

На правах рукописи

**ГРИБАКИНА ОКСАНА ГЕННАДЬЕВНА**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АФОБАЗОЛА С МАРКЕРНЫМ  
СУБСТРАТОМ ИЗОФОРМЫ ЦИТОХРОМА P450 CYP2C9**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательском институте фармакологии имени В.В. Закусова» (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»)

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

Колыванов Геннадий Борисович

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор кафедры клинической  
фармакологии и пропедевтики внутренних  
болезней ГБОУ ВПО «Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Соколов Андрей Владимирович

кандидат биологических наук,  
руководитель лаборатории  
фармакокинетики  
отдела профилактической  
фармакотерапии  
ФГБУ «Государственный  
научно-исследовательский  
центр профилактической медицины»  
Минздрава России

Белолипецкая Вера Геннадьевна

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_ ч на заседании диссертационного совета Д. 001.024.01 на базе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 и на сайте [www.academpharm.ru](http://www.academpharm.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук,  
профессор

Вальдман Елена Артуровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Комбинированное применение лекарственных средств (ЛС) является основой современной клинической практики. В то же время одновременный прием препаратов может приводить к проявлению серьезных побочных эффектов и даже летальности, поэтому выявление межлекарственных взаимодействий еще на доклиническом этапе экспериментальных исследований является важнейшим элементом обеспечения безопасной терапии. Основная задача исследований взаимодействия ЛС (на уровне изменений их биотрансформации) состоит в выявлении индуцирующего или ингибирующего эффектов изучаемого препарата на тот или иной изофермент цитохрома P450 (Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кукес, С.В. Грачев, Д.А.Сычев, Г.В. Раменская. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 293 с.; Drug–drug interactions in pharmaceutical development /A.P. Li.: WILEY, 2008. 244 p.; Drug-Drug Interactions - 2nd ed. Rodrigues A. David. Informa healthcare, 2008. 745 p.; The Biochemistry of drug metabolism: Conjugations, Consequences of Metabolism, Influencing Factors / B. Testa, S.D. Kramer. Weinheim: WILEY-VCH, 2010. Vol.2.588 p.).

Одно из важных мест в процессе биотрансформации лекарственных средств (ЛС) занимает изоформа цитохрома P450 CYP2C9, которая является главным ферментом метаболизма многих нестероидных противовоспалительных, пероральных гипогликемических средств, противогрибковых препаратов, непрямых антикоагулянтов (варфарин, аценокумарол), антагонистов рецепторов ангиотензина II (лозартан), а также препаратов других фармакологических групп (Lee C., Pieper J., Frye R. et al. Tolbutamide, flurbiprofen, and losartan as probes of CYP2C9 activity in humans // J Clin Pharmacol. 2003. Vol. 43, №1. P.84-91.; Zhou S.F., Zhou Z.W., Yang L.P. et al. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development // Curr Med Chem. 2009. Vol. 16, №27. P.3480-3675.).

В ходе разработки новых ЛС необходимо оценивать их влияние на изменения активности изоформ цитохрома P450 уже на доклиническом этапе *in vitro* и *in vivo*. В то же время интерпретация полученных *in vitro* параметров остается проблематичной вследствие ограничений экстраполяции на целостный организм (Tucker GT., Houston JB., Huang SM. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus // Clin Pharmacol Ther. 2001. Vol. 70 P.103–114), что определяет высокую вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов. В этой связи предпочтительней выглядит разработка трансляционной модели изучения межлекарственного взаимодействия, позволяющая оценить ингибирующее или индуцирующее действие создаваемых ЛС на различные изоферменты цитохрома P450 *in vivo* на животных с высокой степенью гомологичности и субстратной специфичностью аналогичной изоферментам человека (Kobayashi K., Urashima K., Shimada N., Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat // Biochem Pharmacol. 2002. Vol.63, №5. P. 889-896.; Lee D., Shin H., Bae S. et al. Effect of enzyme inducers and inhibitors on

the pharmacokinetics of intravenous omeprazole in rats // *Biopharm. Drug Dispos.* 2006. Vol. 27, № 5. P. 209-218.).

В современной фармакотерапии для лечения различных заболеваний комбинированное назначение лекарственных препаратов стало основным подходом, поэтому описание межлекарственных взаимодействий является стандартной процедурой уже на этапе разработки ЛС как за рубежом, так и в Российской Федерации (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: Методические рекомендации. М.: 2009.32 с.; *Med facts. Pocket guide of drug interactions Second Ed./ G.R.Bailie, C.A. Johnson, N.A. Mason, W.I. St Peter. Med facts.* - Bone: Care International, 2004. 69 p.; Nagai N. Drug interaction studies on new drug applications: current situations and regulatory views in Japan // *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010. Vol. 25, №1. P. 3-15.).

**Степень разработанности проблемы.** В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» создан селективный анксиолитик афобазол – 2-(2-морфолиноэтилтио)-5-этоксибензилимидазола дигидрохлорид (Середенин, С.Б. Фармакогенетическая концепция анксиолитического эффекта/С.Б. Середенин, Т.А. Воронина, Г.Г. Незнамов// *Вестник РАМН.* 1998. №11. С.3-9.; Seredenin, S.B. Genetic differences in response to emotional stress and tranquilizers/ S.B. Seredenin// *Psychopharmacol. Biol. Narcol.* 2003. Vol.3, № 1-2. P. 494-509.).

В настоящее время этот препарат находит все более широкое применение при лечении генерализованных тревожных расстройств в составе поликомпонентной фармакотерапии. Существует вероятность, что наряду с афобазолом могут применяться метаболизируемые изоферментом CYP2C9 препараты. При этом возможны нежелательные межлекарственные взаимодействия и, как результат – выраженные побочные эффекты. Необходимо отметить, что изучение влияния афобазола на изменение активности изоформы CYP2C9 ранее не проводилось.

В связи с этим чрезвычайно важной и актуальной задачей является изучение лекарственных взаимодействий афобазола при комбинированном приеме с препаратами, являющимися типичными субстратами изофермента цитохрома P450 CYP2C9.

**Цель исследования.** Изучение фармакокинетического взаимодействия афобазола при комбинированном введении с препаратом-маркером лозартаном, являющимся типичным субстратом изоформы цитохрома P450 CYP2C9.

**Задачи исследования.** Для достижения цели настоящего исследования были поставлены следующие задачи:

1. Модифицировать и метрологически охарактеризовать аналитическую методику количественного определения лозартана и его метаболита E-3174 в плазме крови и моче крыс с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

2. Оценить метаболические отношения (МО) E-3174/лозартан при одинаковой длительности введения афобазола (субхроническое, 4х - дневное введение) в эффективной,

анксиолитической дозе (5 мг/кг) и в дозах, превышающую эффективную (5-125 мг/кг) по данным экскреции с мочой у крыс.

3. Изучить влияние продолжительности введения афобазола (в течение 3х и 4х суток) в дозе 25 мг/кг на изменение активности изоформы CYP2C9 по данным экскреции с мочой.

4. На крысах оценить фармакокинетическое взаимодействие афобазола при одинаковой длительности введения (4х - дневное) в эффективной, анксиолитической дозе (5 мг/кг) и дозе, превышающую эффективную (25 мг/кг), с препаратом-субстратом изофермента CYP2C9.

5. Провести сравнительный анализ полученных результатов по плазме крови и суточной моче крыс.

6. Продемонстрировать адекватность и селективность разработанной методологии на примере определения изменения активности изоформы CYP2C9 после введения стандартных ингибитора и индуктора данного изофермента в эффективных дозах у крыс.

7. Сделать заключение о возможном комбинированном применении афобазола с препаратами различных фармакологических групп, метаболизируемых изоферментом CYP2C9.

