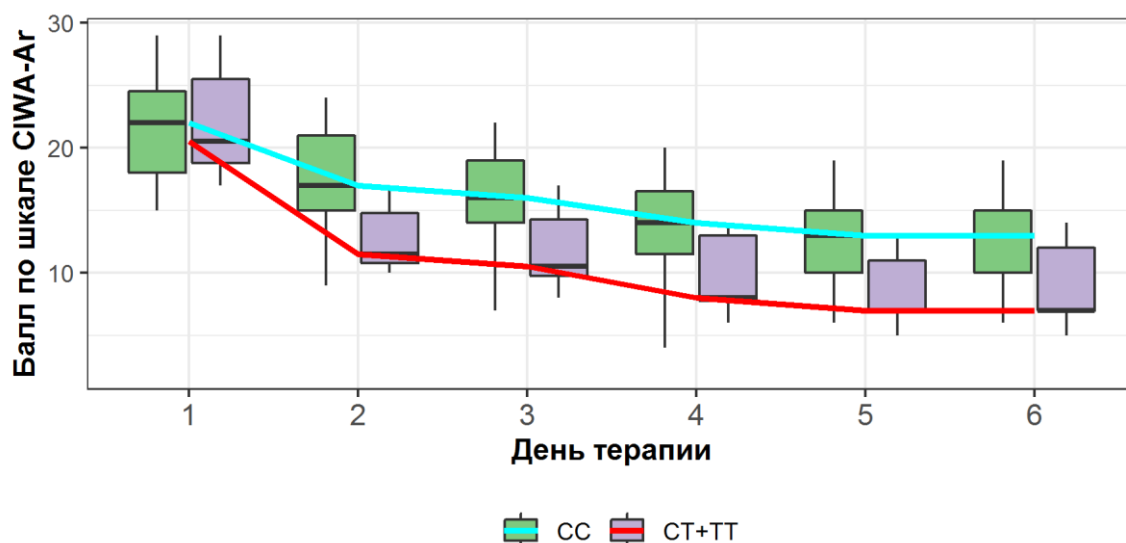


Рисунок 3.2.9 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведенного двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 3.2.10.

Таблица 3.2.10 – Результаты сравнения баллов по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	P-value*
День	101,93	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру <i>C>T intron 6 (rs35599367)</i>	47,39	<0,001
День + Генотип по полиморфному маркёру <i>C>T intron 6 (rs35599367)</i>	2,12	<0,05

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 101,93$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 47,39$, $p < 0,001$).

При проведении анализа безопасности терапии статистически значимых различий в частоте встречаемости НЛР типа А у пациентов с разными генотипами выявлено не было. При этом сравнение баллов шкалы UKU, с помощью которой оценивалась выраженность каждой НЛР, позволило получить статистически значимые результаты.

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4* и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы UKU для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4* представлены в таблице 3.2.11.

Таблица 3.2.11 – Данные шкалы оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале UKU					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
<i>CC</i>	0 [0; 0]	3 [2; 3]	4 [3; 4]	6 [4; 7]	8 [6; 9]	8 [6; 9]
<i>CT + TT</i>	0 [0; 0]	4 [4; 5]	6 [5,75; 7]	8 [7,75; 10]	10 [9,5; 12]	10 [9,5; 12]

На рисунке 3.2.10 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4*.

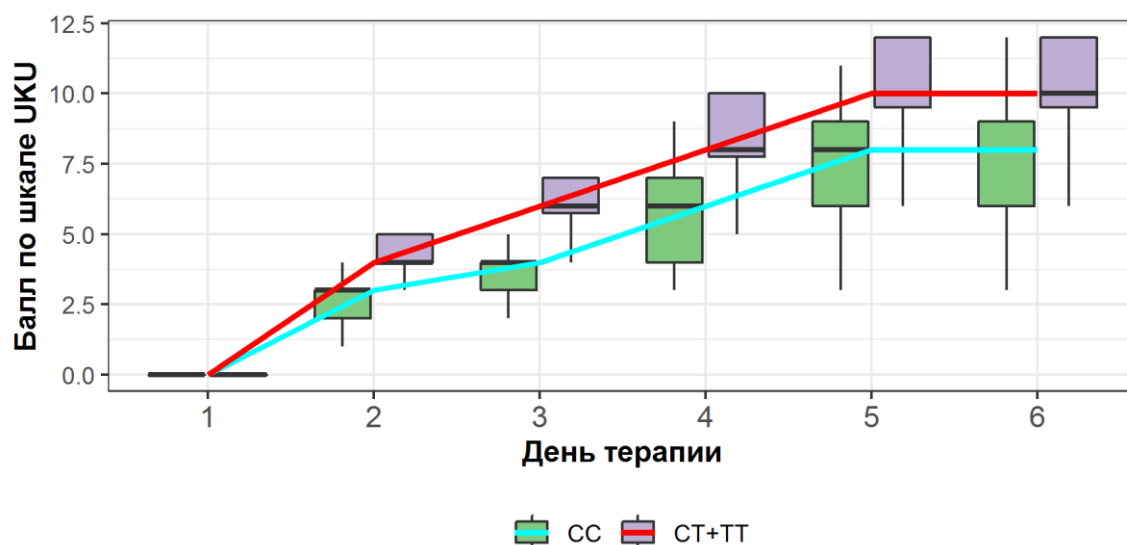


Рисунок 3.2.10 – Динамика симптоматики по шкале оценки выраженности НЛР (UKU) у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в Таблице 3.2.12.

Таблица 3.2.12 – Результаты сравнения баллов по шкале UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	P-value*
День	489,18	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру <i>C>T intron 6 (rs35599367)</i> гена <i>CYP3A4</i>	100,11	<0,001
День + Генотип по полиморфному маркёру <i>C>T intron 6 (rs35599367)</i> гена <i>CYP3A4</i>	4,56	<0,001

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 489,18$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 100,11$, $p < 0,001$).

По результатам генотипирования *CYP3A5* по полиморфному маркёру 6986A>G (*rs776746*) у 100 испытуемых, были получены следующие данные:

- Количество пациентов, являющихся носителями генотипа GG, составило – 96 (96%);
- Количество пациентов, являющихся носителями генотипа AG, составило – 4 (4%);
- Пациентов с генотипом AA обнаружено не было.

Распределение генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга для европейской популяции (результат теста $\chi^2 = 0,04$, $p < 0,001$).

Каких-либо значимых различий в клинико-демографических характеристиках, данных анамнеза и лабораторных показателях между носителями разных генотипов установлено не было.

По результатам статистического анализа отсутствовала разница в частотах генотипов по полиморфному маркёру 6986A>G (*rs776746*) гена *CYP3A5* у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Для изучения эффективности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру 6986A>G (*rs776746*) гена *CYP3A5* и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы CIWA-Ar для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру 6986A>G (*rs776746*) гена *CYP3A5* представлены в Таблице 3.2.13.

Таблица 3.2.13 – Данные шкалы CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале CIWA-Ar					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
GG	22 [18,5; 24,5]	17 [15; 21]	16 [14; 19]	14 [11; 16]	13 [10; 15]	13 [10; 15]
AG	22 [17,5; 26,25]	16 [12; 20]	14 [10; 18,25]	11 [7,75; 14,5]	9 [5,75; 12,5]	9 [5,75; 12,5]

На рисунке 3.2.11 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру 6986A>G (rs776746) гена CYP3A5.

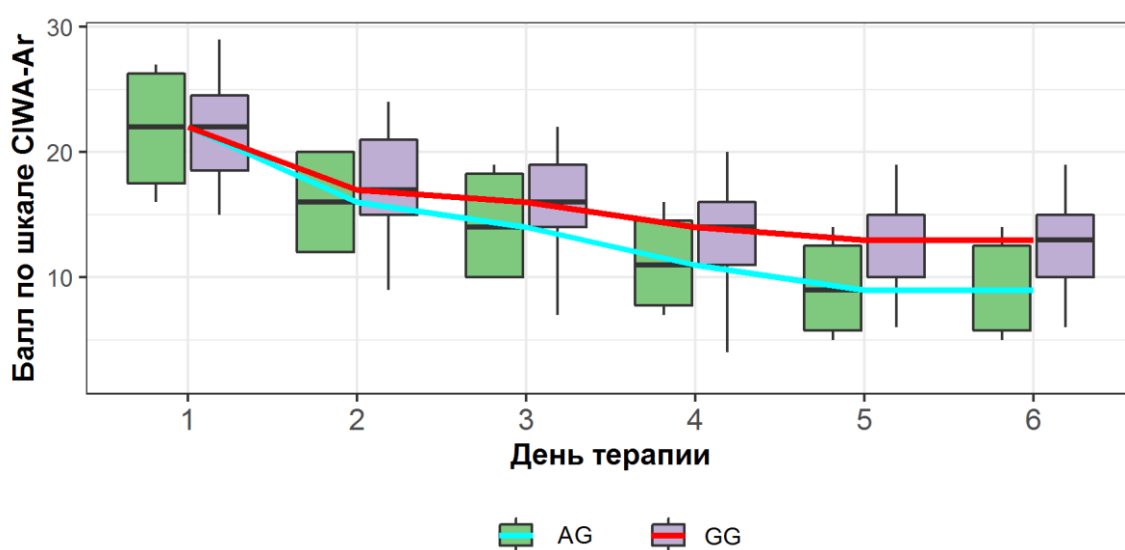


Рисунок 3.2.11 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в Таблице 3.2.14.

Таблица 3.2.14 – Результаты сравнения баллов по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	P-value*
День	99,38	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру 6986A>G (rs776746)	8,51	<0,05
День + Генотип по полиморфному маркёру 6986A>G (rs776746)	0,42	>0,05

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 99,38$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 8,51$, $p < 0,05$).

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру 6986A>G (rs776746) гена CYP3A5 и день исследования в качестве ковариат.

Результаты анализа данных шкалы UKU для пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру 6986A>G (rs776746) гена CYP3A5 представлены в Таблице 3.2.15.

Таблица 3.2.15 – Данные шкалы оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Генотипы	Количество баллов по шкале UKU					
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
GG	0 [0; 0]	3 [2; 3]	4 [3; 4]	6 [4; 7]	8 [6; 9]	8 [6; 9]
AG	0 [0; 0]	2,5 [2; 3,25]	3,5 [3; 4,5]	6 [4,75; 7,5]	8 [6,75; 9,5]	8 [6,75; 9,75]

На Рисунке 3.2.12 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале оценки выраженности НЛР UKU у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру 6986A>G (*rs776746*) гена *CYP3A5*.

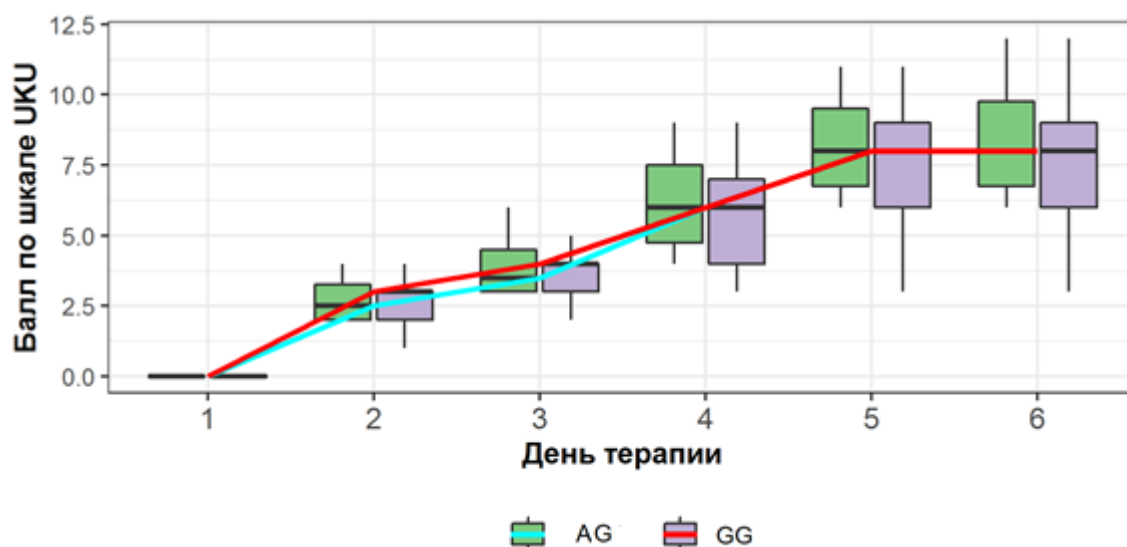


Рисунок 3.2.12 – Динамика симптоматики по шкале оценки выраженности НЛР (UKU) у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Результаты проведённого двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 3.2.16.

Таблица 3.2.16 – Результаты сравнения баллов по шкале UKU у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования

Переменная	F	p-value*
День	441,54	<0,001
Генотип по полиморфному маркёру 6986A>G (<i>rs776746</i>) гена <i>CYP3A5</i>	2,27	>0,05
День + Генотип по полиморфному маркёру 6986A>G (<i>rs776746</i>) гена <i>CYP3A5</i>	0,23	>0,05

*p-value по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (MANOVA)

Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 441,54$, $p < 0,001$), в то время как для показателя генотипа статистически значимых различий выявлено не было ($F = 2,27$, $p > 0,05$).

Таким образом, по результатам исследования было статистически показано, что профиль эффективности и безопасности диазепама у пациентов с СОА различался у пациентов с разными генотипами по полиморфным маркерам $C > T$ *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4* и $6986A > G$ (*rs776746*) гена *CYP3A5*.

Эффективность терапии диазепамом у пациентов с СОА, являющихся носителями разных генотипов по полиморфному маркеру $C > T$ *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4*, статистически значимо отличалась: разница баллов по шкале CIWA-Ar в динамике у пациентов с генотипом *CC* была ниже, чем у пациентов с генотипами *CT* и *TT*. Это предположительно связано с тем, что у пациентов, являющихся носителями генотипов *CT* и *TT* активность изофермента *CYP3A4* снижена, что, в свою очередь, приводит к замедлению скорости биотрансформации диазепама, накоплению его в плазме и более выраженному терапевтическому эффекту ЛС.

У пациентов, являющихся носителями генотипов *CT* и *TT* по тому же полиморфному маркеру, отмечалось более быстрое нарастание баллов по шкале UKU в динамике, что свидетельствует о том, что у этих пациентов терапия диазепамом сопряжена с развитием более выраженных нежелательных реакций, чем у носителей генотипа *CC*. Вероятнее всего, это может быть связано с замедлением активности изофермента *CYP3A4* у носителей минорного аллеля *T* по полиморфному маркеру $C > T$ *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4*. Снижение активности изофермента *CYP3A4* приводит к замедлению биотрансформации диазепама, что обуславливает нарастание плазменной концентрации лекарственного средства (ЛС) и, в свою очередь, приводит к тому, что до рецепторов-мишеней доходит больше ЛС, а это повышает риск развития НЛР.

У носителей разных генотипов по полиморфному маркеру 6986A>G (rs776746) гена *CYP3A5* также были выявлены различия в уровнях эффективности терапии диазепамом: разница баллов по шкале CIWA-Ar в динамике у пациентов с генотипом GG была ниже, чем у пациентов с генотипом AG. Это предположительно связано с тем, что у пациентов, являющихся носителями генотипа AG, наблюдается снижение активности *CYP3A4*, что сопряжено с замедлением скорости биотрансформации диазепама и его более выраженным терапевтическим эффектом.

3.3. Влияние активности *CYP3A4* на показатели эффективности и безопасности диазепама у пациентов с СОА

В данную часть исследования были включены 32 пациента из общего числа участников в возрасте от 26 до 62 лет, средний возраст составил $43,5 \pm 10,2$ лет.

3.3.1. Изучение зависимости показателей эффективности и безопасности терапии СОА от активности *CYP3A4*

Оценка активности изофермента *CYP3A4* осуществлялась с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) по содержанию в моче эндогенного субстрата данного изофермента и его метаболита — отношение 6-бетагидроксикортизол (6-β-НС) / кортизол. По её результатам получены данные о концентрации 6-бетагидроксикортизола и кортизола в моче в первый и шестой дни исследования, а также рассчитаны значения метаболического отношения (таблица 3.3.1).

