

Скрябин Валентин Юрьевич

**ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К НАЗНАЧЕНИЮ ДИАЗЕПАМА
ПАЦИЕНТАМ С РАЗНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ВАРИАНТАМИ
СИНДРОМА ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ
(ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ)**

14.01.27 – Наркология (медицинские науки)
14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология
(медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Московский научно-практический центр наркологии Департамента здравоохранения города Москвы».

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор, президент государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский научно-практический центр наркологии Департамента здравоохранения города Москвы» Брюн Евгений Алексеевич

Кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории генетики и геномики государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский научно-практический центр наркологии Департамента здравоохранения города Москвы» Застрожин Михаил Сергеевич

Официальные оппоненты:

Шамов Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра психиатрии, наркологии и психотерапии, заведующий учебной частью

Воронина Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», лаборатория психофармакологии, главный научный сотрудник

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации.

Защита состоится 25 марта 2021 года в 12.00 на заседании Диссертационного совета Д 208.093.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева» Минздрава России (адрес 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева д. 3) и на сайте института: <http://bekhterev.ru/>

Автореферат разослан 25 января 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук Яковлева Юлия Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Синдром отмены алкоголя (СОА) проявляется специфическим симптомокомплексом, объединяющим разнообразные соматические, неврологические и психические расстройства, выраженность которых обычно индивидуальна (Шамов С.А., 2007). 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).

Бензодиазепиновые транквилизаторы считаются «золотым стандартом» лечения СОА (Sachdeva A. et al., 2015). 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 (Weintraub S.J., 2017). Однако, несмотря на высокую частоту применения в наркологической практике, подбор их дозировок чаще всего носит эмпирический характер (Benedict N.J. et al., 2018). Между тем, клиническая практика показала, что применение бензодиазепинов в дозировках, превышающих среднетерапевтические, может быть сопряжено с возникновением нежелательных лекарственных реакций (НЛР).

Известно, что клиническая эффективность препаратов из группы бензодиазепиновых транквилизаторов отличается у разных людей (Fukasawa T. et al., 2007). Это связано с тем, что активность ферментов системы цитохрома P450 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 к настоящему времени исследования, демонстрируют влияние полиморфизма генов *CYP2C19* и *CYP3A4*, кодирующих элементы фармакокинетики и фармакодинамики диазепама, на показатели эффективности и безопасности терапии (Oneda B. et al., 2009; Fukasawa T. et al., 2005; Lepper E.R. et al., 2005; Yang T.J. et al., 1998; Jose M. et al., 2016). Эти данные делают перспективным изучение фармакогенетики диазепама, поиск клинических и генетических маркеров его эффективности и безопасности при различных вариантах СОА. Применение комплексного клинического и фармакогенетического исследования позволит прогнозировать эффективность и безопасность лечения пациентов с СОА.

Степень разработанности темы диссертационной работы

Следует отметить, что в России ранее проводилось исследование, посвящённое разработке персонализированного подхода к предупреждению

НЛР при назначении пациентам с СОА препарата из группы бензодиазепинов – бромдигидрохлорфенилбензодиазепамина (феназепам) (Иващенко Д.В., 2017). 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. Фармакогенетическая часть исследования не включала терапевтический лекарственный мониторинг. Диазепам в 2013 году был включён 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), в связи с чем в течение последних лет отмечается дефицит оригинальных русскоязычных исследований, посвящённых изучению эффективности и безопасности диазепама.

В Российской Федерации диазепам включён в стандарты специализированной медицинской помощи при абстинентном состоянии, вызванном употреблением алкоголя, в 2012 году.

В последние годы практически не проводилось исследований, посвящённых изучению различных клинических вариантов СОА. Можно лишь отметить опубликованную в 2015 году работу (Кибитов А.О., Чупрова Н.А., 2015), в рамках которой проведён сравнительный количественный анализ траектории развития алкогольной зависимости у стационарных пациентов в группах с различной преобладающей компонентой СОА. В указанной публикации использовалась упрощённая классификация СОА с выделением трёх клинических вариантов (психопатологического, соматовегетативного и смешанного), но не оценивалась тяжесть симптомов. 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 работы:

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

Задачи исследования:

1. Установить ассоциацию клинических вариантов СОА с тяжестью его проявлений, оценённой с помощью психометрических шкал.
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 проведённого 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 участия *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 фармакогенетических, фармакометаболических и фармакотранскриптомных биомаркеров в прогнозировании эффективности и безопасности применения диазепама при лечении 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

маркером отмечены большая эффективность терапии, но и большая частота возникновения НЛР, что связано с замедлением биотрансформации диазепам, обуславливающей нарастание его плазменной концентрации. Это позволяет рекомендовать проведение фармакогенетического тестирования у пациентов с синдромом отмены алкоголя перед назначением диазепам, 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 Учёным советом ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» (протокол №10 от 29 ноября 2017 года).

Апробация диссертации состоялась на заседании Учёного 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 проведён 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, его анализе и статистической обработке, 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.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе двух круглосуточных стационаров – Клинического филиала и Клинического филиала №1 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.).