**Научная новизна исследования.** Впервые изучена фармакокинетика субстратного маркера CYP2C9 – лозартана и его метаболита E-3174 при комбинированном введении с афобазолом. Анализ величин МО E-3174/лозартан, полученных по данным экскреции с мочой крыс показал, что афобазол в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг после 4-х дневного введения (3 раза в сутки) не вызывал изменения активности изоформы CYP2C9. В то время как увеличение дозы афобазола до 25 и 75 мг/кг после субхронического введения препарата позволило выявить умеренный индуцирующий эффект. Дальнейшее увеличение дозы анксиолитика до 100 и 125 мг/кг вело к снижению степени выраженности индукции, что может быть объяснено насыщением активных центров изофермента молекулами афобазола.

Апробирована методология изучения влияния ЛС на изоформу CYP2C9 цитохрома P450 *in vivo* с использованием стандартных модификаторов и субстрата-маркера.

**Методология и методы исследования.** Для оценки влияния афобазола на изменение активности изофермента CYP2C9 (по данным экскреции с мочой) использовали маркерный препарат лозартан, который сначала вводили перорально крысам каждой группы в дозе 30 мг/кг без афобазола, индуктора или ингибитора (контроль), затем по истечении 3-х суток этим же животным вводили афобазол в разных дозах, (индуктор или ингибитор) в течение 4-х суток (субхроническое введение).

При изучении влияния афобазола на активность CYP2C9 по изменению величин фармакокинетических параметров маркерного препарата крысам вводили перорально лозартан в дозе 30 мг/кг без афобазола (контроль; I группа) и лозартан на фоне субхронического

введения афобазола в течение 4-х последовательных дней, трехкратно через каждые 3 часа в дозе 5 мг/кг (II группа) и в дозе 25 мг/кг (III группа).

В настоящей работе использовались следующие методы: аналитический - ВЭЖХ со спектрофлуорометрическим детектированием, фармакокинетический – модельно-независимый и методы математической статистики.

**Практическая значимость исследования.** Установлено, что афобазол в эффективной, анксиолитической дозе (5 мг/кг) у крыс, соответствующей терапевтической у человека (10 мг), не вызывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффектов на изофермент CYP2C9. Таким образом, терапевтическая доза афобазола у человека также не будет вызывать изменений активности данной изоформы.

Сделано заключение о возможном сочетанном применении афобазола в терапевтической дозе с препаратами различных фармакологических групп, метаболизируемых CYP2C9. Полученные данные могут составить основу рекомендаций по комбинированному применению афобазола с рядом ЛС. Это позволит оптимизировать фармакотерапию, избежав возникновения нежелательных побочных эффектов при комбинированном применении афобазола.

Апробированную методологию оценки изменения активности CYP2C9 с применением стандартных индуктора и ингибитора можно использовать при разработке новых ЛС.

**Личный вклад автора.** Автором самостоятельно воспроизведена и модифицирована методика количественного определения лозартана и его метаболита E-3174 в биоматериале, проведены исследования по изучению влияния афобазола на фармакокинетику лозартана и E-3174, обработаны результаты, сформулированы выводы. При непосредственном участии автора подготовлены публикации по результатам работы.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Афобазол в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг после субхронического введения не вызывает изменения активности изофермента CYP2C9 у крыс.
2. Увеличение дозы афобазола до 25 и 75 мг/кг вызвало умеренный индуцирующий эффект. Дальнейшее увеличение дозы препарата до 100 и 125 мг/кг привело к снижению степени выраженности индукции.
3. При увеличении продолжительности введения афобазола в дозе 25 мг/кг с 3х до 4х суток не происходит усиления индуцирующего эффекта.
4. Субхроническое введение афобазола в дозе 25 мг/кг в течение 4х суток достоверно изменяет величины фармакокинетических параметров лозартана и метаболита E-3174 по сравнению с контрольной группой, вызывая умеренный индуцирующий эффект изоформы CYP2C9.
5. Сравнительный анализ полученных результатов по плазме крови и суточной моче крыс показал, что в обоих случаях с увеличением дозы афобазола происходит усиление индуцирующего эффекта

6. Апробирована методология изучения влияния ЛС афобазола на изоформу цитохрома P450 CYP2C9 в эксперименте с использованием стандартных индуктора и ингибитора CYP2C9.

7. Афобазол в терапевтической дозе 5 мг (3 раза в день) не вызывает изменения активности изоформы CYP2C9, поэтому его можно применять в сочетании с препаратами, метаболизируемыми данным изоферментом.

**Степень достоверности.** Работа выполнена на большом экспериментальном материале с использованием адекватных методов исследования; статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием современных методов математической статистики и анализа полученных данных.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на XIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012 г.); IV съезде фармакологов России «Инновация в современной фармакологии» (Казань, 2012 г.); Евразийском конгрессе «Медицина, фармация и общественное здоровье» (Екатеринбург, 2013 г.); IX Международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: Вопросы медицины» (Москва, 2013 г.); Первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблема разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013 г.); тезисы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана. «Инновации в фармакологии: от теории к практике» (Санкт-Петербург, 2014 г.); конференции лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва, 2015 г.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья и 5 тезисов в материалах российских и международных конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 135 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа содержит 24 таблицы и 12 рисунков. Список литературы включает 152 источника, из них 22 отечественных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и методы исследования

В работе использовались:

Субстанция афобазола дигидрохлорида, «Erregiere SpA.» (Италия), субстанция лозартана калиевая соль, Usp rockville (США), субстанция лозартанкарбоновой кислоты (E-3174), Toronto research chemical inc (США).

Субстанция рифампицина «Женгжоу Минжонг Фармасьютикал Ко., Лтд., КНР»,

Капсулы флуконазола –150 мг, ООО «Здоровье» Украина.

### **Экспериментальные животные**

Влияние афобазола на активность изоформы CYP2C9 после введения внутрь проводили на ненаркотизированных белых беспородных крысах-самцах с массой тела  $200 \pm 20$  г, полученных из питомника «Столбовая».

Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при 12-ти часовом световом режиме. Исследования выполняли согласно «Правилам лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития РФ №708н от 23 августа 2010 г.).

### **Введение лекарственных веществ, способы отбора мочи и крови**

Лекарственные вещества (ЛВ) вводили крысам перорально натошак с помощью металлического зонда. С целью сбора суточной мочи после введения ЛВ животных помещали в индивидуальные клетки на 24 часа со свободным доступом к воде. Суточную мочу собирали в стеклянные предварительно пронумерованные пробирки. Далее измеряли и записывали в лабораторный журнал для последующих расчетов объем собранной мочи. Образцы хранили в холодильнике при  $-18^{\circ}\text{C}$  без добавления консервантов.

Образцы крови получали путем декапитации крыс и отбирали в течение 24-х часов в дискретные интервалы времени: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 8,0; 12,0 и 24,0 ч. На каждый интервал времени использовали по 8 животных. Кровь собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки, обработанные гепарином. С целью получения плазмы образцы крови центрифугировали (4000 об/мин в течение 15 минут). Объем полученной плазмы измеряли и записывали в лабораторный журнал для дальнейших расчетов. Плазма хранилась в замороженном виде при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  без добавления консервантов.

Последнее введение афобазола (индуктора или ингибитора) производили вместе с лозартаном. Раствор лозартана и афобазола вводили поочередно (через 30 минут), так как совместное введение было невозможно из-за происходящей химической реакции и выпадения осадка.

### **Условия количественного определения лозартана и его метаболита E-374 в плазме крови и моче животных с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Количественный анализ лозартана и его метаболита в моче и плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе фирмы “Beckman Coulter” (США). Помпа – “Beckman System Gold 127 Solvent Module” и спектрофлуорометрический детектор RF-10AXL Shimadzu (Япония).