Таблица 3.3.1 – Результаты ВЭЖХ-МС/МС по определению концентрации 6-бетагидроксикортизола и кортизола в моче, n = 32

Показатели	М	Q1	Q3
Концентрация 6-бетагидрокси-кортизола (пг/мл), 1 день	49,26	32,6496	97,3054
Концентрация кортизола (пг/мл), 1 день	40,67	34,4659	49,5108
Метаболическое отношение (усл. ед.), 1 день	1,17	0,88691	1,77042
Концентрация 6-бетагидрокси-кортизола (пг/мл), 6 день	72,89	46,7674	118,582
Концентрация кортизола (пг/мл), 6 день	34,53	17,4124	48,546
Метаболическое отношение (усл. ед.), 6 день	3,37	1,41506	6,10224
Концентрация 6-бетагидрокси-кортизола (пг/мл), динамика	11,15	-12,28042	42,87425
Концентрация кортизола (пг/мл), динамика	-8,85	-18,797	8,09593
Метаболическое отношение (усл. ед.), динамика	0,56	-0,425	4,91172

После получения данных фенотипирования, проведённый корреляционный анализ показал наличие статистически значимой отрицательной умеренной связи между концентрацией кортизола и количеством баллов по шкале CIWA-Ar на шестой день проведения исследования: $r = -0,322$ ($p = 0,067$). Графическое

отображение результатов корреляционного анализа представлено на рисунке 3.3.1.

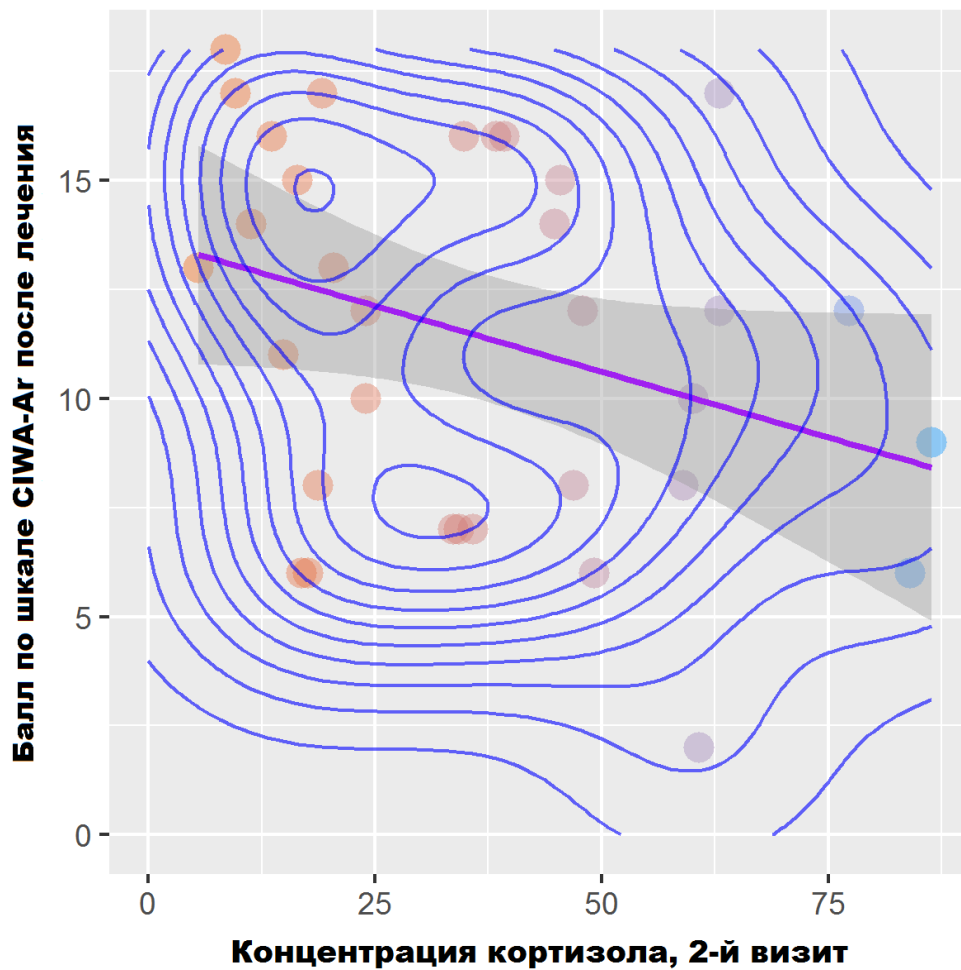


Рисунок 3.3.1 – Взаимосвязь между концентрацией кортизола и количеством баллов по шкале CIWA-Ar на шестой день исследования

Для оценки связи между активностью изофермента CYP3A4 и эффективностью терапии СОА, проведён корреляционный анализ, результат которого составил $r_s = 0,306$ ($p=0,101$). Графическое отображение результатов корреляционного анализа представлено на рисунке 3.3.2.

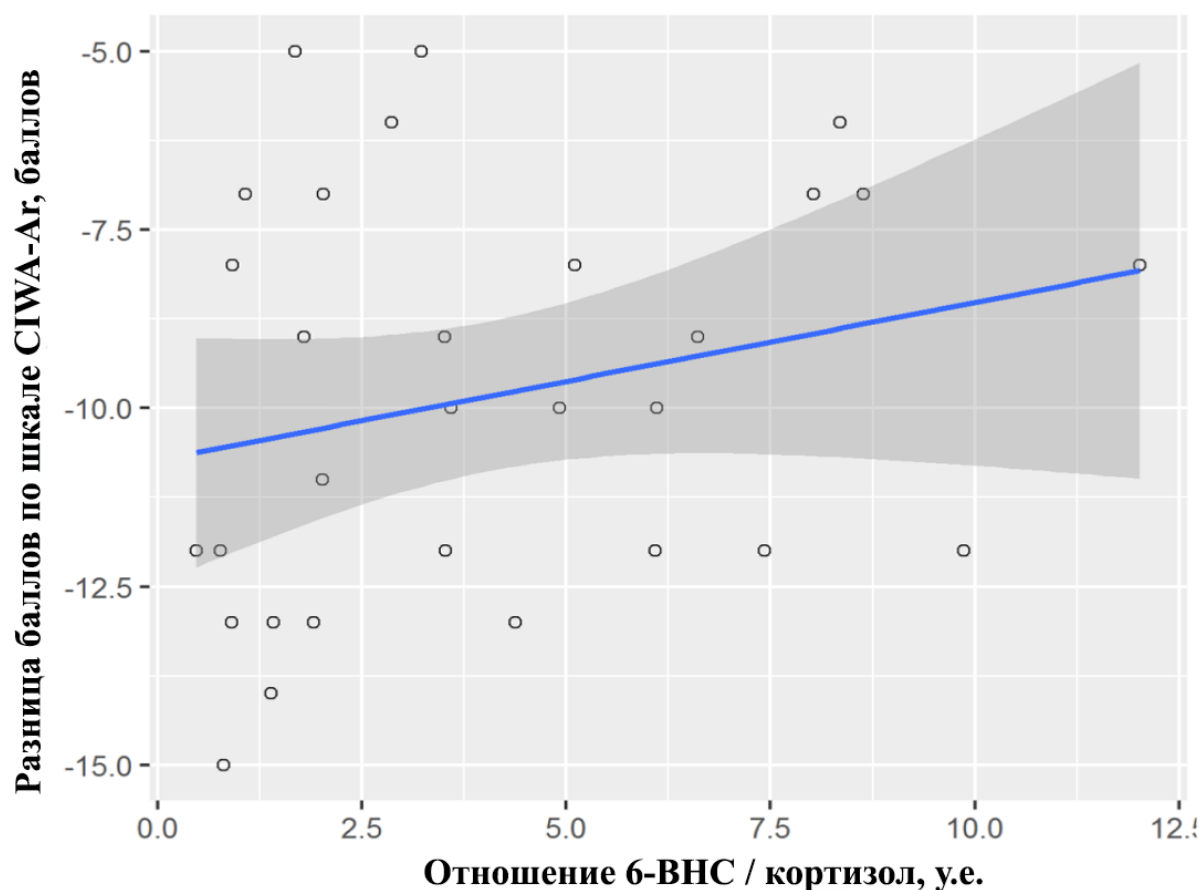


Рисунок 3.3.2 – Связь активности изофермента CYP3A4, оценённая с помощью метаболического отношения 6-бета-гидрокортизол/кортизол, с эффективностью терапии синдрома отмены алкоголя, оценённой по разнице количества баллов по шкале CIWA-Ar

При оценке безопасности терапии, проведённый корреляционный анализ показал наличие статистически значимой умеренной связи между концентрацией кортизола и количеством баллов по шкале UKU на шестой день проведения исследования: $r = 0,429$ ($p = 0,013$). Графическое отображение результатов корреляционного анализа представлено на рисунке 3.3.3.

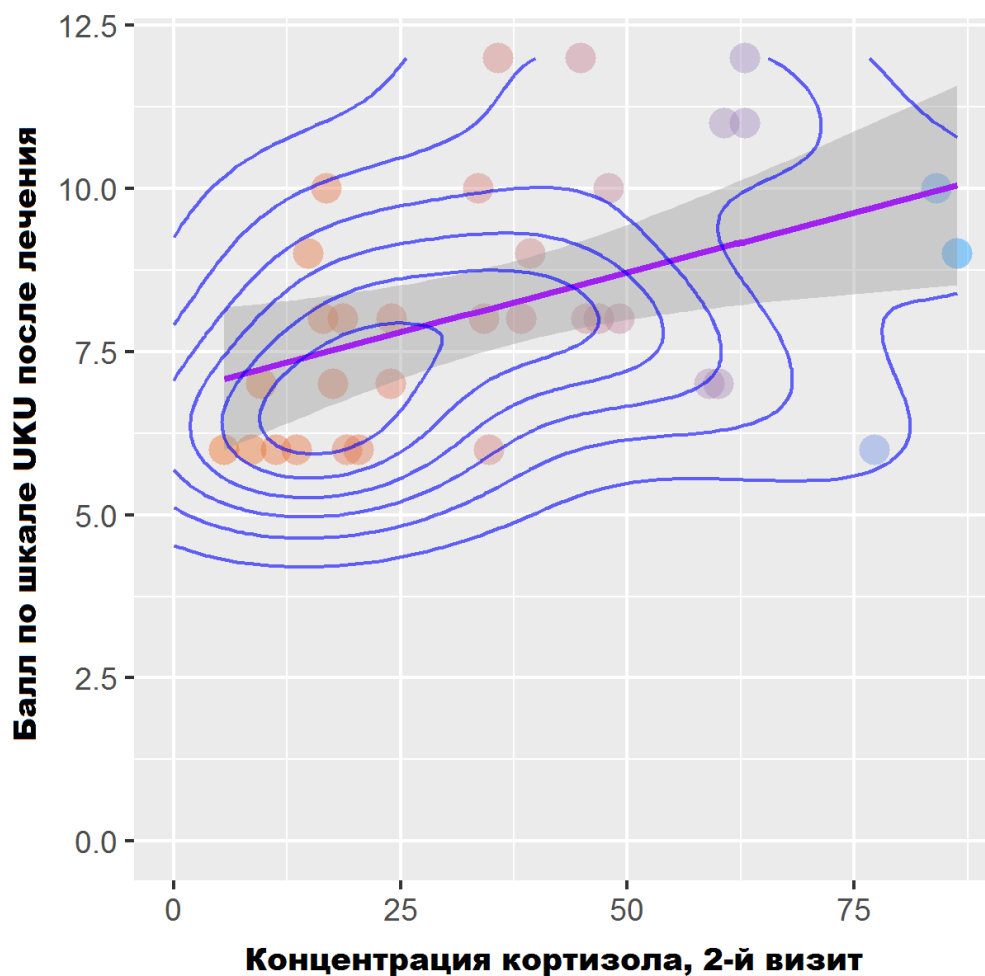


Рисунок 3.3.3 – Взаимосвязь между концентрацией кортизола и количеством баллов по шкале UKU на шестой день исследования

Аналогичным образом был произведён расчёт показателя коэффициента корреляции между разницей в количестве баллов по шкале UKU и метаболическим отношением (рисунок 3.3.4), который составил $r_s = -0,425$ ($p = 0,019$).

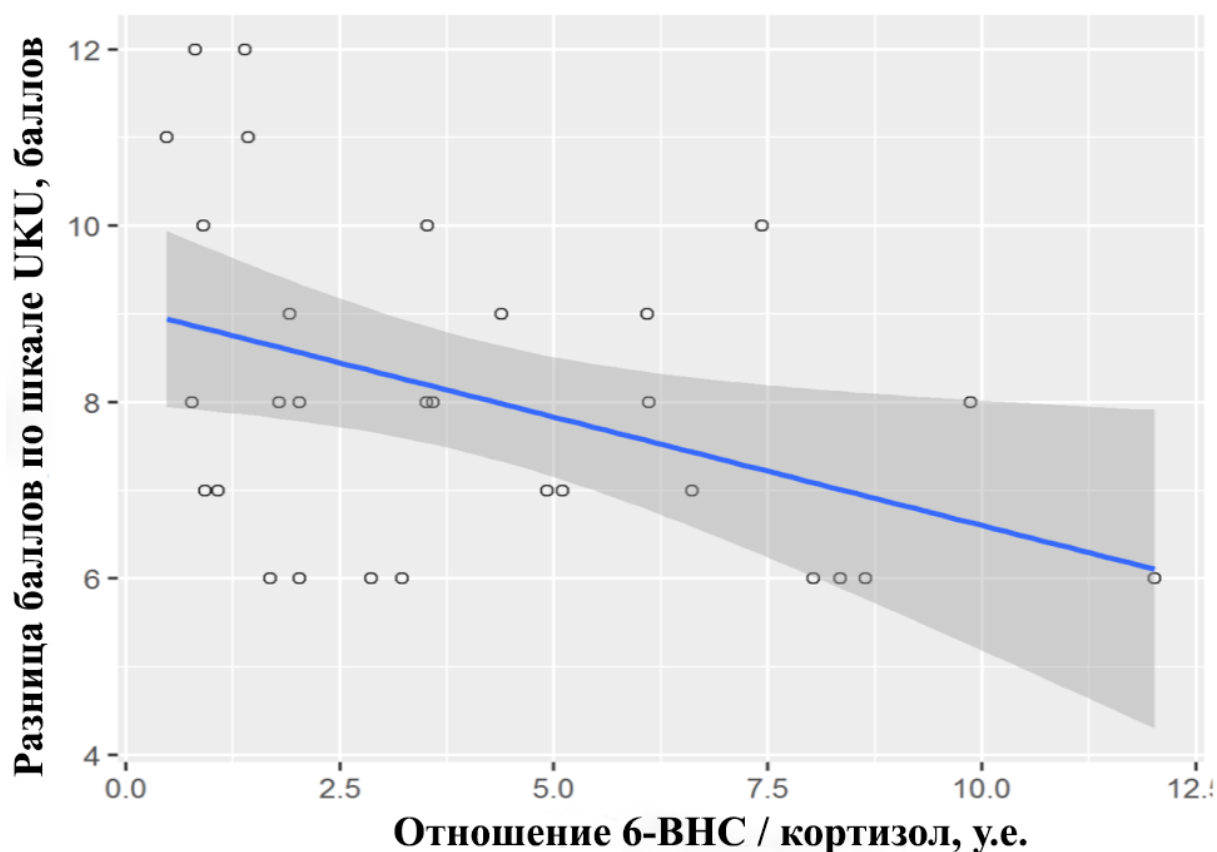


Рисунок 3.3.4 – Связь активности изофермента CYP3A4, оценённая с помощью метаболического отношения 6-бета-гидрокортизол/кортизол, с безопасностью терапии синдрома отмены алкоголя, оценённой по разнице количества баллов по шкале выраженности НЛР UKU

Полученные результаты подтверждаются данными терапевтического лекарственного мониторинга. Так, при помощи корреляционного анализа была оценена разница между показателем концентрации диазепама в плазме крови и значением метаболического отношения. Расчёт показал наличие статистически значимой сильной обратной корреляции: $r = -0,972$, $p = 0,028$ (рисунок 3.3.5).