Предметом исследования явилась проблема разработки персонализированного подхода к оптимизации психофармакотерапии диазепамом пациентов с СОА.

В соответствии с целью исследования анализировались клинико-anamnestические данные, оценивалась структура СОА с выделением преобладающей компоненты, на основании чего определялся клинический вариант течения СОА. Анализировались фармакогеномные (полиморфизм генов цитохрома P-450 *2C19*, *3A4/5*), фармакометаболические (активность изоферментов подсемейства CYP3A с помощью метаболического отношения концентраций метаболита ферментов (6 β -гидрокортизол) и эндогенного субстрата (кортизол) в моче), фармакотранскриптомные (уровень экспрессии *CYP3A4*, оценённый с помощью плазменных концентраций микро-РНК *miR-27b*) и фармакокинетические (уровни концентраций диазепама в плазме

крови и в слюне, оценённые с помощью терапевтического лекарственного мониторинга – ТЛМ) биомаркёры.

Объектом исследования являлись пациенты с алкогольной зависимостью с установленным диагнозом СОА, находившиеся на стационарном лечении, которые получали в течение 5 суток диазепам в форме раствора для внутримышечных и внутривенных инъекций в дозе 30 мг/сут. в рамках открытого несравнительного проспективного исследования. Введение диазепама осуществлялось внутримышечно три раза в сутки через равные интервалы времени в фиксированной дозе 10 мг (режим фиксированной дозы).

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

Критерии невключения в исследование: наличие острых или декомпенсированных хронических соматических и неврологических заболеваний; проведение экстренных хирургических вмешательств в течение 30 дней, предшествующих включению в исследование; наличие коморбидного психического заболевания шизофренического спектра (диагноз по МКБ: F20, F21), диагностированного ранее или выявленного в ходе проведения исследования; наличие в анамнезе других зависимостей, кроме зависимости от алкоголя и никотина; клиренс креатинина <50 мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови $\geq 1,5$ мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие в рационе пациентов продуктов, ингибирующих или индуцирующих CYP3A4; наличие противопоказаний к применению диазепама.

Для решения поставленных цели и задач осуществлён комплексный методологический подход с применением клинико-психопатологического, клинико-anamnestического, психометрического, лабораторного и статистического методов исследования.

Проведённое исследование включало следующие этапы: 1) 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; 2) проведение лабораторных исследований полученных образцов; 3) систематизация полученных данных, их статистическая обработка и

оформление результатов, формулировка положений, выносимых на защиту, установление критериев прогноза.

В первый день стационарного лечения с пациентами проводилось структурированное интервью, включающее сведения о семейной отягощённости, данные анамнеза заболевания и жизни, а также информацию о предшествующих госпитализациях. Психический статус пациентов оценивался клинически. Оценка выраженности психопатологической симптоматики осуществлялась с использованием психометрического метода. 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.

Кроме диазепама, все участники исследования в течение 5 дней получали минимизированную стандартную терапию СОА, которая не отличалась у разных пациентов и предусматривала использование инфузионных и ионосодержащих растворов (раствор натрия хлорида 0,9% + калия хлорид 10% + магния сульфат 25% в средней суточной дозе 800 мл), а также витаминов (раствор тиамин гидрохлорида 5% в средней суточной дозе 100 мг и раствор пиридоксин гидрохлорида 5% в средней суточной дозе 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 исследование. Данные препараты назначались только после завершения участия пациента в исследовании.

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.

Обследовано 100 пациентов в возрасте от 25 до 62 лет, средний возраст которых составил $42,66 \pm 9,8$ лет. У всех больных к моменту госпитализации была диагностирована 2, 2-3 или 3 стадия зависимости от алкоголя.

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 выраженной внутренней тревоги и беспокойства), снижение

аппетита, 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 и установочный горизонтальный нистагм, в более тяжёлых случаях наблюдалось присоединение симптомов мышечной дистонии, повышение рефлексов и появление патологических рефлексов.

В психическом статусе чаще всего обращали на себя внимание тревога, беспокойство, суетливость, иногда – психомоторное возбуждение. Часто у пациентов выявлялись неврозоподобные расстройства: психическая истощаемость, утомляемость и раздражительность. Кроме того, в структуре СОА выявлялись вторичное влечение к алкоголю и алкогольная агрипния.

Проведённое клиническое обследование выявило наличие у значительной части больных осложнений основного заболевания и коморбидной соматической и неврологической патологии, обусловленной токсическим действием алкоголя на организм: Токсическая энцефалопатия – 49 участников (49%), Алкогольная кардиомиопатия – 21 (21%), Алкогольный гепатит – 46 (46%), Артериальная гипертония – 30 (30%).

Наличие осложнений и сопутствующих заболеваний свидетельствовало о длительности течения алкогольной зависимости, и в значительной степени обуславливало тяжесть как СОА в целом, так и его отдельных клинических вариантов.