Условия хроматографирования:



Аналитическая колонка – Luna CN 5 мкм , 250×4,6 мм, детектирование проводили при значениях экстинкции 250 нм (длина волны возбуждения) и эмиссии (длина волны поглощения) и 375 нм. Подвижная фаза – фосфатный буфер (pH 1,9): ацетонитрил (315:195); скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Хроматографический анализ проводили при комнатной температуре (18–20°C). Объем пробы составил 100 мкл. В этих условиях время удерживания лозартана в среднем составило 7,7±0,3 мин, а E-3174 5,8±0,2 мин. Коэкстрактивные вещества не мешали определению. Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» (Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. М.: Литтерра, 2008. 132с.). Количественное определение анализируемых веществ проводили методом абсолютной калибровки. Линейность методик оценивалась по 7 калибровочным стандартам (2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 нг/мл). Стандарты готовили последовательным разбавлением смесью метанол-вода 1:1 матричного раствора лозартана (100 мкг/мл в метанол - вода 1:1) и E-3174 (100 мкг/мл в чистом метаноле). В изучаемом диапазоне 2,5 – 200,0 нг/мл концентраций отмечена линейная зависимость между концентрациями анализируемых соединений и соответствующих площадей пиков, усредненное значение которых описывалось следующим уравнением (n=7): для лозартана  $S = 65,53 + 89,14 \times C$  ( $r=0,9999$ ); для E-3174  $S = 405,29 + 53,0 \times C$  ( $r=0,9998$ ), где S – площадь хроматографического пика вещества (в единицах интегрирования хроматографа) и C – концентрация в нг/мл.

Предел количественного обнаружения лозартана (LOQ) составил 2,5 нг/мл, а предел детектирования (LOD) (при соотношении сигнал/шум = 3:1) составил 1,0 нг/мл. Для E-3174 LOQ – 5,0 нг/мл и LOD (при соотношении сигнал/шум = 3:1) – 2,5 нг/мл. Относительная ошибка определения лозартана для концентрации 2,5 нг/мл составила не более 9,1%, и E-3174 (для концентрации 5 нг/мл) – не более 6,1%.

### **Обработка биологических проб, экстракция лозартана и его метаболита E-3174 из биологических образцов**

#### **Подготовка мочи и плазмы крови крыс к хроматографическому анализу**

В экстракционную пробирку к 1,0 мл опытного образца мочи (плазмы крови) прибавляли 1,0 мл глицинового буфера, добавляли 20,0 мл диэтилового эфира и встряхивали на механическом, горизонтальном шейкере в течение 15 минут. Затем пробирку с эфирным слоем переносили в морозильник с температурой -18°C до замораживания водной фазы (30 мин). Далее органический слой переносили в выпарительную колбу. Процедуру экстракции повторяли дважды. Объединенный эфирный экстракт выпаривали досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в смеси метиловый спирт-вода (1:1) и аликвоту (100 мкл) вводили в инжектор хроматографа.

Результаты исследования показали, что процент экстракции лозартана из мочи составил 83,4±4,64, а его метаболита 86,4± 5,10 ( $\bar{x} \pm SD$ ). Процент экстракции лозартана из плазмы крови составил 88,3±5,20, а его метаболита 91,2± 4,51 ( $\bar{x} \pm SD$ ).

## **Фармакокинетические параметры, используемые для интерпретации экспериментальных данных**

Основные фармакокинетические параметры рассчитаны модельно-независимым методом (Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-ind системы параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов //Хим.-фарм.журн. 1991. № 10. С.16-19.).

$AUC_{0-\infty}$  (нг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой концентрация ЛВ – время).  $AUC_{0-\infty}$  рассчитывается от момента введения до бесконечности;

$AUC_{0-t}$  (нг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой концентрация ЛВ – время).  $AUC_{0-t}$  рассчитывается от момента введения до некоторого времени;

$T_{max}$  (ч) – время достижения максимальной концентрации препарата в плазме крови после перорального введения;

$C_{max}$  (нг/мл) – максимальная концентрация лекарственного вещества (ЛВ) в плазме крови после перорального введения;

$C_{max}/AUC_{0-t}$  (ч<sup>-1</sup>) – параметр, характеризующий скорость всасывания препарата в системный кровоток;

$MRT$  (ч) – среднее время пребывания ЛВ в организме;

$K_{el}$  (ч<sup>-1</sup>) – константа элиминации, параметр, характеризующий скорость выведения ЛВ из организма;

$t_{1/2el}$  (ч) – период, за который выводится половина введенной и всосавшейся дозы ЛВ;

$Cl/F$  (л/ч/кг) – кажущийся клиренс; параметр, характеризующий скорость «очищения» организма от ЛВ

$V_d/F$  (л/кг) – кажущийся объем распределения ЛВ; параметр, характеризующий степень захвата ЛВ тканями из плазмы крови.

$MO$  – метаболическое отношение

### **Оценка индуцирующего или ингибирующего эффекта**

Индуцирующий или ингибирующий эффект оценивали по абсолютным величинам метаболических отношений. Метаболическое отношение (по моче) – это отношение концентрации метаболита к концентрации неизмененного вещества в суточной моче. Метаболическое отношение (по плазме крови) – это отношение  $AUC_{0-t}$  метаболита к  $AUC_{0-t}$  неизмененного вещества.

### **Статистическая обработка полученных результатов**

Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны с помощью программы “Excel v.11.0”. В таблицах представлены следующие статистические характеристики:  $\bar{x}$  – среднее арифметическое результатов измерений,  $SD$  – стандартное отклонение,  $S\bar{x}$  – стандартное отклонение от среднего арифметического,  $\Delta\bar{x}$  – абсолютная погрешность измерений,  $\varepsilon\%$  – относительная погрешность измерений.

Достоверность различий для сравниваемых концентраций исследуемых соединений оценивали с помощью парного критерия Стьюдента (Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. М.:ГЭОТАР-МЕД, 2001. 256 с.).

Поскольку на каждую временную точку использовали по 8 животных, результирующие фармакокинетические кривые построены по усредненным концентрациям, поэтому при расчетах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов. Достоверность различий между величинами фармакокинетических параметров лозартана и его метаболита после различных режимов введения афобазола оценивали по концентрациям соответствующих веществ в дискретные временные точки фармакокинетической кривой по одностороннему ANOVA-тесту (программа Origin v.7.0).

Рисунки были выполнены с использованием графического редактора "Origin v.7.0".

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Изучение влияния афобазола на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 по данным экскреции с мочой**

**Цель исследования** – оценить степень индукции, вызванную различными режимами дозирования афобазола (доза и длительность введения) у крыс.

В настоящем исследовании представлены данные по влиянию афобазола на изофермент цитохрома P450 CYP2C9 с использованием субстратного маркера – лозартана. Индуцирующий или ингибирующий эффект афобазола оценивали по абсолютным величинам метаболических отношений препарата-маркера. В настоящей работе под «метаболическим отношением» понимали отношение концентрации метаболита лозартана E-3174 к концентрации исходного соединения в суточной моче.

Для оценки влияния величины вводимой дозы на изучаемые процессы использовали эффективную, анксиолитическую дозу афобазола – 5 мг/кг в сравнении с многократным увеличением дозы (5-125 раз).

Оценивали влияние афобазола в анксиолитической дозе 5 мг/кг в сравнении с многократным увеличением дозы до 125 мг/кг при одинаковом по длительности введении препарата в течение 4-х дней, трехкратно через каждые 3 часа.

Второй фактор, оцениваемый в настоящем исследовании, – влияние длительности введения крысам афобазола в дозе 25 мг/кг на возможный индуцирующий или ингибирующий эффекты.

Лозартан вводили в дозе 30 мг/кг. Выбор доз основывался на результатах ранее проведенных исследований анксиолитической активности и экспериментальных данных фармакокинетики афобазола у крыс (Seredenin, S.B. Genetic differences in response to emotional stress and tranquilizers // Psychopharmacol. Biol. Narcol. 2003. Vol.3, № 1-2. P. 494-509.; Середенин С.Б., Виглинская А.О., Колыванов Г.Б. и др. Фармакокинетика афобазола у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. Т. 70, №2. С.59-64.), а также характеристики токсичности афобазола (LD<sub>50</sub> для крыс – 1,1 г/кг) (Соловьева И.К. Анксиолитики: вчера, сегодня, завтра //Российский медицинский журнал. 2006. Т.14, №5. С.