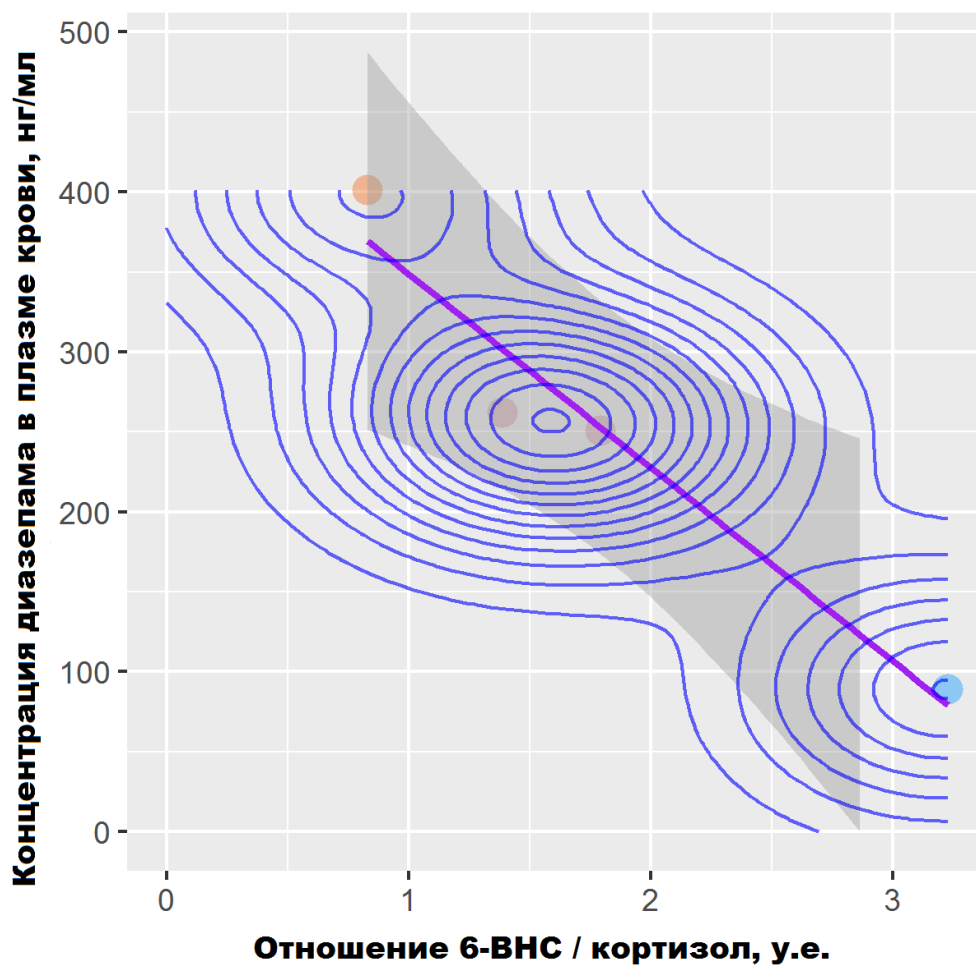


Рисунок 3.3.5 – Связь активности изофермента CYP3A4, оценённая с помощью метаболического отношения 6-бета-гидрокортизол/кортизол, с уровнями концентрации диазепама в плазме крови

Кроме того, проведённый корреляционный анализ показал наличие статистически значимой отрицательной сильной связи между показателем концентрации диазепама в слюне и значением метаболического отношения: $r = -0,984$ ($p = 0,016$). Графическое отображение результатов корреляционного анализа представлено на рисунке 3.3.6.

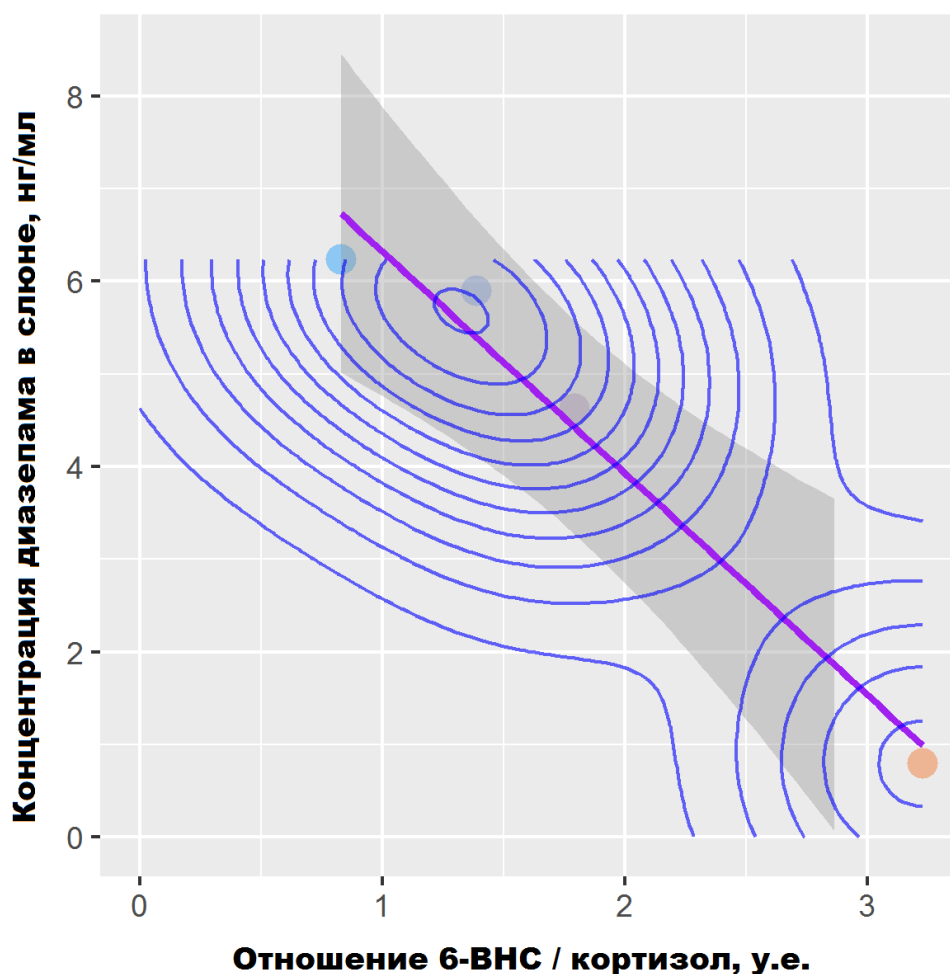


Рисунок 3.3.6 – Связь активности изофермента CYP3A4, оценённая с помощью метаболического отношения 6-бета-гидрокортизол/кортизол, с уровнями концентрации диазепама в слюне

По результатам данной части исследования, проведённой на группе из 32 пациентов с СОА, было показано, что увеличение активности CYP3A4, оценённое с помощью метаболического отношения (6-бета-гидрокортизол/кортизол), было сопряжено с повышением безопасности терапии диазепамом, оценённой по разнице в количестве баллов по шкале UKU до и после лечения. Таким образом, было показано наличие статистически значимой зависимости между показателями: чем выше активность изофермента CYP3A4, тем выше безопасность терапии диазепамом. Это может быть связано с ускорением элиминации диазепама при повышении активности CYP3A4.

Исходя из результатов исследования, можно предположить, что пациенты с замедленной активностью изофермента CYP3A4 имеют более высокий риск развития НЛР при применении диазепама. С целью снижения данного риска рекомендуется назначение такой когорте пациентов лекарств, в метаболизме которых не принимает участие CYP3A4, либо использовать более низкие дозы диазепама.

Полученные результаты исследования подтверждаются данными терапевтического лекарственного мониторинга, продемонстрировавшего влияние активности изофермента CYP3A4 на уровень концентрации диазепама в плазме крови и в слюне.

3.4. Оценка эффективности и безопасности терапии диазепамом у пациентов с синдромом отмены алкоголя посредством определения концентрации плазменной микро-РНК *miR-27b*

В данную часть исследования были включены 32 пациента с синдромом отмены алкоголя.

По результатам генотипирования CYP3A4 по полиморфному маркеру *C>T intron 6 (rs35599367)* у 32 испытуемых, были получены следующие данные:

- Количество пациентов, являющихся носителями генотипа *CC*, составило – 27 (84,4%);
- Количество пациентов, являющихся носителями генотипов *CT* или *TT*, составило – 5 (15,6%).

Распределение генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга для европейской популяции (результат теста $\chi^2 = 2,24$, $p = 0,76$).

Результаты анализа концентрации микро-РНК *miR-27b* не выявили каких-либо статистически значимых различий у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена CYP3A4 (таблица 3.4.1, рисунок 3.4.1).

Таблица 3.4.1 – Значения концентрации *miR-27b* у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4*

Показатель	CC	CT + TT	p-value*
<i>microRNA-27b</i>	32,01 [29,63; 34,16]	32,73 [29,08; 34,15]	0,86

*p-value по результатам теста Манна-Уитни

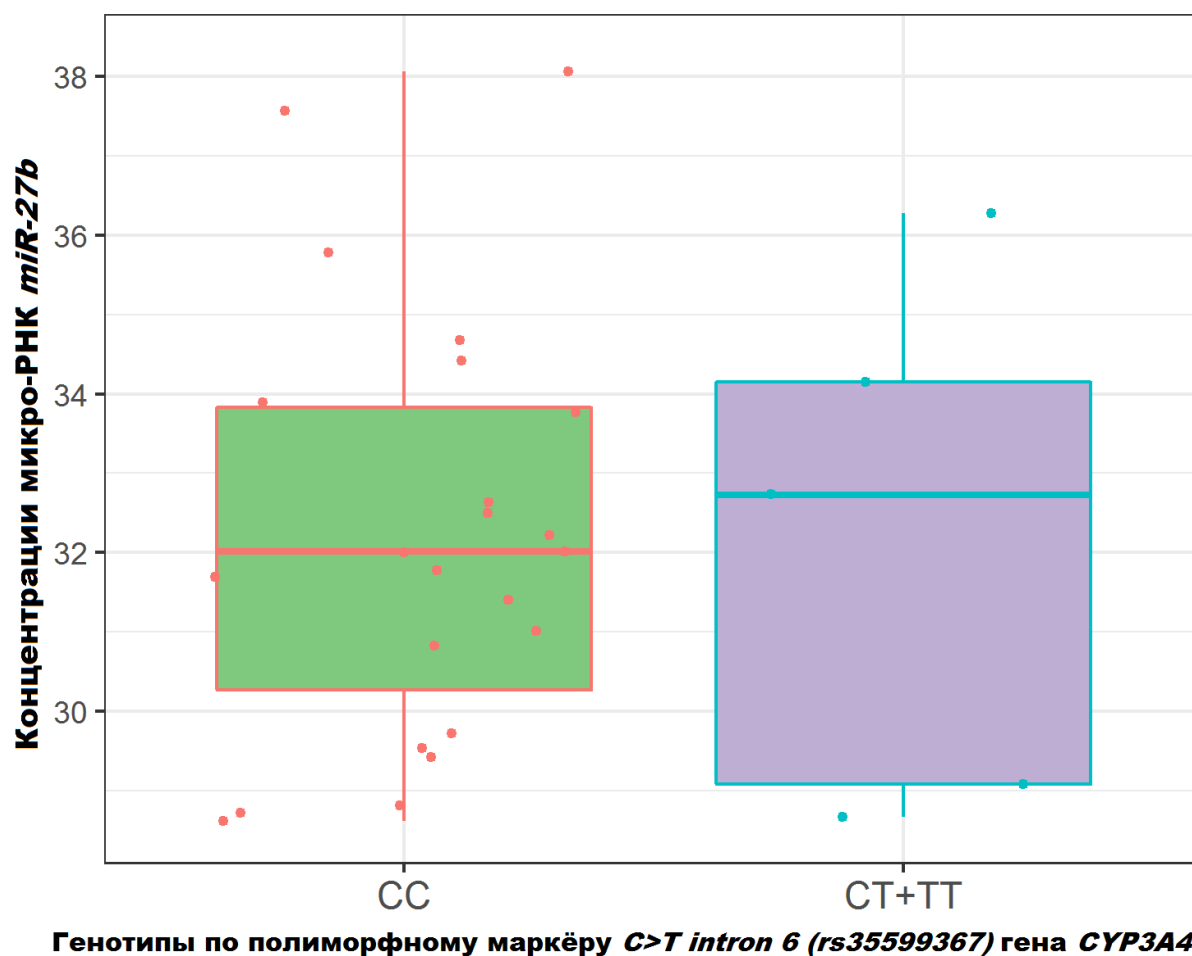


Рисунок 3.4.1 – Значения концентрации *miR-27b* у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4*

Проведённый корреляционный анализ между показателем эффективности терапии, оценённой по динамике баллов по шкале CIWA-Ar на фоне терапии, и показателем активности *CYP3A4*, оценённой по уровню концентрации *miR-27b*,

показал отсутствие статистически значимой корреляции ($r = -0,086$, $p = 0,639$). На рисунке 3.4.2 приведено графическое отображение результатов анализа.

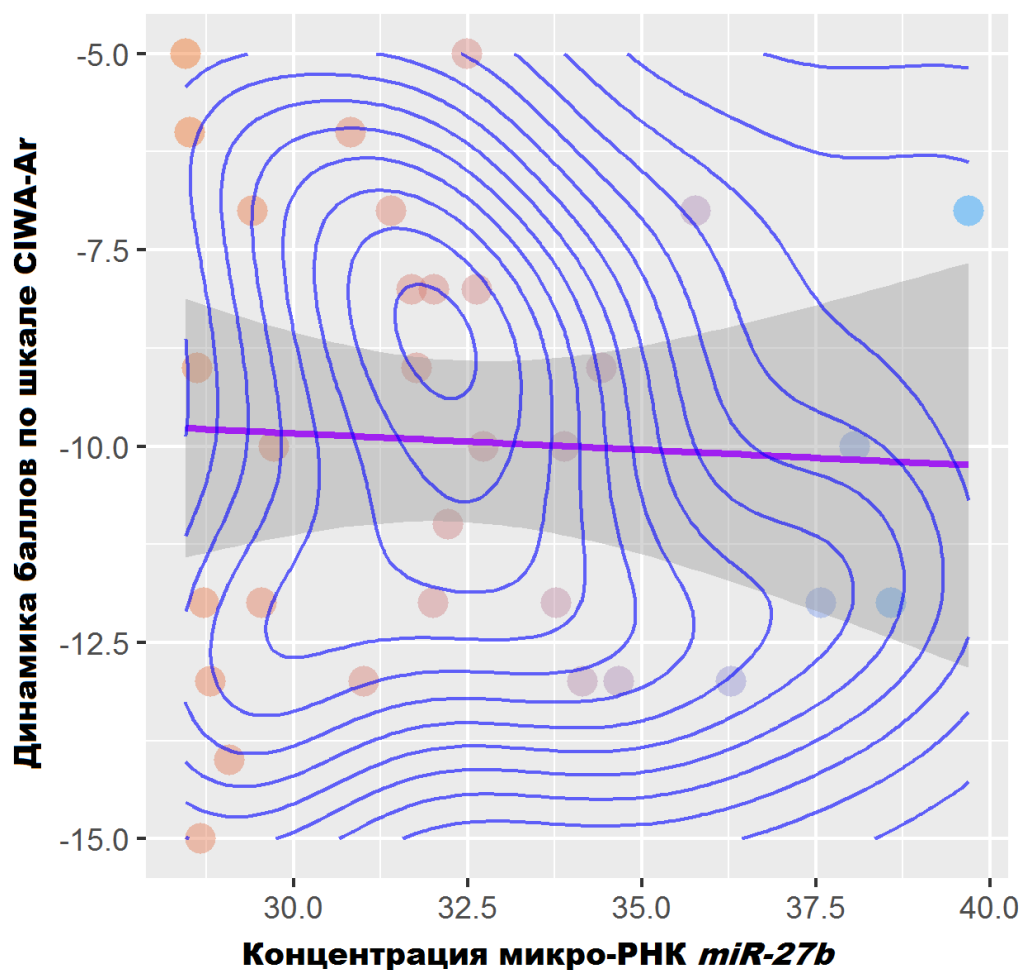


Рисунок 3.4.2 – Взаимосвязь между эффективностью терапии, оценённой по динамике баллов по шкале CIWA-Ar, и значениями концентрации *miR-27b*

При оценке безопасности терапии, проведённый корреляционный анализ между динамикой баллов по шкале UKU на фоне терапии, и показателем активности СYP3A4, оценённой по уровню концентрации *miR-27b*, также не показал статистически значимых значений ($r_s = -0,021$, $p > 0,05$). Графическое отображение результатов корреляционного анализа представлено на рисунке 3.4.3.