Для оценки тяжести СОА 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 – 1981 год). Безопасность диазепама оценивалась посредством анкетирования пациентов на предмет возникновения НЛР с применением шкалы оценки побочного действия «Udvald for Kliniske Undersogelser Scale» (UKU – 1987 год). Достоверность причинно-следственной связи между применением диазепама и возникновением НЛР оценивалась по алгоритму Наранжо (1982 год), после чего дальнейшему анализу подвергались только случаи с высокой степенью достоверности (определённая, вероятная и возможная). Оценка состояния участников с помощью стандартизированных психометрических шкал осуществлялась ежедневно на всём протяжении исследования. Полученные результаты оценивались в баллах. Критериями оценки эффективности и безопасности терапии диазепамом являлась динамика выраженности симптоматики в соответствии с вышеуказанными психометрическими шкалами.

Оценка метаболической активности изофермента СУР3А4

Определение активности изофермента СУР3А4, участвующего в метаболизме диазепама, осуществлялось по отношению концентрации 6-β-гидрокортизола к концентрации кортизола (метаболическое отношение

6 β -гидрокортизол / кортизол), поскольку 6- β -гидрокортизол образуется только под влиянием CYP3A4. Таким образом, высокие значения показателя метаболического отношения соответствовали высокому уровню активности изофермента CYP3A4, а низкие – низкому уровню активности.

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). 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 компании «Bio-Rad» (США) с применением коммерческих наборов реагентов «SNP-Скрин» (производитель: ООО «Синтол»).

Определение уровня микро-РНК

Забор крови для проведения исследования осуществлялся в одноразовые стерильные вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Экстракция суммарной РНК (включая микро-РНК) осуществлялась с использованием реагента Тризол (компания «Life Technologies», США) и набора miRNeasy Mini Kit (компания «Qiagen», Германия) в соответствии с протоколом производителей. Обратная транскрипция выполнялась с использованием набора MiScript II RT Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендованным протоколом. Экспрессия анализируемой микро-РНК и эндогенного контроля RNU6B определялась ПЦР-анализом в реальном времени в трёх повторностях с использованием набора MiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) и пресинтезированных праймеров miScript Primer Assay (Qiagen).

Терапевтический лекарственный мониторинг

Калибровочные и контрольные образцы (QC) готовили из рабочих стандартных растворов путём 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 нг/мл (нижний предел количественного определения, НПКО, LLOQ), 15 нг/мл (низкий QC), 1000 (средний QC), 1500 нг/мл (высокий QC). В качестве внутреннего стандарта (ВС) использовался диазепам в концентрации 250 нг/мл в ацетонитриле.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистический анализ полученных результатов осуществлялся посредством методов параметрической и непараметрической статистики с

использованием пакета прикладных программ STATISTICA v10.0 компании «StatSoft Inc.» (США). Метод выбирался с учётом нормальности распределения выборок, оценивавшейся посредством W-теста Шапиро-Уилка и однородности дисперсий, которую оценивали с помощью T-теста Фишера (при сравнении двух выборок) и теста Левена (при сравнении нескольких выборок). Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$ (при статистической мощности $> 80\%$). Доверительный интервал включал интервал значений, в пределах которого находился ожидаемый результат исследуемого параметра с вероятностью, равной 95%. При сравнении двух выборок количественных данных применялся t-тест Стьюдента, а также его непараметрический аналог: U-тест Манна-Уитни. Сравнение количественных данных одновременно нескольких выборок осуществлялось посредством параметрического однофакторного дисперсионного анализа и его непараметрического аналога: анализа Краскела-Уоллиса. Качественные признаки сравнивались с использованием критерия хи-квадрат (χ^2). При описании количественных данных, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали медиану и интерквартильный размах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Определение клинических вариантов СОА

Выделенные преобладающие компоненты СОА у обследованных пациентов соотносились с 4 клиническими вариантами СОА по классификации Н.Н. Иванца.

В большинстве случаев (51 участник, 51%) у пациентов установлен *нейровегетативный* вариант СОА, который проявлялся такими симптомами, как общая слабость, гипергидроз, расстройства сна и аппетита, тремор пальцев рук, языка и век, тахикардия, а также ощущение жажды, сухость и неприятный вкус во рту. У 24 участников (24%) 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. В остальных 11 случаях ведущими симптомами являлись субиктеричность склер, тошнота, рвота, боли в животе, тяжесть в правом подреберье, метеоризм и жидкий стул.

В 13 случаях (13%) диагностирован *церебральный* вариант СОА: пациенты жаловались на сильную головную боль, головокружение, гиперакцию и мышечные подёргивания. В оставшихся 12 случаях (12%) – *психопатологический* вариант СОА. У этих пациентов отмечались выраженные психические расстройства: тревога, беспокойство, неусидчивость, суетливость, страх (особенно в вечернее и ночное время), ощущение общей подавленности, снижение настроения и вспышки раздражительности с подавленностью. Кроме того, у этих больных

отмечались нарушения сна, варьирувавшие от поверхностного ночного сна с частыми пробуждениями до тотальной бессонницы. В семи случаях (7%) у пациентов наблюдались гипнагогические галлюцинации, носившие устрашающий характер, и беспокойный сон с кошмарными сновидениями.