385–388.).

Исследования проводили на 5 группах крыс. Исследование в каждой группе животных начиналось с введения лозартана без афобазола (контроль – I) . Введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола в дозе 5 мг/кг – группа II, 25 мг/кг - группа III, 75 мг/кг – группа IV, 100 мг/кг – группа V и 125 мг/кг – группа VI.

Крысам каждой группы вводили сначала лозартан (контроль), затем по истечении 4-х суток этим же животным вводили афобазол в течение 4-х дней, трехкратно через каждые 3 часа (субхроническое введение). Лозартан животным II- VI групп вводили через 30 мин после последнего введения афобазола.

В результате проведенного исследования установлено, что афобазол в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг не оказывал индуцирующего/ингибирующего эффекта на изофермент CYP2C9 (рис. 1). Так, после введения лозартана без афобазола МО составило  $4,11 \pm 1,65$ , а после введения лозартана на фоне субхронического введения афобазола –  $4,74 \pm 0,99$ .

При сравнении величин метаболических отношений лозартана после введения афобазола крысам в дозах, многократно превышающих эффективную (25, 75, 100 и 125 мг/кг), выявлен умеренный индуцирующий эффект (рис.1).

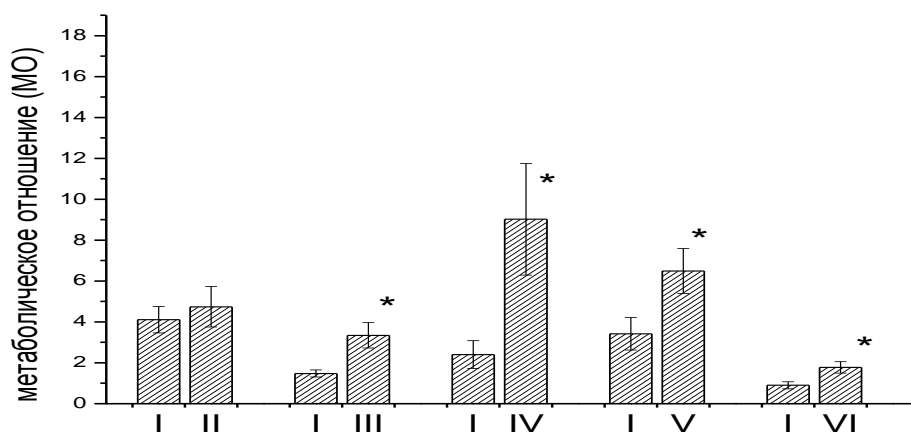


Рис.1. Метаболические отношения (E-3174 /лозартан) после многократного введения афобазола крысам в дозах 5 - 125 мг/кг ( $n=8$ ;  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

Обозначения на рисунках: I – введение лозартана без афобазола (контроль, группы I); II - введение лозартана на фоне 4х - дневного введения афобазола в дозе 5 мг/кг (группа II); III – введение лозартана на фоне 4х - дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг (группа III); IV - введение лозартана на фоне 4х - дневного введения афобазола в дозе 75 мг/кг (группа IV); V - введение лозартана на фоне 4х - дневного введения афобазола в дозе 100 мг/кг (группа V); VI - введение лозартана на фоне 4х - дневного введения афобазола в дозе 125 мг/кг (группа VI);

\* -  $p < 0,05$  по отношению к группе контроля (по t-критерию Стьюдента)

Анализ полученных результатов показал, что величина МО E-3174 /лозартан на фоне 4х - дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг превышает аналогичную величину в контроле в 2,3 раза, в дозе 75 мг/кг в 3,8 раза, в дозе 100 мг/кг в 1,9 раза и в дозе 125 мг/кг в 2,0 раза.

Таким образом, на фоне 4-х дневного введения афобазола в дозе 75 мг/кг наблюдалось максимальное МО. Увеличение дозы анксиолитика до 100 и 125 мг/кг вело к снижению индукции. Снижение индуцирующего эффекта может быть объяснено насыщением активных центров изофермента молекулами афобазола.

На следующем этапе была произведена оценка степени индукции изофермента CYP2C9 в зависимости от длительности введения афобазола в дозе 25 мг/кг по данным экскреции с суточной мочой.

Анализировали МО (E-3174/ лозартан) после введения лозартана без афобазола (контроль) в сравнении с введением лозартана на фоне 3-х и 4-х дневного введения афобазола 3 раза в день через каждые 3 часа в дозе 25 мг/кг.

Исследования проводили на двух группах крыс. Исследование в каждой группе животных начиналось с введения лозартана без афобазола (контроль – I) . Первая группа - крысы, которым вводили однократно лозартан на фоне 3-х дневного введения афобазола. Вторая группа - крысы, которым вводили однократно лозартан на фоне 4-х дневного введения афобазола.

При сравнении величин МО (E-3174/лозартан) выявлены статистически значимые различия после введения лозартана без афобазола (контрольные группы) в сравнении с введением лозартана на фоне 3-х и 4-х дневного введения афобазола.

На рис. 2 показаны абсолютные величины МО, полученные в контрольных группах в сравнении с аналогичными параметрами, полученными после введения лозартана на фоне 3х и 4х - дневного введения афобазола.

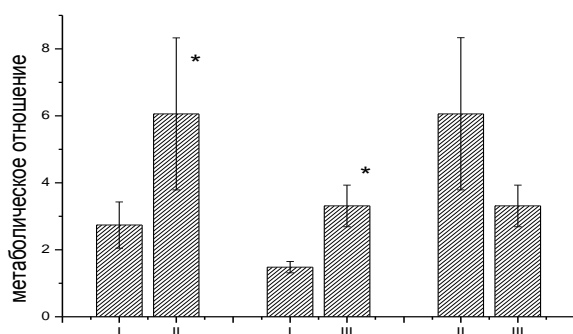


Рис. 2 Метаболические отношения (МО) (E-3174/лозартан) после субхронического введения афобазола крысам в дозе 25 мг/кг (n=8;  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

Обозначения на рисунках:

I – введение лозартана в дозе 30 мг/кг без афобазола (контрольные группы);

II – введение лозартана в дозе 30 мг/кг на фоне 3х дневного введения афобазола (группа I);

III -введение лозартана в дозе 30 мг/кг на фоне 4х - дневного введения афобазола (группа II).

\* -  $p < 0,05$  по отношению к группе контроля (по t-критерию Стьюдента)

При сравнении величин МО выявлены статистически значимые различия в контрольных группах в сравнении с введением лозартана на фоне 3-х и 4х - дневного введения афобазола (рис. 2).

МО в контроле составило  $2,73 \pm 0,69$ , а после субхронического 3-х дневного введения афобазола –  $6,06 \pm 1,28$ . МО в контроле составило  $1,48 \pm 0,17$ , а после субхронического 4-х дневного введения афобазола –  $3,34 \pm 0,62$ .

Как видно из рис.2, афобазол оказывает умеренный индуцирующий эффект на изофермент CYP2C9. МО на фоне 3-х дневного введения афобазола превышает аналогичный параметр в контрольной группе в 2,2 раза. После 4-х дневного введения анксиолитика данный параметр в сравнении с контрольной группой увеличился в 2,3 раза.

При сравнении МО после 3-х и 4-х дневного введения афобазола статистически значимые различия не были выявлены. МО после субхронического 3-х дневного введения афобазола составило  $6,06 \pm 1,28$ . МО после субхронического 4-х дневного введения анксиолитика –  $3,34 \pm 0,62$ .

Таким образом, продолжительность введения афобазола в течение 3-х или 4-х дней в дозе 25 мг/кг не влияет на выраженность индуцирующего эффекта изофермента CYP2C9.

