

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ “НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФАРМАКОЛОГИИ ИМЕНИ В. В. ЗАКУСОВА”

---

На правах рукописи

ГРИБАКИНА  
ОКСАНА ГЕННАДЬЕВНА

**Взаимодействие афобазола с маркерным субстратом изоформы  
цитохрома P450 CYP2C9**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

**Диссертация**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Геннадий Борисович Колыванов

Москва 2015

## Оглавление

Введение.....	7
<b>Глава 1 Обзор литературы. Фармакокинетические взаимодействия лекарственных веществ, метаболизируемых изоферментом цитохрома P450 CYP2C9.....</b>	<b>13</b>
1.1. Межлекарственное взаимодействие.....	13
1.1.1 Индукция и ингибирование.....	16
1.1.2 Маркерные субстраты.....	18
1.1.3 Методы оценки межлекарственного взаимодействия.....	20
1.2 Изофермент CYP2C9, как составная часть суперсемейства цитохрома P450..	21
1.2.1 Изоферменты подсемейства CYP2C у крыс.....	24
1.2.1.1 Изофермент цитохрома P450 CYP2C9 у крыс.....	25
1.2.2 Изоферменты подсемейства CYP2C у приматов.....	25
1.2.3. Изоферменты подсемейства CYP2C у человека.....	26
1.2.3.1 Изофермент цитохрома P450 CYP2C9 у человека.....	27
1.2.3.2 Генетический полиморфизм CYP2C9.....	28
1.2.3.3 Взаимодействие лекарственных веществ - субстратов CYP2C9 с пищей, лекарственными и фитопрепаратами.....	32
1.3 Маркерный препарат - субстрат изофермента CYP2C9 – лозартан.....	35
1.3.1 Фармакокинетика и межлекарственные взаимодействия лозартана у крыс..	36
1.3.2 Метаболизм, фармакокинетика и межлекарственные взаимодействия лозартана у людей.....	38
1.3.2.1 Метаболизм лозартана.....	38
1.3.2.2 Фармакокинетика и межлекарственные взаимодействия лозартана.....	40
1.4 Основные рекомендации по изучению межлекарственных взаимодействий новых лекарственных средств <i>in vivo</i> .....	43
1.4.1 Дизайн исследований межлекарственных взаимодействий <i>in vivo</i> .....	45

1.4.2 Выбор субстратов для изучения межлекарственных взаимодействий ЛС.....	48
1.4.2.1 Пути введения и дозы ЛС-субстратов, ингибиторов и Индукторов.....	49
1.4.2.2 Фармакокинетические параметры, фармакодинамические показатели и статистические расчеты, применяемые для оценки межлекарственных взаимодействий.....	50
<b>Глава 2 Материалы и методы исследования.....</b>	<b>52</b>
2.1 Материалы .....	52
2.1.1 Объекты исследования.....	52
2.1.2 Химические реактивы.....	54
2.1.3 Аналитическая аппаратура и средства измерений.....	54
2.1.3.1 Основные аналитические приборы.....	54
2.1.3.2 Вспомогательные устройства.....	55
2.1.4 Приготовление растворов для анализа.....	55
2.1.4.1 Приготовление концентрированных и рабочих стандартных растворов....	55
2.1.4.2 Приготовление фосфатного буферного раствора (рН 1,9).....	56
2.1.4.3 Приготовление подвижной фазы для хроматографического анализа биологических образцов животных.....	56
2.1.4.4 Приготовление глициновой буферной смеси для экстракции.....	56
2.1.5 Экспериментальные животные.....	57
2.2 Методы.....	57
2.2.1 Введение препарата.....	57
2.2.2 Способ отбора мочи и крови.....	57
2.2.3 Построение калибровочных кривых .....	59
2.2.4 Метрологическая характеристика методик определения лозартана и его метаболита Е-3174.....	59
2.2.5 Условия количественного определения лозартана и его метаболита Е-3174 в моче и плазме крови животных с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	60

2.2.6	Обработка биологических проб, экстракция лозартана и его метаболита E-3174 из биологических образцов.....	63
2.2.6.1	Подготовка мочи крыс к хроматографическому анализу.....	64
2.2.6.2	Определение процента извлечения лозартана и его метаболита E-3174 из мочи.....	64
2.2.6.3	Подготовка плазмы крови крыс к хроматографическому анализу.....	65
2.2.6.4	Определение процента извлечения лозартана и его метаболита E-3174 из плазмы крови.....	65
2.2.6.5	Испытание на разведение опытных образцов суточной мочи и плазмы крови крыс.....	66
2.2.7	Фармакокинетические параметры, используемые для интерпретации экспериментальных данных.....	69
2.2.8	Статистическая обработка полученных результатов.....	70
2.2.9	Оценка индуцирующего или ингибирующего эффекта.....	71
<b>Глава 3</b>	<b>Изучение влияния афобазола на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 по данным экскреции с мочой.....</b>	<b>72</b>
3.1	Изучение влияния афобазола на изменение активности изоформы CYP2C9 после его введения в различных дозах.....	72
3.2	Изучение влияния длительности введения крысам афобазола в дозе 25 мг/кг на изменение активности изоформы CYP2C9.....	82
<b>Глава 4</b>	<b>Оценка фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом-субстратом изофермента цитохрома P450 CYP2C9.....</b>	<b>88</b>
4.1	Влияние величины дозы афобазола на фармакокинетику лозартана и его метаболита у крыс.....	89
4.2	Оценка метаболических отношений E-3174 к лозартану после введения афобазола в различных дозах .....	98
<b>Глава 5</b>	<b>Оценка метаболических отношений препарата-маркера изофермента CYP2C9 после введения афобазола, стандартных индукторов и ингибиторов у крыс.....</b>	<b>104</b>