**Результаты анализа установленных ассоциаций
клинических вариантов СОА с тяжестью его проявлений и
показателями эффективности и безопасности терапии диазепамом**

Объективная оценка тяжести проявлений СОА оценивалась с помощью психометрической шкалы CIWA-Ar по 10 основным параметрам: наличие тошноты и рвоты, тремора пальцев рук и предплечья, пароксизмальной потливости, чувства тревоги и беспокойства, психомоторного возбуждения, головной боли и ощущения распирания в голове, нарушений тактильного, слухового и зрительного восприятия, а также нарушений ориентировки и сенсорной сферы. Выраженность указанных компонентов оценивалась в баллах, которые суммировались, при этом более высокие значения суммы баллов соответствовали более тяжёлому течению СОА.

При сопоставлении клинических вариантов СОА, диагностированных у участников, с тяжестью СОА, оценённой по сумме баллов по шкале CIWA-Ar до лечения, установлено, что у всех пациентов, независимо от клинического варианта, течение СОА было умеренно тяжёлым (16-20 баллов) и тяжёлым (свыше 20 баллов). При этом 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], $p = 0,05$). У пациентов с *висцеральным* вариантом тяжесть СОА была более высокой (23,00 [21,00; 24,00] vs 21,00 [18,00; 24,50], $p = 0,217$), в то время как наиболее тяжёлое течение заболевания 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 СОА (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 симптомы, определяющие его тяжесть и позволяющие, таким образом, установить другие клинические варианты СОА.

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

При анализе эффективности терапии было установлено наличие статистической значимости 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 пациентов с СОА

позволило выявить следующие НЛР типа А: психические нарушения: астения/вялость/повышенная утомляемость, сонливость/седация, увеличение продолжительности сна, нарушения концентрации внимания, нарушения памяти в форме ухудшения кратковременной памяти и антероградной амнезии; неврологические вегетативные нарушения: нарушения аккомодации, сухость во рту, тошнота, ортостатизм, запоры, учащённое 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 приёмом пациентом 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 или генетическими особенностями.

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. 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 проведён следующий этап диссертационного исследования.

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

В рамках данной части исследования, проведённой с участием 100 пациентов, изучалась зависимость показателей эффективности и безопасности терапии диазепамом от генетических полиморфизмов изоферментов, участвующих в биотрансформации препарата.

***CYP2C19*2*.** По результатам генотипирования *CYP2C19* по полиморфному маркеру $681G>A$ ($rs4244285$) у 100 испытуемых, получены следующие данные: пациентов с генотипом *GG* – 79 (79%), *GA* или *AA* – 21 (21%) (HWE: $\chi^2 = 2,18$, $p < 0,001$).

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 проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру *681G>A* (*rs4244285*) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат. По его результатам получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 114,93$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 10,60$, $p < 0,001$). На рисунке 1 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру *681G>A* (*rs4244285*) гена *CYP2C19*.

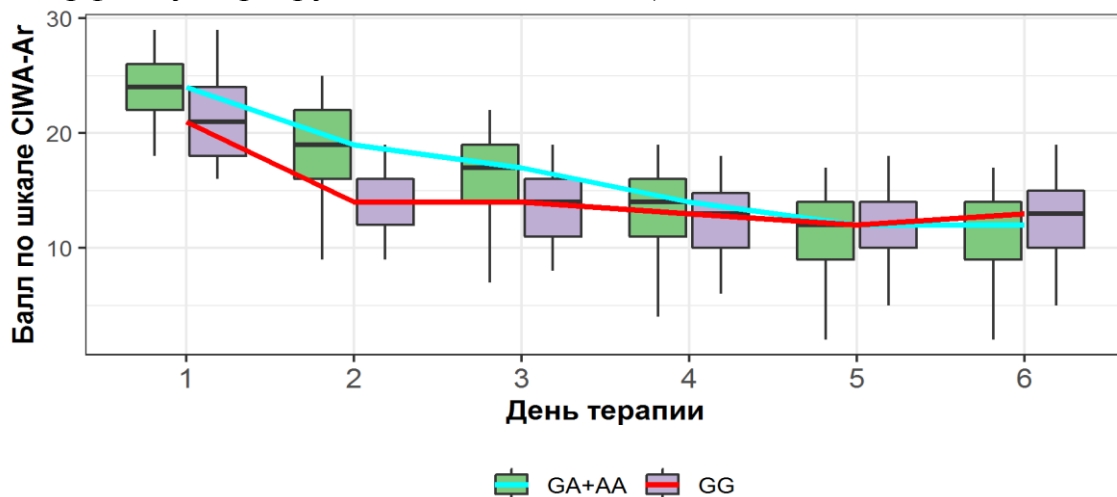


Рисунок 1 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования.

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру *681G>A* (*rs4244285*) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат. 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 ТЛМ. Установлено, что показатель концентрации диазепама в плазме 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], $p=0,040$). 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], $p=0,003$).