Из литературных источников известно, что к изоформам цитохромов, метаболизирующих производные бензимидазола, относят CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP2C8, CYP2B1. При этом ведущая роль в метаболизме бензимидазолов принадлежит следующим изоформам: CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6, CYP2C9. Различные производные бензимидазола могут выступать в роли как индукторов, так и ингибиторов, вышеперечисленных изоформ (Metabolic drug interactions /R.H. Levy, K.E. Thummel, W.F. Trager. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000. 793 p.).

Афобазол может применяться одновременно с другими лекарствами, метаболизируемыми системой цитохрома P450, например, с нестероидными противовоспалительными, сердечно-сосудистыми средствами, что требует выяснения возможных межлекарственных взаимодействий. Из литературы известно, что широко применяемое другое производное бензимидазола – омепразол является умеренным конкурентным ингибитором CYP2C9 (Ko J.W., Sukova N., Thacker D. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms // Drug Metab. Dispos. 1997. Vol. 25, № 7 .P. 853-862.).

В то же время в наших исследованиях показано, что афобазол в анксиолитической дозе 5 мг/кг (эквивалентная терапевтической дозе человека) у крыс не вызывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на CYP2C9.

### **Оценка фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом-субстратом изофермента цитохрома P450 CYP2C9**

**Цель исследования** – изучение фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом - субстратом изоформы CYP2C9 у крыс.

В данном разделе представлены результаты влияния афобазола на фармакокинетику субстратного маркера изофермента CYP2C9 – лозартана и его метаболита E-3174 после введения анксиолитика крысам в различных дозах.

Предполагается, что изменение величины площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-T}$ ) лозартана в сторону уменьшения в зависимости от продолжительности введения афобазола можно объяснить индукцией изоформы CYP2C9 и как следствие повышением

интенсивности биотрансформации исходного соединения. И наоборот, увеличение  $AUC_{0-t}$  лозартана при прочих равных условиях можно объяснить ингибированием CYP2C9 и следовательно снижением интенсивности метаболизма препарата–маркера.

В случае метаболита лозартана E-3174 индукция изофермента CYP2C9 (повышение интенсивности биотрансформации исходного соединения) приведет к увеличению соответствующего значения  $AUC_{0-t}$  в зависимости от длительности введения афобазола, а ингибирование фермента – к уменьшению  $AUC_{0-t}$  метаболита.

Для изучения влияния величины вводимой дозы на изучаемые процессы использовали эффективную, анксиолитическую дозу афобазола – 5 мг/кг (Seredenin, S.B. Genetic differences in response to emotional stress and tranquilizers // Psychopharmacol. Biol. Narcol. 2003. Vol.3, № 1-2. P. 494-509.) и дозу в 5 раз превышающую таковую.

Препарат-маркер лозартан вводили животным в дозе 30 мг/кг. Выбор доз афобазола и лозартана продиктован низкой токсичностью препаратов. Так  $LD_{50}$  афобазола для крыс составляет 1100 мг/кг (Соловьева И.К. Анксиолитики: вчера, сегодня, завтра // Российский медицинский журнал. 2006. Т.14, №5. С. 385–388.).

Крысам вводили перорально лозартан в дозе 30 мг/кг без афобазола (контроль; I группа) и лозартан на фоне субхронического введения афобазола в течение 4-х дней, трехкратно через каждые 3 часа в дозе 5 мг/кг (II группа) и в дозе 25 мг/кг (III группа). Режим дозирования афобазола основывался на величине периода полувыведения исследуемого ЛВ (Середенин С.Б., Виглинская А.О., Кольванов Г.Б. и др. Фармакокинетика афобазола у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. Т. 70, №2. С.59-64.).

Значения  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-\infty}$  оценивали методом линейных трапеций. Учитывая значительный вклад экстраполированной части фармакокинетической кривой от момента последнего отбора проб до бесконечности ( $AUC_{t-\infty}$ ) для лозартана и его метаболита (в некоторых случаях более 20%), сравнительная оценка изменений площади под фармакокинетической кривой проводилась от нуля до момента последнего отбора пробы, т.е.  $AUC_{0-t}$  (табл. 1-2). Достоверность различий между величинами  $AUC_{0-t}$  лозартана и его метаболита после введения лозартана без афобазола и после введения лозартана на фоне субхронического введения афобазола в различных дозах оценивали по концентрациям соответствующих веществ в дискретные временные точки фармакокинетической кривой. Для этого использовали односторонний ANOVA-тест ( $p=0,05$  для сравниваемых групп). Сравнительный анализ фармакокинетических параметров лозартана в плазме крови после введения лозартана крысам контрольной группы и на фоне субхронического введения афобазола в различных дозах (II и III группы крыс) (табл. 1) показал, что изучаемое соединение всасывается из желудочно-кишечного тракта примерно с одинаковой скоростью (величины  $C_{max}/AUC_{0-t}$  составили 0,105 – 0,121ч<sup>-1</sup>). Причем  $C_{max}/AUC_{0-t}$  в I и во II группах характеризовалась одинаковой величиной - 0,105 ч<sup>-1</sup>, то есть скорость всасывания лозартана на фоне субхронического введения афобазола в дозе 5 мг/кг не отличалась по величине от аналогичного параметра в контрольной группе.

Таблица 1. Фармакокинетические параметры лозартана в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах

№/№ групп	Фармакокинетические параметры										
	AUC <sub>0-Т</sub> , нг/мл×ч	AUC <sub>0-∞</sub> , нг/мл×ч	Вклад AUC <sub>t-∞</sub> , %	T <sub>max</sub> , ч	C <sub>max</sub> , нг/мл	C <sub>max</sub> /AUC <sub>0-Т</sub> , ч <sup>-1</sup>	CL/F, л/ч/кг	K <sub>el</sub> , ч <sup>-1</sup>	t <sub>1/2 el</sub> , ч	MRT, ч	Vd/F, л/кг
I контроль	235,58	295,63	20,31	1,0	24,74	0,105	0,101	0,067	10,39	14,98	1,522
II	166,64	221,47	24,75	2,0	17,53	0,105	0,135	0,061	11,39	16,86	2,226
III	51,85*	56,82*	8,76	1,0	6,26*	0,121	0,528*	0,105*	6,60*	9,38*	5,026*

\* - p=0,05 для сравниваемых групп (по ANOVA – тесту)

Как видно из табл.1 время достижения максимальной концентрации (T<sub>max</sub>) лозартана в плазме крови в I и в III группах крыс составило 1,0 ч, во II группе – 2,0 ч. Максимальная концентрации (C<sub>max</sub>) лозартана в контрольной группе составила 24,74 нг/мл, во II группе – 17,53 нг/мл, в то же время величина C<sub>max</sub> в III группе была значительно ниже и составила 6,26 нг/мл (табл. 1).

Анализ параметров кинетики позволяет заключить, что лозартан медленно выводится из организма, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы крови (K<sub>el</sub>), которые составили (0,061– 0,105 ч<sup>-1</sup>). Однако следует отметить, что лозартан быстрее выводится из организма крыс III группы в сравнении с контролем (в 1,7 раз). В то же время значение K<sub>el</sub> во II группе было близко по абсолютной величине к аналогичному параметру контрольной группы. Медленное выведение лозартана из организма характеризуется также величинами следующих фармакокинетических параметров: среднее время удерживания препарата в организме (MRT) для крыс II группы – 16,86 ч и для III – 9,38 ч, соответственно. Величина MRT в контрольной группе составила 14,98 ч. Период полувыведения препарата из организма (t<sub>1/2el</sub>) для крыс II группы составил 11,39 ч и 6,60 ч для животных III группы (табл.1).

Последние результаты говорят о более быстром выведении лозартана из организма крыс группы III вследствие индукции изоформы CYP2C9, обусловленной субхроническим введением афобазола в дозе 25 мг/кг.