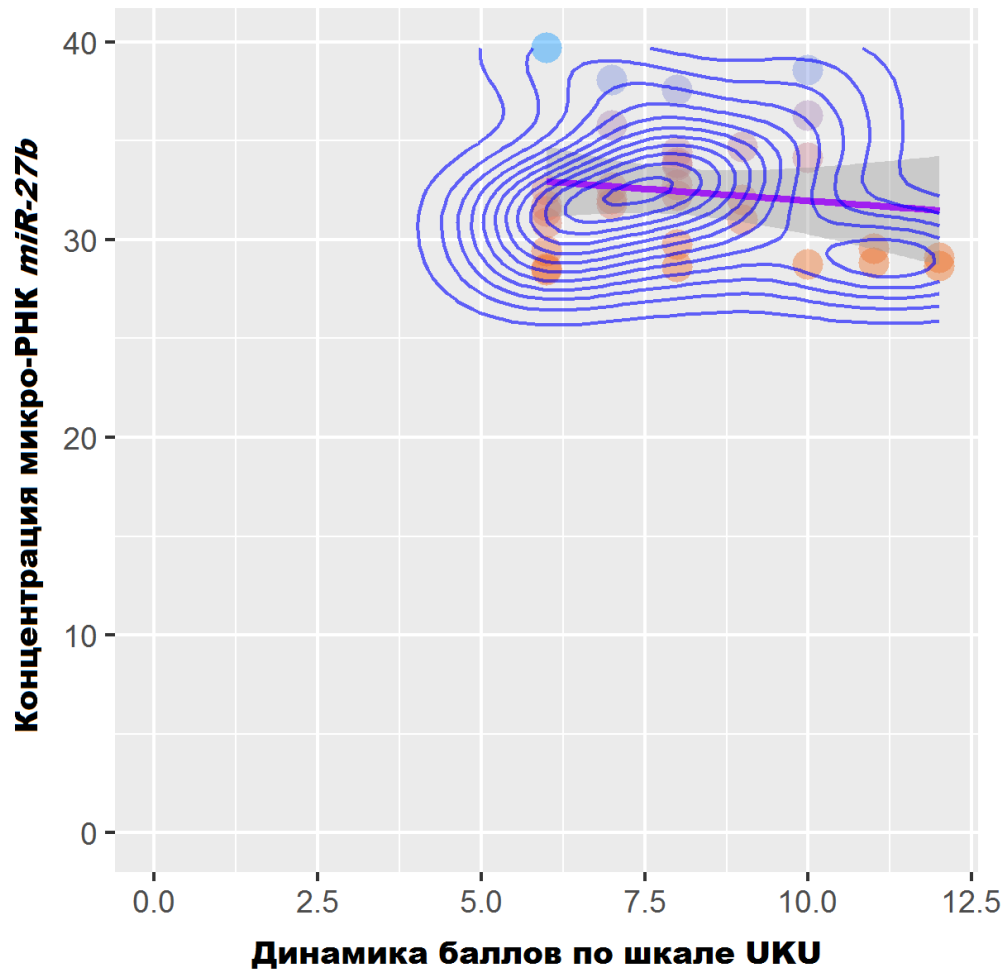


Рисунок 3.4.3 – Взаимосвязь между безопасностью терапии, оценённой по динамике баллов по шкале UKU, и значениями концентрации *miR-27b*

Кроме того, оценивалась корреляция между значениями концентрации диазепама в плазме крови и уровнем активности СYP3A4, оценённой по уровню концентрации *miR-27b*. Корреляционный анализ показал отсутствие статистически значимой корреляционной связи значений ($r = 0,570$, $p > 0,05$). Результаты корреляционного анализа представлены графически на рисунке 3.4.4.

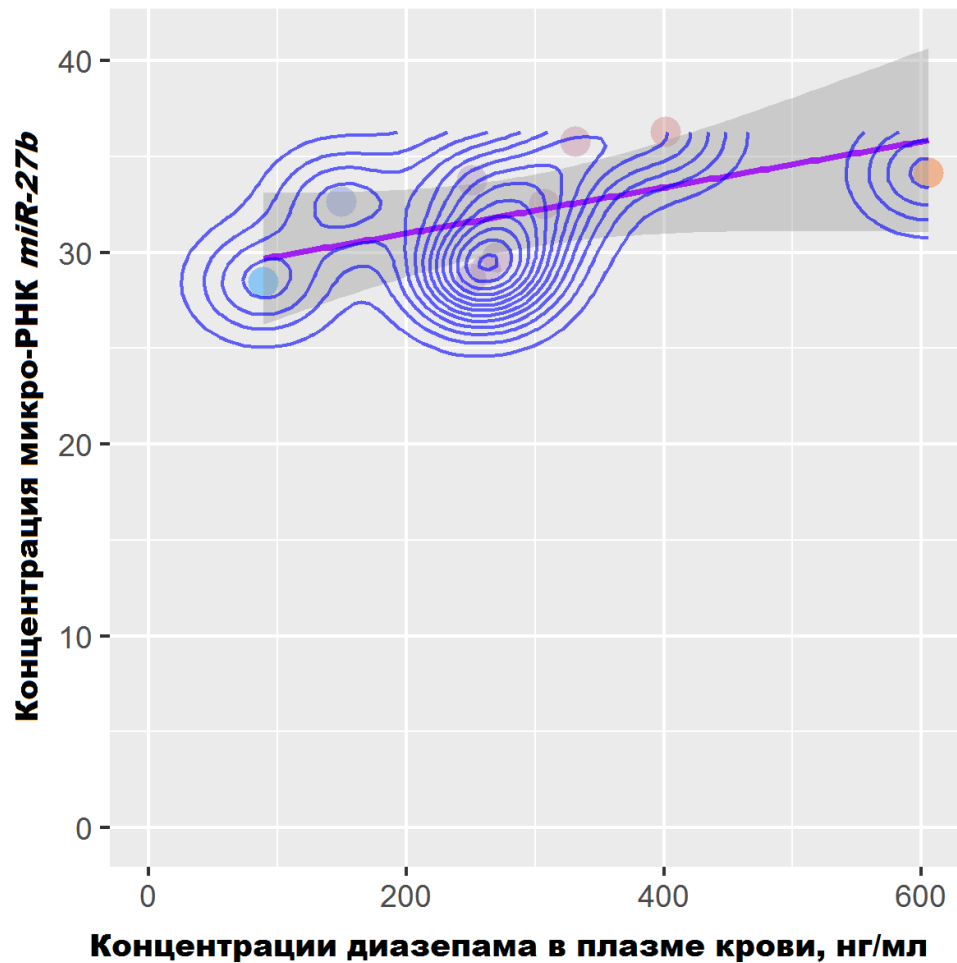


Рисунок 3.4.4 – Взаимосвязь между значениями концентрации диазепама в плазме крови и значениями концентрации *miR-27b*

Корреляционный анализ между показателем концентрации диазепама в слюне и уровнем активности CYP3A4, оценённой по уровню концентрации *miR-27b*, также показал отсутствие статистически значимой связи ($r = 0,397$, $p > 0,05$). Результаты корреляционного анализа приведены на рисунке 3.4.5.

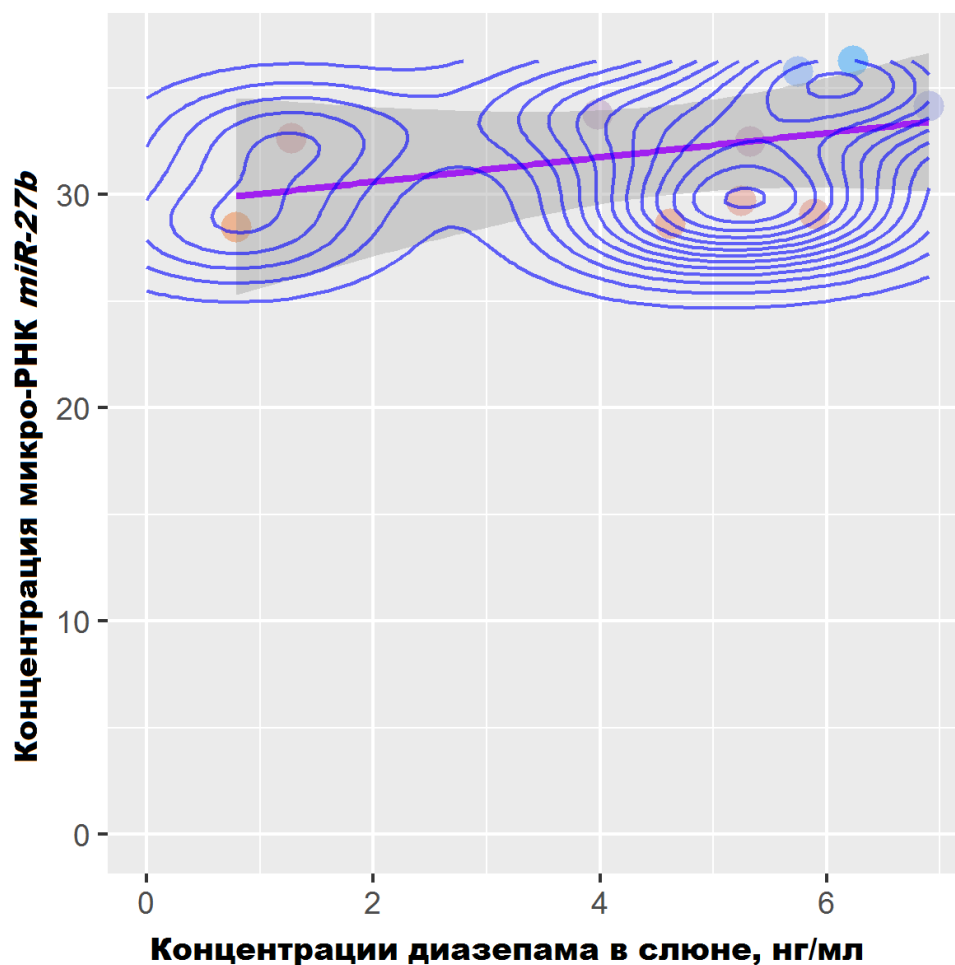


Рисунок 3.4.5 – Взаимосвязь между значениями концентрации диазепама в слюне и значениями концентрации *miR-27*

Таким образом, результаты данной части исследования показали отсутствие статистически значимой корреляционной связи между значениями показателя плазменной концентрации микро-РНК *miR-27b* с показателями фармакокинетики (концентрация диазепама в крови и в слюне) и показателями эффективности и безопасности терапии, что, вероятно, может быть связано с низкой прогностической ценностью данного маркера для определения индивидуального ответа пациентов на терапию диазепамом. В то же время, уровень экспрессии *CYP3A4*, который мы оценивали посредством определения концентрации микро-РНК *miR-27b*, вероятно, не во всех случаях коррелирует с активностью изофермента *CYP3A4*, поскольку повышенная концентрация *miR-27b* может

сочетаться с наличием генетических полиморфизмов, снижающих уровень активности изофермента. Наличие подобного сочетания приведёт к отсутствию повышения активности изофермента, несмотря на повышенную экспрессию *CYP3A4*. Необходимо проведение дальнейших исследований указанного биомаркёра на более расширенной выборке.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день проблема злоупотребления алкоголем по-прежнему сохраняет мировой масштаб (Кошкина Е.А. и др., 2019). Употребление алкоголя входит в число основных факторов риска для здоровья населения во всём мире и оказывает прямое влияние на достижение глобальных Целей в области устойчивого развития (англ. Sustainable Development Goals, SDGs), принятых ООН и официально известных как «Преобразование нашего мира: повестка дня в области устойчивого развития на период до 2030 года» (United Nations, 2015). По данным ВОЗ, в Европейском регионе отмечается наиболее высокий в мире уровень потребления алкоголя (World Health Organization, 2018).

В структуре зависимости от алкоголя (как, впрочем, и любой химической зависимости) особое место занимают проявления синдрома отмены. При развитии СОА необходимым компонентом патогенетического лечения является адекватная медикаментозная терапия (Винникова М.А. и др., 2018). В настоящее время во всём мире наиболее распространёнными лекарственными средствами, применяющимися при СОА и являющимися «золотым стандартом» его терапии, остаются бензодиазепиновые транквилизаторы, наиболее популярным из которых является диазепам.

Однако, согласно литературным данным, терапия диазепамом нередко оказывается неэффективной, а у части пациентов развиваются дозозависимые НЛР: головокружение, сонливость, замедление реакции, снижение психической и двигательной активности, мышечная слабость, атаксия и диспепсия, что снижает эффективность лечения данной категории больных. Несмотря на популярность диазепама в качестве седативного и анксиолитического лекарственного средства, в настоящее время отсутствуют точные данные о влиянии полиморфизма того или иного гена на эффективность и безопасность терапии диазепамом.

Поэтому целью данного исследования было разработать персонализированный подход к оптимизации психофармакотерапии диазепамом

пациентов с разными клиническими вариантами СОА для повышения качества терапии посредством прогнозирования её эффективности и безопасности на основе фармакогенетического и фармакокинетического исследования.

В исследование включены 100 пациентов мужского пола, проходивших стационарное лечение в двух клинических филиалах ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» с диагнозом «F10.30. Абстинентное состояние (синдром отмены) неосложнённое, вызванное употреблением алкоголя». У всех больных к моменту госпитализации диагностирована 2, 2-3 или 3 стадия зависимости от алкоголя и отмечалась разная степень выраженности симптомов СОА. В ходе проведения исследования, у всех пациентов оценивались проявления алкогольного абстинентного синдрома на основании клинической картины и выделялись преобладающие компоненты, на основании которых устанавливался клинический вариант СОА.

Установлено, что наиболее распространённым клиническим вариантом СОА являлся нейровегетативный, который диагностирован у 51 пациента (51%). Наиболее типичными симптомами в его структуре являлись ощущение общей слабости, потливость, дрожь в руках и во всём теле, нарушения сна и аппетита, тахикардия, а также жажда и сухость во рту.

Вторым по распространённости вариантом СОА оказался висцеральный, выявленный у 24 человек (24%), причём, эти пациенты разделились на две подгруппы. В первой из них, включавшей 13 участников, наиболее частыми жалобами являлись одышка, неприятные ощущения или боли в области сердца, нарушения сердечного ритма и высокие значения АД, что может объясняться имевшимися у этих пациентов нарушениями со стороны сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия, алкогольная кардиомиопатия). Во второй подгруппе из 11 человек ведущими симптомами СОА являлись субиктеричность склер, тошнота, рвота, боли в животе, тяжесть в правом подреберье, метеоризм и жидкий стул, что, в свою очередь, может объясняться тем, что все эти пациенты страдали сопутствующими заболеваниями органов желудочно-кишечного тракта

(алкогольный панкреатит, хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки).

Третьим по частоте встречаемости оказался церебральный вариант СОА, установленный в 13 случаях (13%), при котором ведущими жалобами были сильная головная боль, головокружение, гиперактузия и мышечные подёргивания.

У 12 человек (12%) был выявлен психопатологический вариант СОА, оказавшийся одновременно наиболее редким и наиболее тяжёлым из всех изученных клинических вариантов. Этот вариант сопряжён с наличием у пациентов выраженных психических расстройств в структуре СОА: беспокойства, неусидчивости, ощущений тревоги и страха (особенно в вечернее и ночное время), снижения настроения, раздражительности и нарушений сна разной степени тяжести. У семи участников отмечались гипнагогические зрительные галлюцинации устрашающего характера, а также просоночные состояния с временным нарушением ориентировки в месте.

После установления клинических вариантов СОА изучена взаимосвязь между ними и тяжестью их проявлений, оценённой по динамике баллов по шкале CIWA-Ar на фоне лечения. Показано, что у всех пациентов, независимо от клинического варианта, течение СОА было умеренно тяжёлым (16-20 баллов) и тяжёлым (свыше 20 баллов). При этом установлено, что участники исследования с нейровегетативным вариантом СОА демонстрировали более низкие значения суммы баллов по шкале CIWA-Ar до лечения по сравнению с остальными участниками (19,00 [18,00; 22,00] vs 24,00 [21,00; 26,00], $p < 0,001$), то есть, имели наименьшую степень тяжести проявлений СОА. В то же время, наиболее тяжёлое течение СОА наблюдалось в случаях церебрального (сумма баллов по шкале CIWA-Ar до лечения по сравнению с остальными вариантами: 23,50 [20,75; 26,25] vs 21,00 [18,00; 24,00], $p = 0,050$) и психопатологического вариантов (сумма баллов по шкале CIWA-Ar до лечения по сравнению с остальными вариантами: 24,50 [22,00; 27,00] vs 21,00 [18,00; 24,00], $p = 0,012$). Это подтверждает известные данные о том, что нейровегетативный вариант СОА является базовым и его

проявления в той или иной степени наблюдаются у всех пациентов, но к ним могут присоединяться и другие, более тяжёлые симптомы, позволяющие установить другие клинические варианты СОА.

Далее изучена ассоциация между диагностированными клиническими вариантами СОА и показателями эффективности и безопасности терапии. Для этого был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, включавший клинический вариант СОА и день исследования в качестве ковариат. По результатам анализа было установлено отсутствие статистически значимых различий в показателях эффективности терапии диазепамом у пациентов с разными клиническими вариантами СОА: получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 43,73$, $p < 0,001$), в то время как для показателя клинического варианта СОА статистически значимых различий выявлено не было ($F = 5,08$, $p = 0,42$).

Изучение профиля безопасности терапии диазепамом позволило выявить следующие НЛР типа А: психические нарушения: астения/вялость/повышенная утомляемость, сонливость/седация, увеличение продолжительности сна, нарушения концентрации, нарушения памяти в форме ухудшения кратковременной памяти и антероградной амнезии, а также эмоциональная индифферентность; неврологические вегетативные нарушения: нарушения аккомодации, сухость во рту, тошнота, ортостатизм, запоры, учащенное сердцебиение/тахикардия, усиление мочеиспускания, головные боли. Все указанные НЛР перечислены в инструкции по медицинскому применению лекарственного средства «Диазепам» в качестве возможных нежелательных реакций. Анализ по шкале Наранжо показал наличие высокой степени достоверности причинно-следственной связи между введением пациентам диазепама и зафиксированными НЛР.