Таким образом, установлено, что у носителей генотипов *GA* и *AA* эффективность терапии выше, чем у нормальных гомозигот, но ниже показатели безопасности. Это может объясняться замедлением биотрансформации диазепама у носителей минорного аллеля *A*, что ведёт к замедлению элиминации препарата, повышению его плазменной

концентрации и более выраженному терапевтическому эффекту. По этой же причине у этих пациентов безопасность терапии, напротив, снижается.

CYP2C19*3. По результатам генотипирования *CYP2C19* по полиморфному маркеру 636 G>A (*rs4986893*) у 100 испытуемых, получены следующие данные: пациентов с генотипом GG – 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 *17.

CYP2C19*17. По результатам генотипирования *CYP2C19* по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) у 100 испытуемых, получены следующие данные: пациентов с генотипом CC – 65 (65%), CT или TT – 35 (35%) (HWE: $\chi^2 = 0,39$, $p < 0,001$).

По результатам статистического анализа отсутствовала разница в частотах генотипов по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) гена *CYP2C19* у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Для изучения эффективности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат. По его результатам получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 118,13$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 99,22$, $p < 0,001$). На рисунке 2 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) гена *CYP2C19*.

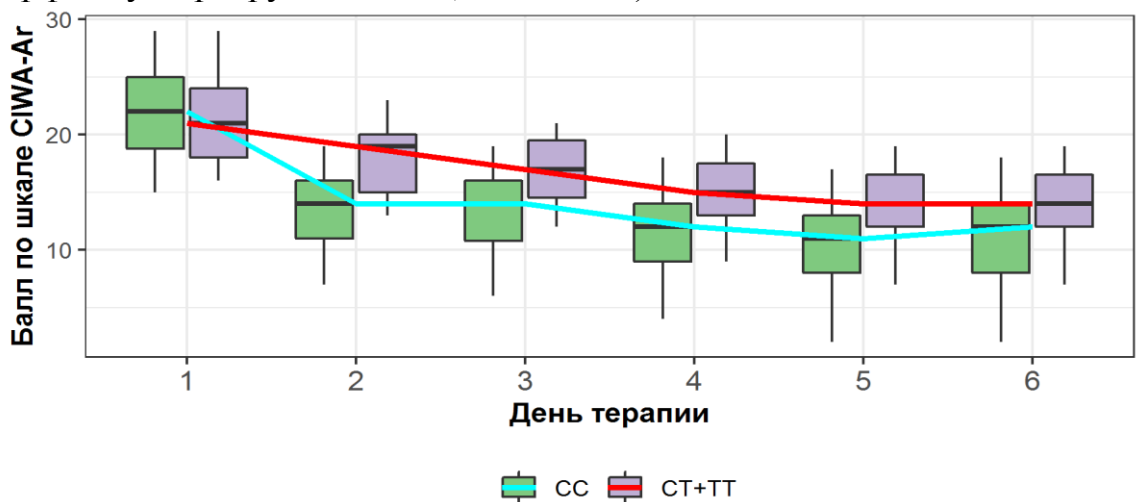


Рисунок 2 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования.

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) гена *CYP2C19* и день исследования в качестве ковариат. Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 442,84$, $p < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 124,46$, $p < 0,001$).

Результаты ТЛМ показали, что уровень концентрации диазепама в плазме 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], $p=0,002$). Установлено, что показатель концентрации диазепама в слюне у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру -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], $p=0,003$).

Таким образом, показано, что у носителей генотипов CT и TT эффективность терапии диазепамом ниже, чем у нормальных гомозигот, но выше показатели безопасности лечения. Это, вероятно, может быть связано с ускорением биотрансформации диазепама у носителей минорного аллеля T, что приводит к быстрой элиминации лекарства и снижению его плазменной концентрации. Вследствие этого до ГАМК-рецепторов доходит меньше лиганд и показатель эффективности терапии снижается, в то время как её безопасность, напротив, повышается.

Изучение влияния полиморфизмов *CYP3A4*22* и *CYP3A5*3* на эффективность и безопасность терапии диазепамом

***CYP3A4*22*.** По результатам генотипирования *CYP3A4* по полиморфному маркеру C>T *intron 6* (*rs35599367*) у 100 испытуемых, получены следующие данные: пациентов с генотипом CC – 92 (92%), CT или TT – 8 (8%) (HWE: $\chi^2 = 3,44$, $p < 0,001$).

Для изучения эффективности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркеру C>T *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4* и день исследования в качестве ковариат. Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 101,93$, $p\text{-value} < 0,001$) и показателе генотипа ($F = 47,39$, $p < 0,001$). На рисунке 3 представлено графическое отображение динамики изменения суммарного балла по шкале CIWA-Ar у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру C>T *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4*.