В то же время быстрое снижение концентраций неизмененного лозартана в плазме крови крыс II и особенно III групп обуславливает небольшие величины площадей под фармакокинетическими кривыми (AUC<sub>0-Т</sub> = 166,64 и 51,85 нг/мл×ч, соответственно) по сравнению с контролем (AUC<sub>0-Т</sub> = 235,58 нг/мл×ч). Абсолютные величины AUC<sub>0-∞</sub> в плазме крови крыс II и III групп составили 221,47 и 56,82 нг/мл×ч. Величина AUC<sub>0-∞</sub> в контрольной группе составила 295,63 нг/мл×ч.

Величина кажущего клиренса (CL/F) лозартана в III группе крыс была значительно выше по абсолютной величине аналогичного параметра контрольной группы (в 5,2 раза). В то же время значение CL/F во II группе было близко по абсолютной величине к аналогичному параметру контрольной группы (0,101 и 0,135 л/ч/кг, соответственно) (табл. 1).

Параметром, характеризующим степень проникновения лекарственного вещества в ткани, является кажущийся объем распределения (Vd/F). Его величина для лозартана после перорального введения в дозе 30 мг/кг в контрольной группе составила 1,522 л/кг, во II и в III



группе 2,226 и 5,026 л/кг, соответственно. Необходимо отметить, что величины Vd/F у животных II и III групп, выше аналогичного параметра контрольной группы (в 1,5 и 3,3 раза, соответственно табл.1).

Уменьшение величин AUC лозартана и увеличение значений его CL/F и Vd/F на фоне 4-х дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг (III группа) в сравнении с контрольной и II группами объясняется возрастанием интенсивности биотрансформации исходного соединения.

Таким образом, введение афобазола в дозе 25 мг/кг в течение 4-х дней, трехкратно через каждые 3 часа вызывает умеренный индуцирующий эффект на изоформу CYP2C9.

Фармакокинетика основного метаболита лозартана E-3174 существенно отличается от кинетики исходного соединения, прежде всего, более высокими концентрациями (табл.2), и как следствие, значениями площадей под фармакокинетическими кривыми. Как видно из табл.2, время достижения  $C_{max}$  E-3174 в плазме крови крыс контрольной группы составило 2,0 ч, во II и в III группе 1,0 ч. Сокращение времени наступления  $C_{max}$  в плазме крови во II и в III группе животных, по сравнению с контрольной, можно объяснить увеличением скорости образования метаболита E-3174, вызванное субхроническим введением афобазола (табл.2).

Таблица 2. Фармакокинетические параметры метаболита E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах

№/№ групп	Фармакокинетические параметры							
	AUC <sub>0-τ</sub> , нг/мл×ч	AUC <sub>0-∞</sub> , нг/мл×ч	Вклад AUC <sub>τ-∞</sub> ,%	T <sub>max</sub> , ч	C <sub>max</sub> , нг/мл	K <sub>el</sub> , ч <sup>-1</sup>	t <sub>1/2 el</sub> , ч	MRT, ч
I контроль	406,75	528,59	23,05	2,0	59,55	0,062	11,14	15,89
II	345,69	427,17	19,08	1,0	71,21	0,070	9,97	14,08
III	645,11*	803,28*	19,69	1,0*	97,06*	0,069	9,99	14,40

\* - p=0,05 для сравниваемых групп (по ANOVA – тесту)

Величина  $C_{max}$  метаболита E-3174 у крыс III группы значительно превышает аналогичный параметр контрольной и II группы у крыс.

Из данных табл.2. видно, что E-3174 выводится из организма крыс всех трех групп примерно с одинаковой скоростью, на что указывают значения  $K_{el}$  из плазмы крови, которые составили для крыс I группы – 0,062 ч<sup>-1</sup>, для крыс II группы – 0,070 ч<sup>-1</sup> и для крыс III группы – 0,069 ч<sup>-1</sup>, соответственно. Оценка параметров, характеризующих продолжительность выведения метаболита лозартана из организма животных, показала, что величины t<sub>1/2el</sub> у крыс всех трех групп примерно равны между собой (11,14, 9,97 и 9,99 ч, соответственно).

Медленное выведение метаболита лозартана E-3174 характеризуется также величиной MRT, которая составила для крыс III группы 14,40 ч. В контрольной группе этот параметр равнялся 15,89 ч (табл.2).

Более медленное снижение концентраций E-3174 в плазме крови III группы крыс обуславливает увеличение величины площади под фармакокинетической кривой (AUC<sub>0-τ</sub>=645,11 нг/мл×ч) по сравнению с контролем (AUC<sub>0-τ</sub>=406,75 нг/мл×ч).

Таким образом, с увеличением дозы афобазола до 25 мг/кг, вводимой в течение 4-х дней, трехкратно через каждые 3 часа, интенсивность образования метаболита E-3174 возросла в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой животных. Полученные данные можно объяснить индукцией афобазолом изоформы CYP2C9.

В заключительной части данного раздела следует подчеркнуть, что все фармакокинетические параметры субстратного препарата лозартана и его основного метаболита E-3174 на фоне субхронического введения афобазола крысам в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг достоверно не отличались от аналогичных параметров, рассчитанных для контрольной группы животных. Таким образом, афобазол в эффективной дозе не вызывает индукцию изофермента CYP2C9.

### Оценка метаболических отношений E-3174 к лозартану после введения афобазола в различных дозах

В данном разделе представлены результаты оценки степени индукции, вызванной введением крысам афобазола в дозах 5 и 25 мг/кг.

Индущирующий эффект афобазола оценивали по абсолютным значениям МО. В настоящей работе под «метаболическим отношением» принимали отношение площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-t}$ ) метаболита лозартана E-3174 в плазме крови к аналогичному параметру неизмененного вещества.

Оценивали МО (метаболит E-3174/лозартан) после введения лозартана без афобазола (контроль) в сравнении с введением лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола, трехкратно через каждые 3 часа в дозах 5 и 25 мг/кг.

Результаты исследования по изучению влияния эффективной, анксиолитической дозы афобазола на активность изоформы CYP2C9 представлены на рис. 3. Статистический анализ не выявил достоверно значимых различий между величинами МО E-3174 к лозартану в плазме крови животных групп I и II.

В то же время наибольшая величина МО метаболита к лозартану получена после 4-х дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг. Данный параметр достоверно отличается от контроля (рис.3).

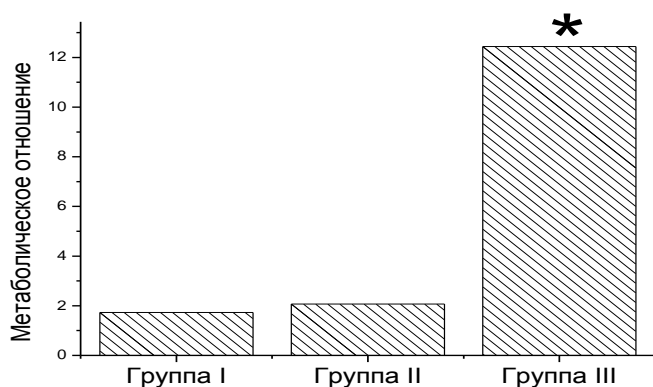


Рис. 3. Метаболические отношения (МО) метаболита лозартана E-3174 после введения лозартана без афобазола (группа I) и на фоне 4-х дневного введения афобазола в дозах 5 мг/кг (группа II) и 25 мг/кг (группа III)

\* -  $p=0,05$  для сравниваемых групп (по ANOVA – тесту)

Значение МО на фоне субхронического введения афобазола в дозе 25 мг/кг превышает аналогичную величину в контроле в 7,2 раза, в то время как МО на фоне введения анксиолитика в дозе 5 мг/кг превышает аналогичную величину в контроле всего лишь в 1,2 раза. Таким образом, после многократного введения афобазола в дозе превышающей эффективную анксиолитическую дозу в 5 раз, наблюдается его индуцирующий эффект на изофермент CYP2C9.