Проведённый анализ не выявил статистически значимых различий в частоте встречаемости НЛР типа А у пациентов с разными вариантами СОА. Исследование динамики баллов по шкале оценки выраженности НЛР UKU, с

помощью которой оценивалась выраженность каждой НЛР, выполненное посредством двухфакторного дисперсионного анализа, включавшего клинический вариант СОА и день исследования в качестве ковариат, выявило отсутствие статистически значимых различий в показателях безопасности терапии диазепамом у пациентов с разными клиническими вариантами СОА (получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 442,35$, $p < 0,001$), в то время как для показателя клинического варианта СОА статистически значимых различий выявлено не было ($F = 8,84$, $p = 0,48$)).

Исходя из полученных результатов, было сделано предположение о том, что эффективность и безопасность фармакотерапии может зависеть от генетических факторов, влияющих на фармакокинетику и фармакодинамику диазепама. Для выявления особенностей метаболизма диазепама у пациентов с различными клиническими вариантами СОА и поиска общих закономерностей, был проведен следующий этап исследования.

Выполнена оценка влияния полиморфизмов *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* и *CYP2C19*17* на эффективность и безопасность терапии диазепамом у пациентов с СОА. Поскольку полиморфизм *CYP2C19*3* оказался невариативен (все 100 участников исследования оказались носителями «дикого» генотипа GG), в анализ включены только различия по генотипам *CYP2C19*2* и *CYP2C19*17*. Выраженность проявлений синдрома отмена алкоголя, оценённая по динамике суммы баллов по шкале CIWA-Ar, отличалась у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру 681G>A (*rs4244285*) гена *CYP2C19*: по результатам проведённого двухфакторного дисперсионного анализа получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 114,93$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 10,60$, $p < 0,001$). Выраженность НЛР, оценённая по сумме баллов по шкале UKU в динамике, также имела статистически значимые различия в группах пациентов с разными генотипами: двухфакторный дисперсионный анализ выявил наличие статистической значимости в показателе дня исследования ($F = 114,93$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 10,60$, $p < 0,001$). Эти данные подтверждены

результатами терапевтического лекарственного мониторинга: уровни концентрации диазепама в плазме у пациентов с разными генотипами имели статистически значимые отличия: (GG) 199,83 [82,92; 250,58] vs (GA+AA) 313,47 [288,99; 468,33], $p=0,040$. Кроме того, фармакокинетическое исследование выявило, что показатель концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру 681G>A (*rs4244285*) гена *CYP2C19* также имел статистически значимые отличия: (GG) 2,80 [0,73; 3,80] vs (GA+AA) 5,33 [5,14; 6,00], $p=0,003$. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что при назначении диазепама пациентам с СОА следует принимать во внимание полиморфизм гена *CYP2C19* 681G>A (*rs4244285*), так как наличие минорного аллеля А сопряжено с замедлением биотрансформации диазепама, его накоплением в плазме и, следовательно, большей эффективностью терапии, но худшим профилем её безопасности.

При оценке эффективности терапии у пациентов с СОА, имеющих разные генотипы по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) гена *CYP2C19*, установлены статистически значимые различия: по результатам проведённого двухфакторного дисперсионного анализа получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 118,13$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 99,22$, $p < 0,001$). Сумма баллов по шкале UKU в динамике также отличалась у пациентов с разными генотипами: двухфакторный дисперсионный анализ выявил статистическую значимость в показателе дня исследования ($F = 442,84$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 124,46$, $p < 0,001$). Эти результаты также подтверждены данными терапевтического лекарственного мониторинга, результаты которого показали, что показатель концентрации диазепама в плазме у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) гена *CYP2C19* имел статистически значимые отличия: (CC) 250,70 [213,34; 308,53] vs (CT+TT) 89,12 [53,26; 178,07], $p=0,002$. Проведённое фармакокинетическое исследование показало, что показатель концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру -806C>T

(*rs12248560*) гена *CYP2C19* также имел статистически значимые отличия: (CC) 3,86 [3,22; 5,12] vs (CT+TT) 0,79 [0,44; 1,56], $p=0,003$. Эти данные свидетельствуют о том, что целесообразно учитывать имеющийся у пациентов полиморфизм гена *CYP2C19* -806C>T (*rs12248560*) при назначении им диазепама с целью лечения проявлений СОА, поскольку у носителей минорного аллеля T терапия менее эффективна, но сопряжена с меньшей вероятностью развития НЛР.

На следующем этапе исследования изучено влияние полиморфизма генов *CYP3A4* (C>T *intron 6*) и *CYP3A5* (6986A>G) на эффективность и безопасность терапии диазепамом. Установлены различия в показателе эффективности терапии у пациентов с разными генотипами *CYP3A4* по полиморфному маркеру C>T *intron 6* (*rs35599367*): по результатам проведённого двухфакторного дисперсионного анализа получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 101,93$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 47,39$, $p < 0,001$). Сумма баллов по шкале UKU в динамике также различалась у носителей разных генотипов: двухфакторный дисперсионный анализ выявил статистическую значимость в показателе дня исследования ($F = 489,18$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 100,11$, $p < 0,001$). У носителей разных генотипов по полиморфному маркеру 6986A>G (*rs776746*) гена *CYP3A5* также выявлены различия в уровнях эффективности терапии диазепамом: по результатам проведённого двухфакторного дисперсионного анализа выявлена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 99,38$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 8,51$, $p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что при назначении диазепама пациентам с СОА следует принимать во внимание полиморфизм гена *CYP3A4* C>T *intron 6* (*rs35599367*) и гена *CYP3A5* 6986A>G (*rs776746*) ввиду того, что у носителей минорного аллеля T по полиморфному маркеру C>T *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4*, а также у носителей генотипа AG по полиморфному маркеру 6986A>G (*rs776746*) гена *CYP3A5* отмечается замедление биотрансформации диазепама и его накопление в плазме, что

приводит к большей эффективности проводимой терапии и её меньшей безопасности.

Затем изучено влияние активности изофермента CYP3A4 на показатели эффективности и безопасности диазепама у пациентов с СОА. Данная часть исследования проведена на группе из 32 пациентов из общего числа участников. Для оценки связи между активностью изофермента CYP3A4 (оценённой с помощью метаболического отношения 6-бета-гидроксикортизол/кортизол) и эффективностью терапии СОА (оценённой по разнице количества баллов по шкале CIWA-Ar), проведён корреляционный анализ, результат которого составил $r_s = 0,306$ ($p=0,101$). При оценке безопасности терапии произведён расчёт показателя коэффициента корреляции между разницей в количестве баллов по шкале UKU и метаболическим отношением, который составил $r_s = -0,425$ ($p = 0,019$). Эти результаты подтверждены данными терапевтического лекарственного мониторинга: расчёт показателя коэффициента корреляции между концентрацией диазепама в плазме крови и значением метаболического отношения показал наличие статистически значимой сильной обратной корреляции: $r = -0,972$, $p = 0,028$. Кроме того, проведённый корреляционный анализ показал наличие статистически значимой отрицательной сильной связи между показателем концентрации диазепама в слюне и значением метаболического отношения: $r = -0,984$ ($p = 0,016$). Таким образом, из этих результатов следует, что при назначении диазепама пациентам с СОА целесообразно учитывать активность изофермента CYP3A4: у лиц с пониженным уровнем его активности повышен риск развития НЛР. С целью снижения данного риска таким пациентам целесообразно назначать препараты, в метаболизме которых не принимает участие CYP3A4, либо использовать более низкие дозы диазепама, регламентированные инструкциями по медицинскому применению.

Наконец, в заключительной части исследования оценены эффективность и безопасность терапии диазепамом у пациентов с СОА посредством определения концентрации плазменной микро-РНК *miR-27b*. Проведённый анализ показал

отсутствие статистически значимой корреляционной связи между значениями показателя плазменной концентрации микро-РНК *miR-27b* с показателями эффективности ($r = -0,086$, $p = 0,639$) и безопасности ($r_s = -0,021$, $p > 0,05$) терапии, а также с фармакокинетическими параметрами (концентрация диазепама в крови ($r = 0,570$, $p > 0,05$) и в слюне ($r = 0,397$, $p > 0,05$)), что, вероятно, может быть связано с низкой прогностической ценностью данного маркера для определения индивидуального ответа пациентов на терапию диазепамом. При этом следует отметить, что уровень экспрессии *CYP3A4*, который оценивался посредством определения концентрации микро-РНК *miR-27b*, вероятно, не во всех случаях коррелирует с активностью изофермента *CYP3A4*, поскольку повышенная концентрация *miR-27b* может сочетаться с наличием генетических полиморфизмов, снижающих уровень активности изофермента. Наличие подобного сочетания приведёт к отсутствию повышения активности изофермента, несмотря на повышенную экспрессию *CYP3A4*. Необходимо проведение дальнейших исследований указанного биомаркера на более расширенной выборке.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что наиболее лёгкое течение синдрома отмены отмечается у пациентов с нейровегетативным вариантом СОА, в то время как наиболее тяжёлое течение наблюдалось в случаях церебрального и психопатологического вариантов.

2. Выявлено, что клинические варианты СОА не оказывают влияния ни на эффективность, ни на безопасность терапии диазепамом.

3. Доказано, что эффективность терапии диазепамом у пациентов с СОА зависит от полиморфизма генов *CYP2C19*, *CYP3A4* и *CYP3A5*.

4. Безопасность терапии диазепамом у пациентов с СОА зависит от полиморфизма генов *CYP2C19* и *CYP3A4*.

5. Установлено, что чем выше активность изофермента *CYP3A4* (оценённая по отношению концентрации 6-бетигидроксикортизол / кортизол в моче), тем выше безопасность психофармакотерапии диазепамом у пациентов с СОА, что требует назначения пациентам с низкой активностью *CYP3A4* более низких доз диазепама или применения лекарств, не метаболизирующихся изоферментом *CYP3A4*.

6. Выявлено отсутствие статистически значимой корреляционной связи между значениями показателя плазменной концентрации микро-РНК *miR-27b* с показателями эффективности и безопасности терапии диазепамом, а также с фармакокинетическими параметрами, что свидетельствует о нецелесообразности использования этого маркера в качестве предиктора эффективности и безопасности проводимой терапии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Пациентам, проходящим стационарное лечение по поводу СОА и получающим в качестве терапии диазепам, независимо от имеющегося у них клинического варианта СОА, целесообразно выполнение фармакогенетического тестирования с целью выявления генотипов: *GA* и *AA* по полиморфному маркёру *681G>A (rs4244285)* гена *CYP2C19*; *CT* и *TT* по полиморфному маркёру *-806C>T (rs12248560)* гена *CYP2C19*; *CT* и *TT* по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4*; а также *AG* по полиморфному маркёру *6986A>G (rs776746)* гена *CYP3A5*, что позволит повысить эффективность и безопасность психофармакотерапии и в случае необходимости проводить её коррекцию.

По этой же причине при назначении диазепама пациентам с СОА рекомендуется проводить оценку активности изофермента *CYP3A4* с помощью кортизолового теста. Не рекомендуется использовать определение уровня плазменной концентрации микро-РНК *miR-27b* в качестве отдельного маркёра для прогнозирования эффективности терапии и риска развития НЛР. Полученные данные позволяют рекомендовать включение фармакогенетического исследования в стандарты обследования и диагностики СОА, хотя бы в случаях тяжёлого течения заболевания и при низкой эффективности лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альтшулер, В.Б. Алкоголизм / В.Б. Альтшулер. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 65-67.
2. Альтшулер, В.Б. Симптомы и синдромы алкогольных заболеваний / В.Б. Альтшулер // Алкоголизм. Руководство для врачей / под ред. Н.Н. Иванца, М.А. Винниковой. – М.: МИА, 2011. – С. 218-249.
3. Альтшулер, В.Б. Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя / В.Б. Альтшулер, С.Л. Кравченко // Наркология: Национальное руководство / под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 199-227.
4. Арана, Д. Фармакотерапия психических расстройств / Д. Арана, Д. Розенбаум // под ред. С.Н. Мосолова. – М.: Бином, 2006. – 416 с.
5. Афанасьев, В.В. Алкогольный абстинентный синдром / В.В. Афанасьев. – СПб.: Интермедика, 2002. – 336 с.
6. Брюн, Е.А. Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя. Синдром отмены алкоголя (алкогольное абстинентное состояние). Клинические рекомендации. Проект / Е.А. Брюн, Т.В. Агибалова, И.А. Бедина и др. // Наркология. – 2018. – Т. 17. – № 8. – С. 3-32.
7. Брюн, Е.А. Борьба с алкоголизмом как фактор снижения смертности и увеличения продолжительности жизни в Российской Федерации / Е.А. Брюн, О.Ж. Бузик, А.В. Надеждин, А.Ю. Колгашкин // Вестник Росздравнадзора. – 2018. – № 5. – С. 43-48.
8. Винникова, М.А. Медикаментозные методы лечения наркологических заболеваний / М.А. Винникова, Н.Н. Иванец // Наркология. Национальное руководство / под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. – М., 2016. – С. 492-520.
9. Винникова, М.А. Современные подходы к лечению тяжелого алкогольного абстинентного синдрома. Методические рекомендации / М.А. Винникова, Н.Т. Кренкель, М.С. Тиков, И.С. Царева. – М., 2018. – 48 с.
10. Воробьева, О.В. Бензодиазепины: от скептицизма к рациональной позиции / О.В. Воробьева // Медицинский алфавит. – 2016. – Т. 3. – № 22 (285) . – С. 28-33.
11. Воронина, Т.А. Перспективы поиска новых анксиолитиков / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65. – №5. – С. 4-17.
12. Газизов, Р.М. Основы лекарственной терапии в пожилом и старческом возрасте / Р.М. Газизов // Практическая медицина. – 2010. – № 2 (41) . – С. 11-14.
13. Гофман, А.Г. Клиника алкогольного абстинентного синдрома / А.Г. Гофман // Вопросы наркологии. – 2012. – № 6. – С. 82-90.

14. Грачёв, Д.Е. Роль периферического бензодиазепинового рецептора в начальных стадиях апоптоза и индукции неспецифической поры митохондрий. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Д.Е. Грачёв; Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук. – Пущино, 2009.
15. Жислин, С.Г. Очерки клинической психиатрии. Клинико-патогенетические зависимости / С.Г. Жислин. – М.: Медицина, 1965. – 320 с.
16. Застрожин, М.С. Фармакогенетический подход к назначению галоперидола у больных, страдающих алкогольной зависимостью, в период актуализации патологического влечения. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / М.С. Застрожин; Российский университет дружбы народов. – М., 2016.
17. Иванец, Н.Н. Алкоголизм / Н.Н. Иванец, И. Нойман // Руководство по психиатрии / под ред. Г.В. Морозова. – М.: Медицина, 1988. – Т.2. – С. 113-143.
18. Иванец, Н.Н. Типология алкоголизма / Н.Н. Иванец, Л.М. Савченко. – М.: Российский благотворительный фонд «Нет алкоголизму и наркомании», 1996. – 47 с.
19. Иващенко, Д.В. Безопасность применения транквилизаторов из группы бензодиазепинов при синдроме отмены алкоголя: фармакоэпидемиология и фармакогенетика. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Д.В. Иващенко; ФГБОУ ДПО «РМАНПО». – М., 2017.
20. Иващенко, Д.В. Терапия неосложненного синдрома отмены алкоголя с позиций доказательной медицины: фокус на бензодиазепины / Д.В. Иващенко, Е.А. Брюн, Л.М. Савченко, Д.А. Сычев // Наркология. – 2016. – Т. 15. – № 12 (180). – С. 83-91.
21. Иващенко, Д.В. Безопасность бензодиазепиновых транквилизаторов у пациентов с синдромом зависимости от алкоголя в условиях реальной клинической практики / Д.В. Иващенко, Е.В. Иванова, М.С. Застрожин и др. // Клиническая фармакология и терапия. – 2017. – Т. 26. – № 2. – С. 70-76.
22. Илларионова, Е.А. Химико-токсикологический анализ лекарственных средств из группы транквилизаторов: учебное пособие / Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский. – Иркутск: ИГМУ, 2016. – 44 с.
23. Калинина, А.Г. Токсичность алкоголя и алкогольных напитков / А.Г. Калинина // Алкоголизм. Руководство для врачей / под ред. Н.Н. Иванца, М.А. Винниковой. – М.: МИА, 2011. – С. 185-197.
24. Кибитов, А.О. Количественная оценка риска развития психопатологического варианта синдрома отмены алкоголя / А.О. Кибитов, Н.А. Чупрова // Российский психиатрический журнал. – 2015. – № 2. – С. 56-67.