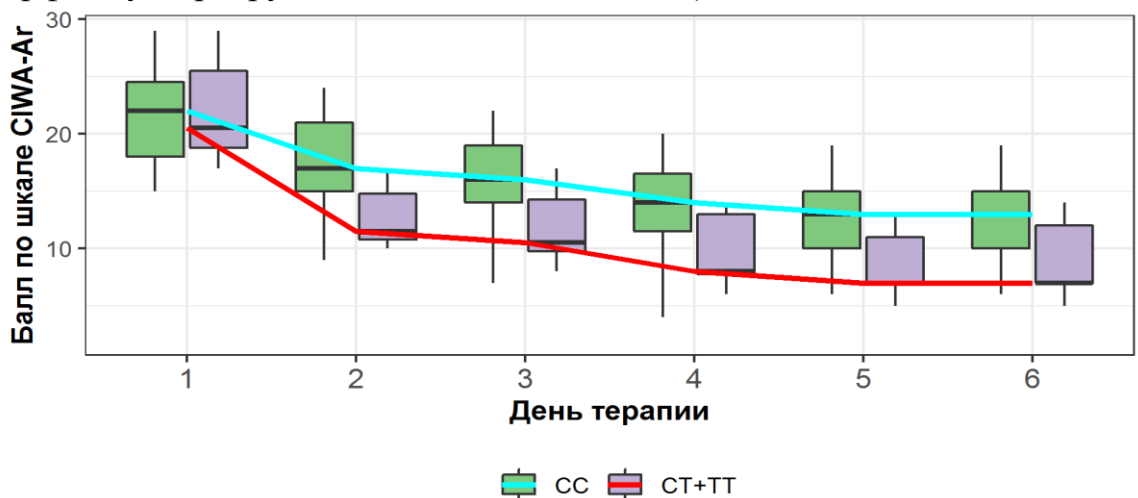


Рисунок 3 – Динамика симптоматики по шкале CIWA-Ar у пациентов

с разными генотипами с 1-го по 6-й дни исследования.

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4* и день исследования в качестве ковариат. Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 489,18$, p -value $<0,001$) и показателе генотипа ($F = 100,11$, $p <0,001$).

CYP3A5*3. По результатам генотипирования *CYP3A5* по полиморфному маркёру *6986A>G (rs776746)* у 100 испытуемых, получены следующие данные: пациентов с генотипом *GG* – 96 (96%), *AG* – 4 (4%), пациентов с генотипом *AA* обнаружено не было (HWE: $\chi^2 = 0,04$, $p < 0,001$).

Для изучения эффективности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру *6986A>G (rs776746)* гена *CYP3A5* и день исследования в качестве ковариат. Была получена статистическая значимость в показателе дня исследования ($F = 99,38$, p -value $<0,001$) и показателе генотипа ($F = 8,51$, $p <0,05$).

Для изучения безопасности проведённой терапии у пациентов с разными генотипами был проведён двухфакторный дисперсионный анализ, включающий генотип по полиморфному маркёру *6986A>G (rs776746)* гена *CYP3A5* и день исследования в качестве ковариат. 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 ($F = 2,27$, $p >0,05$).

По результатам статистического анализа отсутствовала разница в частотах генотипов по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4* и полиморфному маркёру *6986A>G (rs776746)* гена *CYP3A5* у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

Таким образом, установлено, что у носителей генотипов *CT* и *TT* по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена *CYP3A4*, а также носителей генотипа *AG* по полиморфному маркёру *6986A>G (rs776746)* гена *CYP3A5*, эффективность терапии диазепамом выше, но ниже показатели её безопасности. Это может объясняться замедлением биотрансформации диазепама у носителей минорных аллелей *A* и *T*, что ведёт к замедлению элиминации препарата, повышению его плазменной концентрации и, как следствие, более выраженному терапевтическому эффекту, но более низкой безопасности терапии.

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

Корреляционный анализ показал наличие статистически значимой отрицательной умеренной связи между концентрацией кортизола и количеством баллов по шкале *CIWA-Ar* на шестой день проведения исследования: $r = -0,322$ ($p = 0,067$). Корреляционный анализ между показателем активности *CYP3A4* и показателем эффективности терапии СОА не показал статистически значимых результатов: $r_s = 0,306$ ($p = 0,101$).

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: $r = 0,429$ ($p = 0,013$). Аналогичным образом произведён расчёт показателя коэффициента корреляции между разницей в количестве баллов по шкале UKU и метаболическим отношением, который составил $r_s = -0,425$ ($p = 0,019$).

Корреляционный анализ между показателем концентрации 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: $r = -0,984$ ($p = 0,016$).

Проведённый статистический анализ показал отсутствие разницы в значениях метаболического отношения, с помощью которого оценивалась активность изофермента CYP3A4, у пациентов с разными клиническими вариантами СОА.

По результатам данной части исследования, проведённой на группе из 32 пациентов с СОА, показано, что снижение активности CYP3A4, оценённое с помощью метаболического отношения, сопряжено с ухудшением профиля безопасности терапии диазепамом, оценённой по разнице в количестве баллов по шкале UKU до и после лечения. 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 и должно учитываться при назначении препарата данной когорте пациентов.