Афобазол в эффективной дозе (5 мг/кг) не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего действия на активность изоформы CYP2C9. При 5-кратном увеличении дозы анксиолитика выявлен индуцирующий эффект.

Учитывая высокую степень гомологичности изоформы CYP2C9 у крыс и человека (Lewis D.F., Modi S., Dickins M. Structure-activity relationship for human cytochrome P450 substrates and inhibitors // Drug Metab Rev. 2002. Vol. 34, № 1-2. P. 69-82.), можно предположить, что терапевтическая доза афобазола у человека (10 мг) также не будет вызывать изменений активности данной изоформы.

Следовательно, полученные данные позволяют предположить отсутствие межлекарственного взаимодействия афобазола в эффективной, анксиолитической дозе с другими лекарственными препаратами, метаболизируемыми изоформой CYP2C9.

### **Оценка метаболических отношений препарата-маркера изофермента CYP2C9 после введения афобазола, стандартных индуктора и ингибитора у крыс**

**Цель исследования** – доказать адекватность и избирательность разработанной методологии на примере определения изменения активности изоформы CYP2C9 после введения стандартных ингибитора и индуктора данного изофермента в эффективных дозах у крыс.

В качестве индуктора для изоформы CYP2C9 использовали рифампицин. Препарат относится к группе умеренных индукторов. В качестве ингибитора для изоформы CYP2C9 использовали флуконазол. Препарат относится к группе умеренных ингибиторов. Выбранные индуктор и ингибитор рекомендованы для оценки активности соответствующих изоформ у человека (The Merck Manual.2012). В качестве препарата-маркера для изоформы CYP2C9 использовали лозартан, который вводили животным перорально, однократно в дозе 30 мг/кг без и на фоне субхронического введения афобазола, рифампицина и флуконазола. Помимо лозартана измеряли концентрацию его метаболита (E-3174).

Изменение активности CYP2C9 под влиянием афобазола, индуктора или ингибитора изучали после введения препаратов в эффективных дозах. Афобазол вводили в дозе 5 мг/кг – группа I, рифампицин в дозе 13,4 мг/кг - группа II, флуконазол в дозе 35,7 мг/кг – группа III.

Эффективные дозы рифампицина и флуконазола рассчитывали, исходя из терапевтических доз, рекомендованных для человека, по соответствующей формуле (Reagan-Shaw S., Nihal M., Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited/S. Reagan-Shaw // FASEB J. 2008. Vol. 22, №3. P. 659-661.).

Режим дозирования индуктора и ингибитора основывался на величинах периодов полувыведения исследуемых ЛВ (Королева В.Г., Фомина И.П. Фармакокинетика рифампицина у экспериментальных животных // Антибиотики. 1976. Том 21, №8. С. 722-725.; Louie A., Liu Q., Drusano G.L. et al. Pharmacokinetic studies of fluconazole in rabbits characterizing doses which achieve peak levels in serum and area under the concentration-time curve values which mimic those of high-dose // Antimicrob. Agents. Chemother. 1998. Vol. 42, №6. P. 1512-1514.).

Так, рифампицин вводили перорально 3 раза в день через каждые 3 ч в течение 4 суток (субхроническое введение) в дозе 13,4 мг/кг. Флуконазол вводили перорально 1 раз в день в течение 4 суток в дозе 35,7 мг/кг. В исследовании использовали эффективную, анксиолитическую дозу афобазола – 5 мг/кг (перорально 3 раза в день через каждые 3 ч в течение 4 суток).

На рисунке 4 представлены результаты исследования влияния афобазола, а так же индуктора – рифампицина и ингибитора – флуконазола (в эффективных дозах) на изменение активности изоформы CYP2C9, оцениваемое по МО субстратного маркера – лозартана и его метаболита.

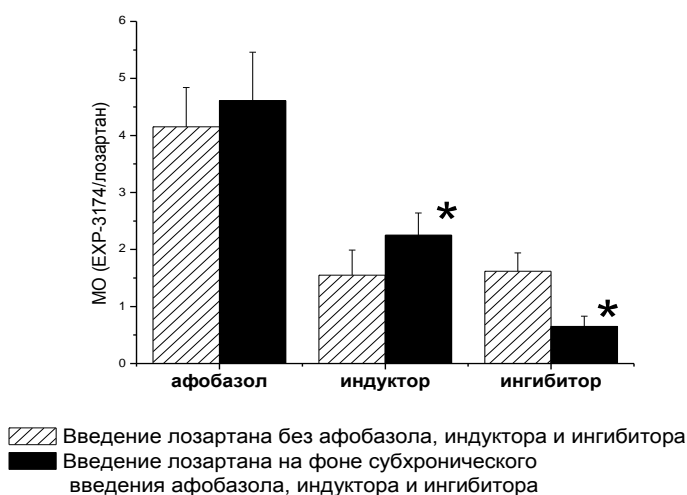


Рис. 4. Метаболические отношения (Е-3174 / лозартан) после введения афобазола, индуктора и ингибитора изоформы CYP 2C9:  
\* -  $p < 0,05$  по отношению к группе контроля (по t-критерию Стьюдента)

Из рисунка 4 видно, что после перорального субхронического введения крысам афобазола в эффективной дозе 5 мг/кг индуцирующий/ингибирующий эффект на изофермент CYP2C9 не выявлен. Так, после введения лозартана без афобазола (контроль) МО составило  $4,11 \pm 0,65$ , а после введения лозартана на фоне субхронического введения афобазола –  $4,74 \pm 0,99$ . В то же время после перорального субхронического введения индуктора рифампицина в эффективной дозе выявлен статистически значимый индуцирующий эффект. МО после однократного введения лозартана без рифампицина (контроль) составило  $1,48 \pm 0,48$ , а после субхронического введения маркера –  $2,48 \pm 0,66$ . Таким образом, индукция изоформы CYP2C9, вызванная рифампицином, привела к повышению интенсивности биотрансформации лозартана и как следствие к увеличению МО.

В случае введения крысам ингибитора – флуконазола наблюдался противоположный эффект. Так, МО после однократного введения лозартана без флуконазола (контроль) составило

1,49±0,38, а после его субхронического введения – 0,45±0,15. При этом выявлены статистически значимые различия. Следовательно, ингибирование изоформы CYP2C9, вызванное флуконазолом, привело к снижению интенсивности биотрансформации маркерного препарата и уменьшению значения МО.

Несмотря на то, что используемые в настоящем исследовании рифампицин и флуконазол относятся к группе, так называемых, умеренных индукторов и ингибиторов выраженность ингибирования у крыс в 2 раза выше степени индукции (3,31 и 1,68, соответственно).

Таким образом, проведенное исследование с одной стороны, подтвердило отсутствие у афобазола в дозе, соответствующей терапевтической, способности вызывать сдвиги в активности цитохромов, участвующих в метаболизме ряда лекарств, что позволяет исключить зависимое от CYP2C9 фармакокинетическое взаимодействие. С другой стороны, выполненная работа демонстрирует адекватность применения *in vivo* методологии для изучения влияния новых фармакологических средств на активность изоформы цитохрома P450 CYP2C9 с использованием стандартных модификаторов и субстрата-маркера.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На крысах изучено влияние афобазола на изоформу цитохрома P450 CYP2C9. Возможные эффекты (индуцирующий или ингибирующий) афобазола оценивали по абсолютным значениям метаболических отношений E-3174/лозартан в плазме крови и моче. Сравнительный анализ полученных результатов по плазме крови и суточной моче крыс показал, что в обоих случаях с увеличением дозы афобазола происходит усиление индуцирующего эффекта. Если афобазол после его субхронического введения в дозе 5 мг/кг не вызывает изменения активности изоформы CYP2C9, то при увеличении дозы до 25 мг/кг выявляется умеренный индуцирующий эффект на данную изоформу. Таким образом, оценку активности изоформы CYP2C9 можно проводить по данным полученным в плазме крови или суточной моче крыс.