25. Киржанова, В.В. Состояние и деятельность наркологической службы в Российской Федерации в 2017 году: Аналитический обзор / В.В. Киржанова, Н.И. Григорова, В.Н. Киржанов, О.В.Сидорюк – М.: ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, 2019. – 196 с.
26. Клинические рекомендации «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя. Синдром отмены алкоголя (алкогольное абстинентное состояние)» (утв. Минздравом России): <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/recomend/938>
27. Коробов, Н.В. Историческое значение бензодиазепинов и некоторые аспекты их применения в настоящее время / Н.В. Коробов // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2015. – Т. 17. – № 1. – С. 38-43.
28. Кошкина, Е.А. Обзор крупных международных исследований злоупотребления алкоголем, проведенных в период с 2008 по 2018 годы / Е.А. Кошкина, Д.В. Воронцов, А.А. Волкова и др. // Наркология. – 2019. – Т. 18. – № 12. – С. 72-91.
29. Кошкина, Е.А. Эпидемиология алкоголизма / Е.А. Кошкина, В.В. Киржанова, К.В. Вышинский // Наркология. Национальное руководство / под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. – М., 2016. – С. 50-62.
30. Кошкина, Е.А. Медико-социальные и экономические последствия злоупотребления алкоголем в России / Е.А. Кошкина, Н.И. Павловская, Р.И. Ягудина и др. // Наркология. – 2009. – Т.8. – № 11. – С. 29-34.
31. Крупицкий, Е.М. Парадигма доказательной медицины: принципы проведения клинических исследований в наркологии / Е.М. Крупицкий, А.В. Борцов // Вопросы наркологии. – 2005. – № 6. – С. 3-14.
32. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология / под ред. В. Г. Кукеса, Д. А. Сычева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 1024 с.
33. Курбангалиев, Р.А. Клиника и лечение алкогольного абстинентного синдрома / Р.А. Курбангалиев, К.С. Байсултанова, Г.Д. Танабергенова и др. // Медицинский журнал западного Казахстана. – 2008. – №2 (18) . – С. 80-86.
34. Ладыженский, М.Я. Бензодиазепиновые анксиолитики: востребованы ли они сегодня? / М.Я. Ладыженский, А.В. Городничев, Е.Г. Костюкова // Современная терапия психических расстройств. – 2014. – № 2. – С. 20-25.
35. Менделевич, В.Д. Проблема аддиктофобии в современной психиатрии (бензодиазепины и другие психофармакологические средства) / В.Д. Менделевич // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119. – № 1-2. – С. 75-81.
36. Митрохин, К.В. Классификация и краткое описание лекарственных препаратов — аналогов производных гамма-аминомасляной кислоты и токсических веществ, влияющих на ГАМК-ергическую связь / К.В. Митрохин, А.А. Баранишин // Анестезиология и реаниматология. – 2018. – Т. 63. – № 6. – С. 22-30.

37. Мокров, Г.В. Транслокационный белок TSPO 18 кДа и его лиганды: перспективный подход к созданию новых нейропсихотропных средств / Г.В. Мокров, О.А. Деева, М.А. Яркова и др. // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2018. – № 4. – С. 3-27.
38. Москвин, А.Н. Блокада транспортеров гамма-аминомасляной кислоты в синапсах головного мозга предохраняет от развития судорог при дыхании кислородом под давлением / А.Н. Москвин, Т.Ф. Платонова, С.Ю. Жилиев и др. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105. – № 4. – С. 510-519.
39. Мосолов, С.Н. Основы психофармакотерапии / С.Н. Мосолов. – М.: Восток, 1996. – 288 с.
40. Мосолов, С.Н. Тревожные и депрессивные расстройства: коморбидность и терапия / С.Н. Мосолов. – М.: Артинфо Паблишинг, 2007. – 63 с.
41. Насырова, Р.Ф. Введение в психофармакогенетику / Р.Ф. Насырова, М.В. Иванов, Н.Г. Незнанов. — СПб: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева, 2015. – 272 с.
42. Незнанов, Н.Г. Биопсихосоциальная концепция психических расстройств как основа холистического диагностического подхода. Часть 1 / Н.Г. Незнанов, А.П. Коцюбинский, Г.Э. Мазо // Социальная и клиническая психиатрия. – 2018. – Т. 28. – № 3. – С. 62-67.
43. Ненастьева, А.Ю. Психометрические шкалы в современной клинической наркологии / А.Ю. Ненастьева // Вопросы наркологии. – 2018. – № 7 (167). – С. 46-71.
44. Потанин, С.С. Концентрация антипсихотических препаратов в плазме крови и выраженность побочных эффектов при терапии обострения шизофрении / С.С. Потанин, Д.С. Бурминский, М.А. Морозова и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – Т. 115. – № 11. – С. 40-46.
45. Психические расстройства и расстройства поведения (F00 - F99). (Класс V МКБ-10, адаптированный для использования в Российской Федерации) / под общей редакцией Б.А. Казаковцева, В.Б. Голланда. – М.: Минздрав России, 1998. – 512 с.
46. Рыткин, Э.И. Микро-РНК как новый биомаркер активности системы цитохрома P-450: значение для прогнозирования антиагрегантного действия ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов / Э.И. Рыткин, К.Б. Мирзаев, И.В. Буре, Д.А. Сычев // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91. – № 8. – С. 115-117.
47. Сахаров, А.В. Состояние микроциркуляции крови у больных алкоголизмом с неосложненным синдромом отмены алкоголя / А.В. Сахаров, Н.В. Говорин, А.И. Болванов // Вопросы наркологии. – 2014. – № 4. – С. 64–69.
48. Семьянов, А.В. Нейрон-глиальное взаимодействие в мозге. Учебно-методический материал по программе повышения квалификации

- «Хранение и обработка информации в биологических системах» / А.В. Семьянов, В.Б. Казанцев. – Нижний Новгород, 2007. – 107 с.
49. Сиволап, Ю.П. Злоупотребление алкоголем и фармакотерапия алкоголизма / Ю.П. Сиволап // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2014. – № 3. – С. 4-9.
 50. Сиволап, Ю.П. Лечение алкогольной зависимости: рациональные и спорные подходы / Ю.П. Сиволап // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Т. 114. – № 5-2. – С. 53-56.
 51. Смирнов, В.В. Разработка методики определения кортизола и 6-бета-гидроксикортизола в моче с целью установления активности изофермента СУР 3А4. Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / В.В. Смирнов; ГОУ ВПО «Московская медицинская академия». – М., 2011.
 52. Смирнов, В.В. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-р-гидроксикортизола в моче с целью определения активности изофермента СУР 3А4 / В.В. Смирнов, А.Ю. Савченко, Г.В. Раменская // Биомедицина. – 2010. – Т. 1. – № 4. – С. 56 — 60.
 53. Сычев, Д.А. Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкции по применению / под ред. В. Г. Кулес. – М.: 2009.
 54. Сычев, Д.А. Постепенная отмена (депрескرایбінг) бензодиазепиновых транквилизаторов / Д.А. Сычев, А.В. Жучков, О.В. Терещенко, Д.В. Иващенко // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 89-95.
 55. Сычев, Д.А. Изучение активности изоферментов цитохрома Р450 для прогнозирования межлекарственных взаимодействий лекарственных средств в условиях полипрагмазии / Д.А. Сычев, В.А. Отделенов, Н.П. Денисенко, В.В. Смирнов // Фармакогенетика и фармакогеномика. – 2016. – № 2. – С. 4-11.
 56. Точилов, В.А. Анксиолитики – недостающее звено в терапии психозов / В.А. Точилов // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2006. – Т. 8. – № 4. – С. 54-59.
 57. Цыганков, Б.Д. Цыганков Подходы к лечению абстинентного, постабстинентного состояния наркологических больных / Б.Д. Цыганков, С.А. Шамов, М.Н. Земсков // Российский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 32-36.
 58. Шабанов, П.Д. Кортиколиберин, астрессин и действие наркогенов / П.Д. Шабанов, А.А. Лебедев // Психофармакология и биологическая наркология. – 2008. – Т. 8. – № 1-2-2. – С. 2383-2384.
 59. Шамов, С.А. Клинические особенности формирования абстинентных и постабстинентных состояний у больных с зависимостью от психоактивных

- веществ при дифференцированной фармакотерапии. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / С.А. Шамо́в; ГУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт». – СПб., 2007.
60. Andersson, T. Diazepam metabolism by human liver microsomes is mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A isoforms / T. Andersson, J.O. Miners, M.E. Veronese, D.J. Birkett // *Br J Clin Pharmacol.* – 1994. – Vol. 38(2). – P. 131-7. – doi: 10.1111/j.1365-2125.1994.tb04336.x.
 61. Arendt, R.M. Determinants of benzodiazepine brain uptake: lipophilicity versus binding affinity / R.M. Arendt, D.J. Greenblatt, D.C. Liebisch [et al.] // *Psychopharmacology (Berl).* – 1987. – Vol. 93(1). – P. 72-6.
 62. Askgaard, G. Benzodiazepines should still be first-line treatment for alcohol withdrawal / G. Askgaard, A. Pottegård, A. Fink-Jensen // *Ugeskr Laeger.* – 2017. – Vol. 179(3). – V07160465.
 63. Bartel, DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions / D.P. Bartel // *Cell.* – 2009. – Vol. 136(2). – P. 215-33. – doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
 64. Benedict, N.J. Predictors of resistant alcohol withdrawal (RAW): A retrospective case-control study / N.J. Benedict, A. Wong, E. Cassidy [et al.] // *Drug Alcohol Depend.* – 2018. – Vol.192. – P. 303-308.
 65. Bertilsson, L. Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism: relationship to S-mephenytoin, but not debrisoquin, hydroxylation phenotype / L. Bertilsson, T.K. Henthorn, E. Sanz [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 1989. – Vol. 45(4). – P. 348-55. – doi: 10.1038/clpt.1989.40.
 66. Bird, R.D. Alcohol withdrawal: what is the benzodiazepine of choice? / R.D. Bird, E.H. Makela // *Ann Pharmacother.* – 1994. – Vol. 28(1). – P. 67-71.
 67. Braat, S. The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders / S. Braat, R.F. Kooy // *Neuron.* – 2015. – Vol. 86(5). – P. 1119-30. – doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.042.
 68. Busto, U. Comparison of two recently published algorithms for assessing the probability of adverse drug reactions / U. Busto, C.A. Naranjo, E.M. Sellers // *Br J Clin Pharmacol.* – 1982. – Vol. 13(2). – P. 223-7.
 69. Calcaterra, N.E. Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium) / N.E. Calcaterra, J.C. Barrow // *ACS Chem Neurosci.* – 2014. – Vol. 5(4). – 253-60. – doi: 10.1021/cn5000056.
 70. Cassidy, E.M. Symptom-triggered benzodiazepine therapy for alcohol withdrawal syndrome in the emergency department: a comparison with the standard fixed dose benzodiazepine regimen / E.M. Cassidy, I. O'Sullivan, P. Bradshaw [et al.] // *Emerg Med J.* – 2012. – Vol. 29(10). – P. 802-4. – doi: 10.1136/emered-2011-200509.
 71. Chin, J.H. Membrane-disordering action of ethanol: variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe / J.H. Chin, D.B. Goldstein // *Molecular Pharmacology.* – 1981. – Vol. 19. – P. 425-431.

72. Cohen-Kfir, E. Zinc inhibition of gamma-aminobutyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission / E. Cohen-Kfir, W. Lee, S. Eskandari, N. Nelson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102(17). – P. 6154-9. – doi: 10.1073/pnas.0501431102.
73. Court, M.H. Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9 / M.H. Court, S.X. Duan, C. Guillemette [et al.] // *Drug Metab Dispos.* – 2002. – Vol. 30(11). – P. 1257-65. – doi: 10.1124/dmd.30.11.1257.
74. Court, M.H. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver / M.H. Court, Q. Hao, S. Krishnaswamy [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2004. – Vol. 310(2). – P. 656-65. – doi: 10.1124/jpet.104.067660.
75. Daeppen, J.B. Symptom-triggered vs fixed-schedule doses of benzodiazepine for alcohol withdrawal: a randomized treatment trial / J.B. Daeppen, P. Gache, U. Landry [et al.] // *Arch Intern Med.* – 2002. – Vol. 162. – P. 1117–21.
76. De Andrés, F. To Genotype or Phenotype for Personalized Medicine? CYP450 Drug Metabolizing Enzyme Genotype-Phenotype Concordance and Discordance in the Ecuadorian Population / F. De Andrés, S. Terán, F. Hernández [et al.] // *OMICS.* – 2016. – Vol. 20(12). – P. 699-710. – doi: 10.1089/omi.2016.0148.
77. De Carolis, D.D. Symptom-driven lorazepam protocol for treatment of severe alcohol withdrawal delirium in the intensive care unit / D.D. De Carolis, K.L. Rice, L. Ho [et al.] // *Pharmacotherapy.* – 2007. – Vol. 27(4). – P. 510-8.
78. de Queiroz, A.C. Brain changes in leukemias. Histopathological aspects of choroid plexus involvement / A.C. de Queiroz, D.A. Ribeiro // *Arq Neuropsiquiatr.* – 1978. – Vol. 36(4). – P. 332-9. – doi: 10.1590/s0004-282x1978000400007.
79. De Witte, P. Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues / P. De Witte, E. Pinto, M. Ansseau, P. Verbanck // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2003. – Vol. 27(3). – P. 189-97.
80. Dean, L. Diazepam Therapy and CYP2C19 Genotype / L. Dean // *Medical Genetics Summaries [Internet]* / V. Pratt, H. McLeod, W. Rubinstein [et al.] // Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). – 2012.
81. Desta, Z. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism / Z. Desta, X. Zhao, J.G. Shin, D.A. Flockhart // *Clin Pharmacokinet.* – 2002. – Vol. 41(12). – P. 913-58. – doi: 10.2165/00003088-200241120-00002.
82. Diamond, I. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism / I. Diamond, A.S. Gordon // *Physiological Reviews.* – 1997. – Vol. 77(1). – P. 1-20.
83. Ekström, L. miRNA-27b levels are associated with CYP3A activity in vitro and in vivo / L. Ekström, I. Skilving, M.L. Ovesjö // *Pharmacol Res Perspect.* – 2015. – Vol. 3(6). – e00192. – doi: 10.1002/prp2.192.

84. Elholm, B. Alcohol withdrawal syndrome: symptom-triggered versus fixed-schedule treatment in an outpatient setting / B. Elholm, K. Larsen, N. Hornnes [et al.] // *Alcohol Alcohol.* – 2011. – Vol. 46(3). – P. 318-23. – doi: 10.1093/alcalc/agr020.
85. Erdozain, A.M. Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review / A.M. Erdozain, L.F. Callado // *Adicciones.* – 2014. – Vol. 26(4). – P. 360-70.
86. Fukasawa, T. Effects of genetic polymorphism of cytochrome P450 enzymes on the pharmacokinetics of benzodiazepines / T. Fukasawa, A. Suzuki, K. Otani // *J Clin Pharm Ther.* – 2007. – Vol. 32(4). – P. 333-41.
87. Fukasawa, T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of etizolam are influenced by polymorphic CYP2C19 activity / T. Fukasawa, N. Yasui-Furukori, A. Suzuki [et al.] // *Eur J Clin Pharmacol.* – 2005. – Vol. 61(11). – P. 791-5.
88. Galteau, M.M. Urinary 6beta-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals / M.M. Galteau, F. Shamsa // *Eur J Clin Pharmacol.* – 2003. – Vol. 59. – P. 713–33.
89. Gold, J.A. A strategy of escalating doses of benzodiazepines and phenobarbital administration reduces the need for mechanical ventilation in delirium tremens / J.A. Gold, B. Rimal, A. Nolan, L.S. Nelson // *Crit Care Med.* – 2007. – Vol. 35(3). – P. 724-30.
90. Goodman, L.S. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics (13th ed.) / L.S. Goodman, L.L. Brunton, R. Hilal-Dandan [et al.] // New York: McGraw-Hill. – 2017. – 1440 pp.
91. Greenblatt, D.J. Kinetic and dynamic study of intravenous lorazepam: comparison with intravenous diazepam / D.J. Greenblatt, B.L. Ehrenberg, J. Gunderman [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1989. – Vol. 250(1). – P. 134-40.
92. Grobin, A.C. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol / A.C. Grobin, D.B. Matthews, L.L. Devaud, A.L. Morrow // *Psychopharmacology (Berl).* – 1998. – Vol. 139(1-2). – P. 2-19.
93. Gross, M.M. An improved quantitative system for assessing the acute alcoholic psychosis and related states (TSA and SSA) / M.M. Gross, E. Lewis, M. Nagarajan // *Alcohol Intoxication and Withdrawal: Experimental Studies / Advances in Experimental Medicine and Biology.* – Vol. 35. – P. 365-376.
94. Gruwez, B. Comparison of two assessment tools of antidepressant side-effects: UKU scale versus spontaneous notification / B. Gruwez, C. Gury, M.F. Poirier [et al.] // *Encephale.* – 2004. – Vol. 30(5). – P. 425-32. – doi: 10.1016/s0013-7006(04)95457-7.
95. Hack, J.B. Resistant alcohol withdrawal: does an unexpectedly large sedative requirement identify these patients early? / J.B. Hack, R.S Hoffman, L.S. Nelson // *J Med Toxicol.* – 2006. – Vol. 2(2). – P. 55-60.
96. Haller, C. GHB urine concentrations after single-dose administration in humans / C. Haller, D. Thai, P. Jacob 3rd, J.E. Dyer // *J Anal Toxicol.* – 2006. – Vol. 30(6). – P. 360-364. – doi: 10.1093/jat/30.6.360.