Оценка эффективности и безопасности терапии у пациентов с СОА посредством определения концентрации плазменной микро-РНК *miR-27b*

В данную часть исследования были включены 32 пациента. По результатам генотипирования CYP3A4 по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* у 32 испытуемых, получены следующие данные: пациентов с генотипом *CC* – 27 (84,4%), *CT* или *TT* – 5 (15,6%) (HWE: $\chi^2 = 2,24$, $p = 0,76$).

Результаты анализа концентрации микро-РНК *miR-27b* не выявили каких-либо статистически значимых различий у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена CYP3A4 (таблица 1).

Таблица 1 – Значения концентрации *miR-27b* у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркёру *C>T intron 6 (rs35599367)* гена CYP3A4

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

**p-value* по результатам теста Манна-Уитни

Проведённый корреляционный анализ между показателем эффективности терапии, оценённой по разнице баллов по шкале CIWA-Ar до и после терапии, и показателем активности CYP3A4, оценённой по уровню концентрации *miR-27b*, показал отсутствие статистически значимой корреляции ($r = -0,086$, $p = 0,639$). При оценке безопасности терапии, проведенный корреляционный анализ между разницей баллов по шкале UKU до и после терапии, и показателем активности CYP3A4, оценённой по уровню концентрации *miR-27b*, также не показал статистически значимых значений ($r_s = -0,021$, $p > 0,05$).

Корреляционный анализ между показателем концентрации диазепама в плазме крови и слюне и уровнем активности CYP3A4, оценённой по уровню концентрации *miR-27b*, показал отсутствие статистически значимой связи ($r = 0,570$, $p > 0,05$; $r = 0,397$, $p > 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённого исследования показано, что нейровегетативный вариант СОА является базовым и наиболее распространённым. Этот вариант сопряжён с наиболее лёгким течением СОА, в то время как наиболее тяжёлыми были случаи психопатологического варианта СОА, что обусловлено наличием в статусе этих больных выраженных психопатологических расстройств.

В исследовании показано отсутствие статистически значимых различий по показателям эффективности терапии (оценённой по динамике баллов по шкале CIWA-Ar) и её безопасности (оценённой по динамике баллов по шкале UKU) у пациентов с разными клиническими вариантами СОА

Анализ влияния полиморфизмов *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*17*, *CYP3A4*22* и *CYP3A5*3* на эффективность и безопасность терапии установил, что у носителей генотипов *GA* и *AA* по полиморфному маркёру *681G>A* (*rs4244285*) гена *CYP2C19*, носителей генотипов *CT* и *TT* по полиморфному маркёру *C>T intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4*, а также носителей генотипа *AG* по полиморфному маркёру *6986A>G* (*rs776746*) гена *CYP3A5* эффективность терапии диазепамом выше, чем у нормальных гомозигот, но при этом ниже показатели безопасности. Это может объясняться замедлением биотрансформации диазепама у носителей минорных аллелей *A* и *T*, что ведёт к замедлению элиминации препарата, повышению его плазменной концентрации и более выраженному терапевтическому эффекту. По этой же причине у этих пациентов безопасность терапии, напротив, снижается.

С целью снижения риска развития НЛР у пациентов-носителей минорных аллелей *A* и *T*, необходимо проводить оптимизацию терапии путём применения более низкой стартовой дозы диазепама, чем того требует клиническая картина. Это позволит компенсировать замедленную элиминацию препарата у данной когорты пациентов.

В то же время у носителей генотипов *CT* и *TT* по полиморфному маркёру *-806C>T* (*rs12248560*) гена *CYP2C19* эффективность терапии

диазепамом ниже, чем у нормальных гомозигот, но выше показатели безопасности лечения. Это, вероятно, может быть связано с ускорением биотрансформации диазепама у носителей минорного аллеля *T*, что приводит к быстрой элиминации лекарства и снижению его плазменной концентрации. Вследствие этого до ГАМК-рецепторов доходит меньше лиганд и показатель эффективности терапии снижается, в то время как её безопасность, напротив, повышается.

С целью снижения риска фармакорезистентности у пациентов-носителей минорного аллеля *T*, необходимо проводить оптимизацию терапии путём применения более высокой стартовой дозы диазепама, чем того требует клиническая картина, что позволит компенсировать ускоренную элиминацию препарата и удерживать уровень его равновесной концентрации в интервале терапевтического окна. Это может положительно сказаться на профиле эффективности терапии, что позволит повысить приверженность пациентов к терапии.

Анализ влияния активности изофермента *CYP3A4* на показатели эффективности и безопасности диазепама у пациентов с СОА установил, что активность *CYP3A4* влияет на безопасность ($r_s = -0,425$, $p = 0,019$), но не на эффективность ($r_s = 0,306$, $p=0,101$) терапии. Таким образом, пациенты с замедленной активностью *CYP3A4* имеют более высокий риск развития НЛР. Для снижения данного риска рекомендуется назначение таким пациентам лекарств, в метаболизме которых не принимает участия *CYP3A4*, либо использовать более низкие дозировки диазепама, регламентированные инструкциями по медицинскому применению препарата.