Известно, что эффективная, анксиолитическая доза афобазола 5 мг/кг у крыс соответствует терапевтической дозе для человека – 10 мг.

Учитывая высокую степень гомологичности изоформы CYP2C9 у крыс и человека, можно сделать вывод, что терапевтическая доза афобазола для человека также не вызывает изменений активности данной изоформы.

Таким образом, прием афобазола в дозе 10 мг (3 раза в день) не приведет к изменению активности изоформы CYP2C9, поэтому его можно применять в сочетании с препаратами, метаболизируемыми данным изоферментом.

Многokратное увеличение дозы афобазола до 25 мг/кг и выше при введении его крысам в течение 3-4 суток (3 раза в день) вызывает умеренный индуцирующий эффект на активность изоформы CYP2C9. Таким образом, увеличение дозы афобазола может привести к снижению эффективности терапии препаратами-субстратами изоформы CYP2C9. При одновременном применении афобазола (в завышенных дозах) может снижать действие следующих ЛС: непрямых антикоагулянтов (варфарин, аценокумарол), гипогликемических препаратов

(толбутамид), многих нестероидных противовоспалительных препаратов (целекоксиб, диклофенак, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, лорноксикам, мелоксикам, напроксен, пироксикам, супрофен, и теноксикам, антагонистов рецепторов ангиотензина II (лозартан), противомикробных средств (сульфаметоксазол), противогрибковых препаратов (миконазол, флуконазол). Поэтому афобазол с перечисленными ЛС следует применять только в терапевтической дозе 10 мг (3 раза в день).

## ВЫВОДЫ

1. Модифицирована и метрологически охарактеризована высокочувствительная и селективная методика количественного определения лозартана и его метаболита Exp-3174 в биологическом материале на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофлуорометрическим детектированием.

2. Оценка метаболических отношений (по данным экскреции с мочой) показала, что афобазол в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг (3 раза в день в течение 4 суток) не вызывает изменения активности изофермента CYP2C9. При этом увеличение дозы афобазола до 25 и 75 мг/кг вызвало индуцирующий эффект. Увеличение дозы до 100 и 125 мг/кг вело к снижению выраженности этого эффекта.

3. Установлено, что продолжительность введения афобазола в течение 3х или 4х дней в дозе 25 мг/кг не влияет на выраженность индуцирующего эффекта изофермента CYP2C9.

4. После введения афобазола в дозе 5 мг/кг, 3 раза в день в течение 4 суток фармакокинетическое взаимодействие с препаратом – маркером не выявлено. Субхроническое введение афобазола в дозе 25 мг/кг вызывает индуцирующий эффект изофермента CYP2C9, достоверно изменяя величины фармакокинетических параметров лозартана и его метаболита.

5. Сравнительный анализ полученных результатов по плазме крови и суточной моче крыс показал, что в обоих случаях с увеличением дозы афобазола происходит усиление индуцирующего эффекта.

6. На примере афобазола с использованием стандартных модификаторов и субстратного маркера апробирована методология изучения *in vivo* влияния лекарственного средства на изофермент цитохрома P450 CYP2C9.

7. Афобазол в терапевтической дозе 10 мг (3 раза в день) не вызывает изменения активности изоформы CYP2C9, поэтому его можно применять в сочетании с препаратами, метаболизируемыми данным изоферментом. Многократное увеличение дозы афобазола может привести к снижению эффективности терапии препаратами-субстратами изофермента CYP2C9.

## Практические рекомендации

1. Афобазол в терапевтической дозе (10 мг 3 раза в день) можно применять в комбинированной терапии с препаратами, метаболизируемыми изоформой CYP2C9.
2. Апробированную методологию изучения влияния лекарственных веществ на изоформу CYP2C9 *in vivo* с использованием стандартных модификаторов и субстрата-маркера у крыс целесообразно использовать в доклинических исследованиях.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи:

1. **Пронина О.Г. (Грибакина)** Количественное определение лозартана и его метаболита в моче крыс. [Текст]/ О.Г. Пронина (Грибакина), Г.Б. Колыванов, А.О. Виглинская, В.П. Жердев, Е.В. Блынская// Вестн. Моск. Сер. 2. Химия. Ун-та. - 2012. - Т.53,№3. - С. 194-197.
2. **Грибакина О.Г.** Фармакокинетическое взаимодействие афобазола с лозартаном – препаратом – субстратом цитохрома CYP2C9 в эксперименте. [Текст] / **О.Г.Грибакина**, Г.Б.Колыванов, А.А.Литвин, В.П.Жердев, С.Б.Середенин //Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013. – Т. 76, № 3, С 35-37.
3. Новицкая Я.Г. *In vivo* оценка метаболического отношения маркеров CYP2C9 и CYP1A2 после введения афобазола в сравнении со стандартными индукторами и ингибиторами цитохромов. [Текст]/Я.Г. Новицкая, **О.Г. Грибакина**, А.А. Литвин, Г.Б. Колыванов, В.П. Жердев, В.В. Смирнов, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013. Т. 76, №11. - С.36-39.

### *Статья в сборнике*

1. **Грибакина, О.Г.** Взаимодействие афобазола с препаратами-субстратами изоферментов цитохрома P450. [Текст] / **О.Г. Грибакина**, Я.Г. Новицкая, М.И. Емельянов, Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин, В.П. Жердев // Сб. научных трудов по материалам IX международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины». – М., 2013. - С. 112-119.

### *Тезисы:*

1. **Пронина О.Г.(Грибакина)**. Изучение влияния нового селективного анксиолитика афобазола на изоферменты цитохрома P450 у крыс. [Текст] / О.Г. Пронина (Грибакина), Я.Г. Новицкая, М.И. Емельянов, А.О. Виглинская, В.В. Смирнов, Д.В. Бастрыгин, Е.А. Литвин, Р.В. Шевченко, В.П. Жердев // Материалы XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство» 23-27 апреля 2012, Москва. – М., 2012. - С. 417.
2. **Пронина О.Г.(Грибакина)** Оценка фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратами-субстратами изоформ цитохрома P450. [Текст] / **О.Г. Пронина (Грибакина)**, М.И. Емельянов, Я.Г. Новицкая, В.В. Смирнов, А.О. Виглинская, Р.В. Шевченко, А.А. Литвин, В.П. Жердев // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» 18-21 сентября 2012 г, Республика Татарстан, г. Казань. - М.: изд-во Фолиум, 2012. - С. 155.
3. **Грибакина, О.Г.** Фармакокинетическое взаимодействие афобазола с препаратами-субстратами изоформ 2C9, 1A2 и 3A4 в эксперименте. [Текст] / **О.Г. Грибакина**, Я.Г. Новицкая, М.И. Емельянов// Материалы Евразийского Конгресса с международным участием «Медицина, фармация и общественное здоровье» 21-23 мая 2013, г. Екатеринбург. – Екатеринбург, 2013. - С. 80

4. Новицкая, Я.Г. Влияние афобазола на некоторые изоформы цитохрома P450 in vivo. [Текст] /Я.Г. Новицкая, **О.Г. Грибакина**, М.И. Емельянов // Материалы Первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» 3-5 июня 2013, г. Москва. – М., 2013. - С. 84.
5. **Грибакина О.Г.** Оценка влияния афобазола на изменение активности изоформ CYP 1A2 и CYP2C9 после его введения в различных дозах по данным мочевой экскреции [Текст]/ **О.Г. Грибакина**, Я.Г.Новицкая, В.П. Жердев, А.А. Литвин, Г.Б. Колыванов //Обзор психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева. Приложение. 2014 г. (Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «Инновации в фармакологии: от теории к практике», С.-Петербург, 2014- С. 67-68).