97. Hallfors, D.D. The dependence potential of short half-life benzodiazepines: a meta-analysis / D.D Hallfors, L. Saxe // *American Journal of Public Health*. – 1993. – Vol. 83(9). – P. 1300-1304.
98. Harris, R.A. Ethanol's molecular targets / R.A. Harris, J.R. Trudell, S.J. Mihic // *Science Signaling*. – 2008. – Vol. 1(28). – P. 7. – doi: 10.1126/scisignal.128re7.
99. He, P. Factors influencing midazolam hydroxylation activity in human liver microsomes / P. He, M.H. Court, D.J. Greenblatt, L.L. von Moltke // *Drug Metab Dispos*. – 2006. – Vol. 34(7). – P. 1198-207. – doi: 10.1124/dmd.105.008904.
100. He, P. Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance in vivo / P. He, M.H. Court, D.J. Greenblatt, L.L. von Moltke // *Clin Pharmacol Ther*. – 2005. – Vol. 77(5). – P. 373-87. – doi: 10.1016/j.clpt.2004.11.112.
101. Hoffman, R.S. Management of moderate and severe alcohol withdrawal syndromes / R.S. Hoffman, G.L. Weinhouse // 2019. – URL: <https://www.uptodate.com/contents/management-of-moderate-and-severe-alcohol-withdrawal-syndromes>.
102. Holbrook, A.M. Diagnosis and management of acute alcohol withdrawal / A.M. Holbrook, R. Crowther, A. Lotter [et al.] // *CMAJ*. – 1999. – Vol. 160(5). – P. 675–80.
103. Holleck, J.L. Symptom-Triggered Therapy for Alcohol Withdrawal Syndrome: a Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials / J.L. Holleck, N. Merchant, C.G. Gunderson // *J Gen Intern Med*. – 2019. – Vol. 34(6). – P. 1018-1024. – doi: 10.1007/s11606-019-04899-7.
104. Hollister, L.E. Benzodiazepines — an overview / L.E. Hollister // *Br J Clin Pharmacol*. – 1981. – Vol. 11. – P. 117S-9S.
105. Inomata, S. CYP2C19 genotype affects diazepam pharmacokinetics and emergence from general anesthesia / S. Inomata, A. Nagashima, F. Itagaki [et al.] // *Clin Pharmacol Ther*. – 2005. – Vol. 78(6). – P. 647-55. – doi: 10.1016/j.clpt.2005.08.020.
106. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Findings from the Global Burden of Disease Study 2017. – Seattle, WA. – IHME. – 2018.
107. Jaeger, T.M. Symptom-triggered therapy for alcohol withdrawal syndrome in medical inpatients / T.M. Jaeger, R.H. Lohr, V.S. Pankratz // *Mayo Clin Proc*. – 2001. – Vol. 76(7). – P. 695-701.
108. Jansen, M. Synthesis of GABAA receptor agonists and evaluation of their alpha-subunit selectivity and orientation in the GABA binding site / M. Jansen, H. Rabe, A. Strehle [et al.] // *J Med Chem*. – 2008. – Vol. 51(15). – P. 4430-48. – doi: 10.1021/jm701562x.
109. Jembrek, M.J. GABA receptors: pharmacological potential and pitfalls / M.J. Jembrek, J. Vlainic // *Curr Pharm Des*. – 2015. – Vol. 21(34). – P. 4943-59. – doi: 10.2174/1381612821666150914121624.
110. Jose, M. Role of CYP2C19 gene polymorphism in acute alcohol withdrawal treatment with loading dose of diazepam in a South Indian

- population / M. Jose, J. Mathaiyan, S. Kattimani [et al.] // *Eur J Clin Pharmacol*. – 2016. – Vol. 72(7). – P. 807-12.
111. Jung, F. Diazepam metabolism by cDNA-expressed human 2C P450s: identification of P4502C18 and P4502C19 as low K(M) diazepam N-demethylases / F. Jung, T.H. Richardson, J.L. Raucy, E.F. Johnson // *Drug Metab Dispos*. – 1997. – Vol. 25(2). – P. 133-9.
 112. Kaim, S. Treatment of the acute alcohol withdrawal state: a comparison of four drugs / S. Kaim, C. Klett, B. Rothfeld // *Am J Psychiatry*. – 1969. – Vol. 125. – P. 1640-1646.
 113. Kang, M. Toxicity, Benzodiazepine. StatPearls [Internet] / M. Kang, S. Ghassemzadeh // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2018.
 114. Kanto, J. Cerebrospinal fluid of diazepam and its metabolites in man / J. Kanto, L. Kangas, T. Siirtola // *Acta Pharmacol Toxicol*. – 1975. – Vol. 36. – P. 328-34.
 115. Kattimani, S. Clinical management of alcohol withdrawal: A systematic review / S. Kattimani, B. Bharadwaj // *Ind Psychiatry J*. – 2013. – Vol. 22(2) . – P. 100-8. – doi: 10.4103/0972-6748.132914.
 116. Klieber, S. Contribution of the N-glucuronidation pathway to the overall in vitro metabolic clearance of midazolam in humans / S. Klieber, S. Hugla, R. Ngo [et al.] // *Drug Metab Dispos*. – 2008. – Vol. 36(5). – P. 851-62. – doi: 10.1124/dmd.107.019539.
 117. Knutson, B. Anticipation of increasing monetary reward selectively recruits nucleus accumbens / B. Knutson, C.M. Adams, G.W. Fong, D. Hommer // *J Neurosci*. – 2001. – Vol. 21(16). – RC159.
 118. Lalli, G. Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons / G. Lalli, S. Gschmeissner, G. Schiavo // *Journal of Cell Science*. – 2003. – Vol. 116(22). – P.4639-4350. – doi: 10.1242/jcs.00727.
 119. Lang, L.M. The ratio of 6 β -hydroxycortisol to cortisol in urine as a measure of cytochrome P450 3A activity in postmortem cases / L.M. Lang, K. Linnet // *J Forensic Sci*. – 2014. – Vol. 59. – P. 1036-40. – doi:10.1111/ 1556-4029.12418.
 120. Lang, S. The role of peripheral benzodiazepine receptors (PBRs) in CNS pathophysiology / S. Lang // *Curr Med Chem*. – 2002. – Vol. 9(15). – P. 1411-5. – doi: 10.2174/0929867023369745.
 121. Lee, J. Distribution of Exogenous and Endogenous CYP3A Markers and Related Factors in Healthy Males and Females / J. Lee, A.H. Kim, S. Yi [et al.] // *AAPS J*. – 2017. – Vol. 19(4). – P. 1196-1204. – doi: 10.1208/s12248-017-0090-8.
 122. Lejoyeux, M. Benzodiazepine treatment for alcohol-dependent patients / M. Lejoyeux, J. Solomon, J. Adès // *Alcohol Alcohol*. – 1998. – Vol. 33. – P. 563-75.

123. Lepper, E.R. Effect of common CYP3A4 and CYP3A5 variants on the pharmacokinetics of the cytochrome P450 3A phenotyping probe midazolam in cancer patients / E.R. Lepper, S.D. Baker, M. Permenter [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11(20). – P. 7398-404.
124. Lingjaerde, O. The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients / O. Lingjaerde, U.G. Ahlfors, P. Bech [et al.] // *Acta Psychiatr Scand Suppl.* – 1987. – Vol. 334. – P. 1-100.
125. Lithari, C. Alcohol affects the brain's resting-state network in social drinkers / C. Lithari, M.A. Klados, C. Pappas [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(10). – e48641. – doi: 10.1371/journal.pone.0048641.
126. Maekawa, K. Functional characterization of CYP3A4.16: catalytic activities toward midazolam and carbamazepine / K. Maekawa, T. Yoshimura, Y. Saito [et al.] // *Xenobiotica.* – 2009. – Vol. 39(2). – P. 140-7. – doi: 10.1080/00498250802617746.
127. Mandrioli, R. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective / R. Mandrioli, L. Mercolini, M.A. Raggi // *Curr Drug Metab.* – 2008. – Vol. 9(8). – P. 827-44. – doi: 10.2174/138920008786049258.
128. Manikant, S. Loading dose diazepam therapy for alcohol withdrawal state / S. Manikant, B.M. Tripathi, B.S. Chavan // *Indian J Med Res.* – 1993. – Vol. 98. – P. 170–73.
129. Mårde Arrhén, Y. A comparison of 4 β -hydroxycholesterol : cholesterol and 6 β -hydroxycortisol : cortisol as markers of CYP3A4 induction / Y. Mårde Arrhén, H. Nylén, A. Lövgren-Sandblom [et al.] // *Br J Clin Pharmacol.* – 2013. – Vol. 75(6). – P. 1536-40. – doi: 10.1111/bcp.12016.
130. Mayo-Smith, M.F. Management of alcohol withdrawal delirium. An evidence-based practice guideline / M.F. Mayo-Smith, L.H. Beecher, T.L. Fischer [et al.] // *Arch Intern Med.* – 2004. – Vol. 164(13). – P. 1405-12.
131. Mayo-Smith, M.F. Pharmacological management of alcohol withdrawal. A meta-analysis and evidence-based practice guideline / M.F. Mayo-Smith // *JAMA.* – 1997. – Vol. 278(2). – P. 144-51.
132. Miller, M.E. Clonazepam acetylation in fast and slow acetylators / M.E. Miller, W.A. Garland, B.H. Min [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 1981. – Vol. 30(3). – P. 343-7. – doi: 10.1038/clpt.1981.170.
133. Mirijello, A. Identification and management of alcohol withdrawal syndrome / A. Mirijello, C. D'Angelo, A. Ferrulli [et al.] // *Drugs.* – 2015. – Vol. 75(4). – P. 353-65.
134. Moschitto, L.J. Concentration-independent plasma protein binding of benzodiazepines / L.J. Moschitto, D.J. Greenblatt // *J Pharm Pharmacol.* – 1983. – Vol. 35. – P. 179-80.
135. Nelson, N. The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters / N. Nelson // *J Neurochem.* – 1998. – Vol. 71(5). – P. 1785-803. – doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71051785.x.

136. Neznanov, N.G. Perspectives and problems of the development of bio-psycho-social approach in the therapy of mental disorders / N.G. Neznanov, A.V. Vasilyeva, V.D. Wied // *Dynamische Psychiatrie*. – 2008. – Vol. 41, N 5–6. – P. 205–212.
137. Nutt, D.J. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder / D.J. Nutt, A.L. Malizia // *Br J Psychiatry*. – 2001. – Vol. 179. – P. 390-6. – doi: 10.1192/bjp.179.5.390.
138. Olivera, M. Effect of common NAT2 variant alleles in the acetylation of the major clonazepam metabolite, 7-aminoclonazepam / M. Olivera, C. Martínez, G. Gervasini [et al.] // *Drug Metab Lett*. – 2007. – Vol. 1(1). – P. 3-5. – doi: 10.2174/187231207779814283.
139. Olkkola, K.T. Midazolam and Other Benzodiazepines / K.T. Olkkola, J. Ahonen // *Handb Exp Pharmacol*. – 2008. – Vol. 182. – P. 335-60. – doi: 10.1007/978-3-540-74806-9_16.
140. Olsen, R.W. GABA Receptor Physiology and Pharmacology // R.W. Olsen, T.M. DeLorey // *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition / Philadelphia: Lippincott-Raven. – 1999.
141. Olsen, R.W. Role of GABA_A receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model / R.W Olsen, J. Liang // *Mol Brain*. – 2017. – Vol. 10(1). – P. 45. – doi: 10.1186/s13041-017-0325-8.
142. Oneda, B. The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test / B. Oneda, S. Crettol, E. Jaquenoud Sirot [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. – 2009. – Vol. 19(11). – P. 877-83.
143. Ono, S. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C19 and the 3A subfamily / S. Ono, T. Hatanaka, S. Miyazawa [et al.] // *Xenobiotica*. – 1996. – Vol. 26(11). – P. 1155-66. – doi: 10.3109/00498259609050260.
144. Pan, Y.Z. MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting / Y.Z. Pan, W. Gao, A.M. Yu // *Drug Metab Dispos*. – 2009. – Vol. 37(10). – P. 2112-7. – doi: 10.1124/dmd.109.027680.
145. Papadopoulos, V. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function / V. Papadopoulos, M. Baraldi, T.R. Guilarte [et al.] // *Trends Pharmacol Sci*. – 2006. – Vol. 27(8). – P. 402-9. – doi: 10.1016/j.tips.2006.06.005.
146. Patel, S.I. Intravenous and intramuscular formulations of antiseizure drugs in the treatment of epilepsy / S.I. Patel, A.K. Birnbaum, J.C. Cloyd, I.E. Leppik // *CNS Drugs*. – 2015. – Vol. 29(12). – P. 1009-22. – doi: 10.1007/s40263-015-0289-0.
147. Perry, E.C. Inpatient management of acute alcohol withdrawal syndrome / E.C. Perry // *CNS Drugs*. – 2014. – Vol. 28(5). – P. 401-10.

148. Picotte, J.J. Plastic responses to temporal variation in moisture availability: consequences for water use efficiency and plant performance / J.J. Picotte, D.M. Rosenthal, J.M. Rhode, M.B. Cruzan // *Oecologia*. – 2007. – Vol. 153(4). – P. 821-32. – doi: 10.1007/s00442-007-0794-z.
149. Reoux, J.P. Divalproex sodium in alcohol withdrawal: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial / J.P. Reoux, A.J. Saxon, C.A. Malte [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2001. – Vol. 25. – P. 1324-7.
150. Rey, E. Pharmacokinetic optimization of benzodiazepine therapy for acute seizures. Focus on delivery routes / E. Rey, J.M. Tréluyer, G. Pons // *Clin Pharmacokinet*. – 1999. – Vol. 36(6). – P. 409-24. – doi: 10.2165/00003088-199936060-00003.
151. Richman, L.S. Evaluation of a Symptom-triggered Protocol for Alcohol Withdrawal for Use in the Emergency Department, General Medical Wards, and Intensive Care Unit / L.S. Richman, C. Garcia, N. Bouchard [et al.] // *J Psychiatr Pract*. – 2019. – Vol. 25(1). – P. 63-70. – doi: 10.1097/PRA.0000000000000354.
152. Riss, J. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics / J. Riss, J. Cloyd, J. Gates, S. Collins // *Acta Neurol Scand*. – 2008. – Vol. 118(2). – P. 69-86. – doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01004.x.
153. Rottenberg, H. Membrane solubility of ethanol in chronic alcoholism. The effect of ethanol feeding and its withdrawal on the protection by alcohol of rat red blood cells from hypotonic hemolysis / H. Rottenberg // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1986. – Vol. 855(2). – P. 211-22.
154. Sachdeva, A. A comparative study of fixed tapering dose regimen versus symptom-triggered regimen of lorazepam for alcohol detoxification / A. Sachdeva, M. Chandra, S.N. Deshpande // *Alcohol Alcohol*. – 2014. – Vol. 49(3). – P. 287-91. – doi: 10.1093/alcalc/agt181.
155. Sachdeva, A. Alcohol withdrawal syndrome: benzodiazepines and beyond / A. Sachdeva, M. Choudhary, M. Chandra // *J Clin Diagn Res*. – 2015. – Vol. 9(9). – VE01–VE07. – doi: 10.7860/JCDR/2015/13407.6538.
156. Saitz, R. Individualized treatment for alcohol withdrawal. A randomized double-blind controlled trial / R. Saitz, M.F. Mayo-Smith, M.S. Roberts [et al.] // *JAMA*. – 1994. – Vol. 272. – P. 519-23.
157. Saitz, R. Clinical practice. Unhealthy alcohol use / R. Saitz // *N Engl J Med*. – 2005. – Vol. 352. – P. 596-607.
158. Sarff, M. Alcohol withdrawal syndromes in the intensive care unit / M. Sarff, J.A. Gold // *Crit Care Med*. – 2010. – Vol. 38(9). – P. 494-501.
159. Schuckit, M.A. Recognition and management of withdrawal delirium (Delirium Tremens) / M.A. Schuckit // *N Engl J Med*. – 2014. – Vol. 371(22). – P. 2109–13. – doi: 10.1056/NEJMra1407298.
160. Sellers, E.M. Diazepam pharmacokinetics after intravenous administration in alcohol withdrawal / E.M. Sellers, P. Sandor, H.G. Giles [et al.] // *Br J Clin Pharmacol*. – 1983. – Vol. 15. – P. 125–27.