Кроме того, установлено отсутствие статистически значимой корреляционной связи между значениями показателя плазменной концентрации микро-РНК *miR-27b*, 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.

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 маркеру 681G>A (*rs4244285*) гена *CYP2C19*; CT и TT по полиморфному маркеру -806C>T (*rs12248560*) гена *CYP2C19*; CT и TT по полиморфному маркеру C>T *intron 6* (*rs35599367*) гена *CYP3A4*; а также AG по полиморфному маркеру 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 маркера 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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Skriabin V.** Pharmacogenetics of alcohol addiction: current perspectives / M.S. Zastrozhin, V.Y. Skryabin, S.S. Miroshkin, E.A. Bryun, D.A. Sychev // The Application of Clinical Genetics. – 2019 – Vol. – 12. – № 1. – Pp. 131-140; 10 / 2 с. ИФ – 5,111. (Scopus, Web of Science)
2. **Скрябин В.Ю.** Влияние активности CYP3A на эффективность и безопасность диазепама у пациентов с синдромом отмены алкоголя / **Скрябин В.Ю.**, Застрожин М.С., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Шипицын В.В., Копоров С.Г., Барна И.В., Галактионова Т.Е., Иванов А.В., Санникова Н.В., Шарова Е.В., Сорокин А.С., Брюн Е.А., Сычев Д.А // Наркология. – 2019 – Т. – 18. – № 9. – С. 16-24; 9 / 0,64 с. ИФ – 0,55.
3. **Skriabin V.** How do *CYP3A4* genetic polymorphisms affect the efficacy and safety of diazepam in patients with alcohol withdrawal syndrome? / V.

Skriabin, M. Zastrozhin, E. Bryun, D. Sychev // European Neuropsychopharmacology. – 2019 – Vol. – 29. – № 6. – Pp. 116; 1 / 0,25 с. ИФ – 4,468. (Scopus, Web of Science)

4. **Скрябин В.Ю.** Взаимосвязь полиморфизма *CYP2C19*17* с показателями эффективности и безопасности диазепама у пациентов с синдромом отмены алкоголя / **В.Ю. Скрябин**, М.С. Застрожин, Е.А. Гришина, К.А. Рыжикова, В.В. Шипицын, И.В. Барна, Т.Е. Галактионова, А.С. Сорокин, Е.А. Брюн, Д.А. Сычёв // Бюллетень сибирской медицины. – 2019 – Т. – 18. – № 1. – С. 119-126; 8 / 0,8 с. ИФ – 0,503. (Scopus)

5. **Skriabin VY.** How do *CYP2C19*2* and *CYP2C19*17* genetic polymorphisms affect the efficacy and safety of diazepam in patients with alcohol withdrawal syndrome? / **Skryabin VY**, Zastrozhin MS, Torrado MV, Grishina EA, Ryzhikova KA, Shipitsyn VV, Galaktionova TE, Sorokin AS, Bryun EA, Sychev DA // Drug Metabolism and Personalized Therapy. – 2020 – Vol. – 29. – № 6. – Pp. 1-8; 8 / 0,8 с. ИФ – 4,468. (Scopus)

6. **Скрябин В.Ю.** Бензодиазепиновые транквилизаторы как «золотой стандарт» лечения пациентов с синдромом отмены алкоголя (обзор литературы) / **Скрябин В.Ю.**, Застрожин М.С., Брюн Е.А., Сычев Д.А // Современная терапия психических расстройств. – 2020 – № 1. – С. 21-28; 8 / 2 с. ИФ – 0,725.

7. **Скрябин В.Ю.** Влияние полиморфизма *CYP2C19*2* на эффективность и безопасность диазепама у пациентов с синдромом отмены алкоголя / **Скрябин В.Ю.**, Застрожин М.С., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Шипицын В.В., Вдовин А.С., Сапаров А.Т., Галактионова Т.Е., Юсупов А.А., Бойко Ю.В., Дюжев Д.В., Сорокин А.С., Брюн Е.А., Сычев Д.А // Наркология. – 2020 – Т. – 19. – № 1. – С. 37-45; 9 / 0,64 с. ИФ – 0,55.

8. **Скрябин В.Ю.** Особенности фармакокинетики, фармакодинамики и фармакогенетики бензодиазепиновых транквилизаторов (обзор литературы) / **Скрябин В.Ю.**, Застрожин М.С., Брюн Е.А., Сычев Д.А // Наркология. – 2020 – Т. – 19. – № 2. – С. 58-66; 9 / 2,25 с. ИФ – 0,55.

9. **Скрябин В.Ю.** Оценка влияния полиморфизма *CYP2C19*17* на уровень равновесной концентрации диазепама у пациентов с синдромом отмены алкоголя / **Скрябин В.Ю.**, Застрожин М.С., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Шипицын В.В., Галактионова Т.Е., Иванов А.В., Сорокин А.С., Брюн Е.А., Сычев Д.А. Наркология. – 2020 – Т. – 19. – № 4. – С. 35-42; 8 / 0,8 с. ИФ – 0,55.