161. Sen, S. A Symptom-Triggered Benzodiazepine Protocol Utilizing SAS and CIWA-Ar Scoring for the Treatment of Alcohol Withdrawal Syndrome in the Critically Ill / S. Sen, P. Grgurich, A. Tulolo [et al.] // *Ann Pharmacother.* – 2017. – Vol. 51(2). – P. 101-110. – doi: 10.1177/1060028016672036.
162. Shah, R.R. CYP450 genotype and pharmacogenetic association studies: a critical appraisal / R.R. Shah, A. Gaedigk, A. LLerena [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2016. – Vol. 17(3). – P. 259-75. – doi: 10.2217/pgs.15.172.
163. Shaw, J.M. Development of optimal treatment tactics for alcohol withdrawal. I. Assessment and effectiveness of supportive care / J.M. Shaw, G.S. Kolesar, E.M. Sellers [et al.] // *J Clin Psychopharmacol.* – 1981. – Vol. 1(6). – P. 382-89.
164. Sigel, E. Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors / E. Sigel // *Curr Top Med Chem.* – 2002. – Vol. 2(8). – P. 833-9. – doi: 10.2174/1568026023393444.
165. Slawecki, C.J. Effects of chronic ethanol exposure on neurophysiological responses to corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y / C.J. Slawecki, C. Somes, C.L. Ehlers // *Alcohol Alcohol.* – 1999. – Vol. 34(3). – P. 289-99.
166. Sohn, D.R. Incidence of S-mephenytoin hydroxylation deficiency in a Korean population and the interphenotypic differences in diazepam pharmacokinetics / D.R. Sohn, M. Kusaka, T. Ishizaki [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 1992. – Vol. 52(2). – P. 160-9. – doi: 10.1038/clpt.1992.125.
167. Stakos, D.A. Platelet microRNAs: From platelet biology to possible disease biomarkers and therapeutic targets / D.A. Stakos, A. Gatsiou, K. Stamatelopoulos [et al.] // *Platelets.* – 2013. – Vol. 24(8). – P. 579-89. – doi: 10.3109/09537104.2012.724483.
168. Sullivan, J.T. Assessment of alcohol withdrawal: The revised clinical institute withdrawal assessment for alcohol scale (CIWA-Ar) / J.T. Sullivan, K. Sykora, J. Schneidermann [et al.] // *Br J Addiction.* – 1989. – Vol. 89. – P. 1353-1357.
169. Tabakoff, B. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history / B. Tabakoff, P.L. Hoffman // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2013. – Vol. 113. – P. 20-37. – doi: 10.1016/j.pbb.2013.10.009.
170. Takahashi, K. Regulation of cytochrome b5 expression by miR-223 in human liver: effects on cytochrome P450 activities / K. Takahashi, Y. Oda, Y. Toyoda [et al.] // *Pharm Res.* – 2014. – Vol. 31(3). – P. 780-94. – doi: 10.1007/s11095-013-1200-7.
171. Tsai, G. The glutamatergic basis of human alcoholism / G. Tsai, D.R. Gastfriend, J.T. Coyle // *Am J Psychiatry.* – 1995. – Vol. 152(3). – P. 332-40.
172. United Nations General Assembly. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. 21 October 2015, A/RES/70/1. available at: <https://www.refworld.org/docid/57b6e3e44.html> [accessed 21 March 2020]

173. Vachirayonstien, T. MicroRNA-30c-1-3p is a silencer of the pregnane X receptor by targeting the 3'-untranslated region and alters the expression of its target gene cytochrome P450 3A4 / T. Vachirayonstien, B. Yan // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1859(9). – P. 1238-1244. – doi: 10.1016/j.bbagr.2016.03.016.
174. Wang, G.J. Regional brain metabolism during alcohol intoxication / G.J. Wang, N.D. Volkow, D. Franceschi [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2000. – Vol. 24(6). – P. 822-9.
175. Wei, Z. The effect of microRNAs in the regulation of human CYP3A4: a systematic study using a mathematical model / Z. Wei, S. Jiang, Y. Zhang [et al.] // *Sci Rep*. – 2014. – Vol. 5. – P. 4283. – doi: 10.1038/srep04283.
176. Weintraub, S.J. Diazepam in the treatment of moderate to severe alcohol withdrawal. Review / S.J. Weintraub // *CNS Drugs*. – 2017. – Vol. 31(2). – P. 87-95. – doi: 10.1007/s40263-016-0403-y.
177. Weiss, F. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats / F. Weiss, L.H. Parsons, G. Schulteis [et al.] // *J Neurosci*. – 1996. – Vol. 16(10). – P. 3474-85.
178. Williams, D. A comparison of rating scales for the alcohol-withdrawal syndrome / D. Williams, J. Lewis, A. McBride // *Alcohol Alcohol*. – 2001. – Vol. 36(2). – P. 104-8. – doi:10.1093/alcalc/36.2.104.
179. Williams, D.B. Benzodiazepines induce a conformational change in the region of the gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha(1)-subunit M3 membrane-spanning segment / D.B. Williams, M.H. Akabas // *Mol Pharmacol*. – 2000. – Vol. 58(5). – P. 1129-36. – doi: 10.1124/mol.58.5.1129.
180. Wirkner, K. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels / K. Wirkner, W. Poelchen, L. Köles [et al.] // *Neurochemistry International*. – 1999. – Vol. 35(2). – P. 153-62.
181. Wong, A. Management of benzodiazepine-resistant alcohol withdrawal across a healthcare system: Benzodiazepine dose-escalation with or without propofol / A. Wong, N.J. Benedict, B.R. Lohr [et al.] // *Drug Alcohol Depend*. – 2015. – Vol. 154. – P. 296-9. – doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.07.005.
182. World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List, 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
183. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
184. Yang, T.J. Inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2B6 / T.J. Yang, K.W. Krausz, M. Shou [et al.] // *Biochem Pharmacol*. – 1998. – Vol. 55(10). – P. 1633-40. – doi: 10.1016/s0006-2952(98)00018-5.
185. Yang, T.J. Role of cDNA-expressed human cytochromes P450 in the metabolism of diazepam / T.J. Yang, M. Shou, K.R. Korzekwa [et al.] //

- Biochem Pharmacol. – 1998. – Vol. 55(6). – P. 889-96. – doi: 10.1016/s0006-2952(97)00558-3.
186. Zavala, F. Benzodiazepines, anxiety and immunity / F. Zavala // Pharmacol Ther. – 1997. – Vol. 75(3). – P. 199-216. – doi: 10.1016/s0163-7258(97)00055-7.
187. Zhang, Y.A. Diazepam metabolism in native Chinese poor and extensive hydroxylators of S-mephenytoin: interethnic differences in comparison with white subjects / Y.A. Zhang, J. Reviriego, Y.Q. Lou [et al.] // Clin Pharmacol Ther. – 1990. – Vol. 48(5). – P. 496-502. – doi: 10.1038/clpt.1990.185.
188. Zorrilla, E.P. Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction / E.P. Zorrilla, M.L. Logrip, G.F. Koob // Front Neuroendocrinol. – 2014. – Vol. 35(2). – P. 234-44. – doi: 10.1016/j.yfrne.2014.01.001.

БЛАГОДАРНОСТИ

Директор ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ», к.м.н. Копоров С.Г.

Заместитель директора ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» по медицинской части Шипицын В.В.

Сотрудники НИИ молекулярной и персонализированной медицины ГБОУ ДПО «РМАНПО Минздрава России» д.б.н., директор Гришина Е.А., н.с. Рыжикова К.А.

К.м.н., профессор кафедры наркологии ФГБОУ ДПО «РМАНПО Минздрава России» Савченко Л.М.

Заведующий лабораторией клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, к.фарм.н. Смирнов В.В.

Сотрудники химико-токсикологической лаборатории Референс-центра по мониторингу потребления ПАВ ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» зав.филиалом Бурцев А.А., к.фарм.н. Петухов А.Е.

Сотрудники молекулярно-генетической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» врач-генетик Есакова А.П., лаб.-иссл. Сорокин А.С.

Учёный секретарь ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» к.м.н. Бедина И.А.

Главный научный сотрудник ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» д.м.н., профессор Кошкина Е.А.

Сотрудники учебного отдела ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» руководитель отдела Мексичева Е.А., ведущий специалист по учебно-методической работе Хусаинова И.Ю.

Сотрудники клинических филиалов ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» заведующий филиалом Вдовин А.С., к.м.н., врач-психиатр-нарколог наркологического отделения №2 Галактионова Т.Е., заведующий КДО Иванов А.В., заведующий ОРИТ Шарова Е.В., врач-психиатр-нарколог ОРИТ Бойко Ю.В., заведующий отделением №7 Романов А.С., заведующий ОННП Юсупов А.А., заведующий отделением №37 Клинического филиала №1 Сапаров А.Т., заведующая аптекой Газимагомедова З.М.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1.

Протокол исследования пациента (Код) _____

Шкала оценки COA CIWA-Ar

1.	Тошнота и рвота 0 - нет тошноты и рвоты 1 - незначительная тошнота 2 - умеренная тошнота 3 - ощутимая тошнота 4 - тошнота с позывами на рвоту 5 - постоянные позывы на рвоту 6 - один эпизод рвоты за последний час 7 - 2 и более эпизодов рвоты за час	2.	Возбуждение 0 - нормальная активность 1 - активность слегка повышена 2 - легкое возбуждение периодами 3 - легкое возбуждение постоянно 4 - умеренное возбуждение периодами 5 - умеренное возбуждение постоянно 6 - выраженное возбуждение периодами 7 - постоянное выраженное возбуждение
3.	Тремор 0 - нет 1 - зрительно не видим, но ощущается тактильно 2 - видимый 3 - 4 - умеренный 5 - 6 - 7 - очень выраженный	4.	Тактильные нарушения 0 - нет 1 - очень легкое ощущение покалывания, онемения, зуда, жжения и т.п. 2 - легкие ощущения того же 3 - умеренные ощущения (4 - 7 тактильные галлюцинации) 4 - умеренные тактильные галлюцинации 5 - выраженные тактильные галлюцинации периодами 6 - выраженные тактильные галлюцинации непрерывные, пугающие 7 - чрезвычайно выраженные нарушения, дезориентирован
5.	Пароксизмальная потливость 0 - нет 1 - только ладоней 2 - 3 - есть потливость, но без капель пота 4 - капли пота на лбу 5 - пот течет по лицу 6 - одежда слегка взмокла от пота 7 - одежда пропитана потом	6.	Слуховые галлюцинации 0 - нет (1-3 - отсутствие истинных галлюцинаций) 1 - звуки кажутся чуть более резкими и пугающими 2 - то же выражено легко 3 - то же выражено умеренно (4-7 - истинные слуховые галлюцинации) 4 - умеренные слуховые галлюцинации 5 - выраженные слуховые галлюцинации периодами 6 - очень выраженные слуховые галлюцинации постоянно 7 - галлюцинации очень выраженные и пугающие, дезориентирован
7.	Тревога 0 - нет 1 - легкое беспокойство 2 - более постоянное беспокойство 3 - постоянное беспокойство 4 - умеренная тревога 5 - постоянная тревога 6 - выраженная тревога 7 - паника (как при психозе)		

8.	Зрительные галлюцинации 0 - нет 1 - легкое повышение чувствительности к свету 2 - легкое раздражающее действие света 3 - умеренное раздражающее действие света 4 - умеренные зрительные галлюцинации 5 - выраженные галлюцинации (периодами) 6 - чрезвычайно выраженные галлюцинации 7 - дезориентирован полностью
9.	Головная боль 0 - нет 1 - очень легкая 2 - легкая 3 - умеренная 4 - умеренная/ выраженная 5 - выраженная 6 - очень выраженная 7 - чрезвычайно выраженная
10.	Ориентация / Ясность сознания 0 - полностью ориентирован 1 - затруднено последовательное сложение, неуверен в дате 2 - дезориентирован в дате не больше, чем на 2 календарных дня 3 - дезориентирован в дате более, чем на 2 календарных дня 4 - дезориентирован в месте и / или личности

Пульс_____

0 = < 79

1 = 80 - 89

2 = 90 - 99

3 = 100 -109

4 = 110 -119

5 = 120 -129

АД_____

0 = ≤ 120 или ≤ 80

1 = ≤ 130 -140 или ≤ 90 -95

2 = ≤ 140 -150 или ≤ 95 - 100

3 = ≤ 150 -160 или ≤ 100 -105

4 = ≤ 160 -170 или ≤ 105 -110

5 = > 170 или > 110

До лечения:

Суммарный балл без пульса и АД_____

Суммарный балл с пульсом и АД_____

После лечения:

Суммарный балл без пульса и АД_____

Суммарный балл с пульсом и АД_____

Исследователь

_____/Скрябин В.Ю.

Приложение №2.

Протокол исследования пациента (Код) _____

Шкала оценки побочного действия UKU (UKU Side-Effect Rating Scale)

№	Показатель	До лечения	После лечения
1	Психические побочные эффекты		
1.1	Нарушения концентрации		
1.2	Астения / вялость / повышенная утомляемость		
1.3	Сонливость / седация		
1.4	Нарушения памяти		
1.5	Депрессия		
1.6	Напряжение / внутреннее беспокойство		
1.7	Увеличение продолжительности сна		
1.8	Уменьшение продолжительности сна		
1.9	Увеличение интенсивности сновидений		
1.10	Эмоциональная индифферентность		
2	Неврологические побочные эффекты		
2.1	Дистония		
2.2	Ригидность		
2.3	Гипокинезия / акинезия		
2.4	Гиперкинезия		
2.5	Тремор		
2.6	Акатизия		
2.7	Эпилептические припадки		
2.8	Парестезии		
3	Вегетативные побочные эффекты		
3.1	Нарушения аккомодации		
3.2	Усиленное слюноотделение (гиперсаливация)		
3.3	Сниженное слюноотделение (сухость во рту)		
3.4	Тошнота / рвота		
3.5	Диарея		
3.6	Запоры		
3.7	Нарушения мочеиспускания (задержка)		
3.8	Нарушения мочеиспускания (усиление)		
3.9	Ортостатизм		
3.10	Учащенное сердцебиение / тахикардия		
3.11	Усиленное потоотделение		
4	Другие побочные эффекты		

4.1	Кожные высыпания		
4.2	Зуд		
4.3	Светочувствительность		
4.4	Гиперпигментация		
4.5	Прибавка в весе		
4.6	Потеря в весе		
4.7	Нарушения менструального цикла (меноррагия)		
4.8	Нарушения менструального цикла (гипоменоррея)		
4.9	Галакторрея		
4.10	Гинекомастия		
4.11	Усиленное сексуальное влечение		
4.12	Ослабленное сексуальное влечение		
4.13	Эректильная дисфункция		
4.14	Нарушения эякуляции		
4.15	Нарушения оргазма		
4.16	Вагинальная сухость		
4.17	Головные боли		
4.18	Физическая зависимость		
4.19	Психологическая зависимость		
	ИТОГО		

Исследователь

_____/Скрябин В.Ю.

Приложение №3.

**Алгоритм Наранжо для оценки причинно-следственной связи
«неблагоприятная побочная реакция – лекарственное средство»**

№№	Вопросы	Да	Нет	Неизвестно
1	Были ли ранее достоверные сообщения об этом НЯ?	+1	0	0
2	НЯ возникло после введения (приема) подозреваемого лекарства?	+2	-1	0
3	Улучшилось ли состояние испытуемого (проявления НЯ) после прекращения приема препарата или после введения специфического антидота?	+1	0	0
4	Возобновилось ли НЯ после повторного введения препарата?	+2	-1	0
5	Есть ли еще причины (кроме подозреваемого лекарства), которые могли вызвать НЯ?	-1	+2	0
6	Было ли лекарство обнаружено в крови (или других жидкостях) в концентрациях, известных как токсические?	+1	0	0
7	Было ли НЯ более тяжелым после увеличения дозы и менее тяжелым после ее уменьшения?	+1	0	0
8	Отмечал ли испытуемый аналогичную реакцию на то же или подобное лекарство при прежних его приемах?	+1	0	0
9	Было ли НЯ подтверждено объективно?	+1	0	0
10	Отмечалось ли повторение НЯ после назначения плацебо?	-1	+1	0