Общее заключение.....	113
Выводы.....	114
Список сокращений и обозначений.....	116
Список литературы.....	117
Нормативные ссылки.....	135

## ВВЕДЕНИЕ

**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 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 (Кукес В.Г. и др. // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 293 с.; Li A.P. // WILEY, 2008. 244 p.; Rodrigues A. // Informa healthcare, 2008. 745 p.; Testa V., Kramer S.D. // 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. et al. // J Clin Pharmacol. 2003. Vol. 43, №1. P.84-91.; Zhou S.F. et al. // 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 G.T. et al. // 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. et al. // *Biochem Pharmacol.* 2002. Vol.63, №5. P. 889-896.; Lee D. et al. // *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 необходимой процедурой уже на этапе разработки ЛС как за рубежом, так и в Российской Федерации (Сычев Д.А.// М.: 2009. 32 с.; Bailie G.R. // *Med facts.* - Bone: Care International, 2004. 69 p.; Nagai N. // *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-этоксibenзилимидазола дигидрохлорид (Середенин С.Б. и др. // *Вестник РАМН.* 1998. №11. С.3-9.; Seredenin S.B. // *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. Воспроизвести/модифицировать 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.

**Практическая значимость исследования.** Установлено, что введение афобазола в течение 4-х суток (по 3 раза в сутки через каждые 3 ч) в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг, соответствующей терапевтической у человека (10 мг), не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на изоформу CYP2C9.

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

**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 спектрофлуориметрическим детектированием, фармакокинетический – модельно-независимый и статистический.

#### **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 Е-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 лекарственного средства 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.).

**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.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 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.

## Глава 1. Обзор литературы

### Фармакокинетические взаимодействия лекарственных веществ, метаболизируемых изоферментом цитохрома P450 CYP2C9

Настоящая диссертационная работа посвящена изучению фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом-субстратом изофермента CYP2C9 – лозартаном. В связи с этим целесообразно проанализировать литературные источники, содержащие информацию о лекарственных взаимодействиях изофермента CYP2C9, индукции и ингибировании данной изоформы, биотрансформации и фармакокинетики маркерного препарата-субстрата лозартана у различных видов животных и человека. Анализ литературных источников позволит сделать заключение о возможности использования в качестве биологической модели крыс для изучения влияния новых фармакологических средств на активность изоформы цитохрома P450 CYP2C9 с использованием стандартных модификаторов и субстратных-маркеров.

#### 1.1. Межлекарственное взаимодействие

В настоящее время чаще всего для лечения различных заболеваний используют одновременно несколько препаратов, что может усилить эффективность фармакотерапии. Однако при некорректном подборе лекарств может происходить и снижение эффективности лечения из-за взаимодействия лекарственных препаратов. Клиническое взаимодействие лекарственных средств (ЛС) чрезвычайно актуально, так как в последнее время все чаще появляются сообщения о взаимодействии между медикаментами, описаны случаи неэффективности лечения или возникновения нежелательных лекарственных реакций, иногда даже с летальным исходом. Причиной этого могут быть, во-первых, физическая, химическая или физико-химическая несовместимость и, во-вторых, фармацевтические и фармакокинетические взаимодействия в организме, связанные как с влиянием одного лекарственного препарата на всасывание, транспорт, распределение, превращение и элиминацию другого ЛС, так и на

особенности его фармакодинамики (Чекман И. // К.: Здоровья, 1986. 736 с.; Li A.P. // WILEY, 2008. 244 p.; Rodrigues A. // Informa healthcare, 2008. 745 p.).

Известно, что каждое ЛС может проявлять побочные эффекты в результате взаимодействия с другими фармакологическими препаратами. Прием двух препаратов приводит к лекарственному взаимодействию у 6 % пациентов. Назначение пяти и более фармакологических средств увеличивает его частоту до 50 %. При приеме десяти препаратов риск лекарственного взаимодействия достигает 100 % (Деримедведь Л.В. и др.// Изд-во «Мегаполис», 2002. 784 с.).

Взаимодействие лекарственных средств - это количественное или качественное изменение эффектов, вызываемых лекарственными средствами при одновременном или последовательном применении двух и более препаратов (Харкевич Д.А. // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 736 с.).

Существует несколько видов взаимодействия.

Фармакокинетические взаимодействия - изменение одной или нескольких характеристик объекта: всасывания, распределения, метаболизма или экскреции. Такие типы взаимодействия обычно определяются следующими параметрами: концентрация в сыворотке крови, время полувыведения, связывание с белками, количество в крови свободного препарата, скорость и количество экскретируемого препарата.

Фармакодинамические взаимодействия - это изменение реакции организма больного на лекарственный препарат. Синергизм или антагонизм двух лекарственных средств - вот причина такого рода взаимодействий. В последнее время все большее внимание уделяется изучению взаимодействия ЛС на уровне изменений их биотрансформации. Известно несколько сотен ЛС, влияющих на метаболизм других ЛС (Жердев В. П. и др. // Тезисы 5-й Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», Москва. 2010. С.15.). Биотрансформация лекарственного препарата часто приводит к превращению жирорастворимых веществ в более полярные и наконец, в водорастворимые. Эти метаболиты биологически менее активны, а биотрансформация облегчает их экскрецию с

мочой или желчью. Метаболизм может происходить не только в печени, но и в стенке кишки, почках и легких. Некоторые метаболиты в результате биотрансформации становятся более активными, чем исходное соединение. Итак, если взаимодействие приводит к ускорению метаболизма лекарства, то вероятнее всего уменьшится время биологического действия препарата, однако если активен именно метаболит препарата, то точно такое же взаимодействие может вызвать усиление его действия. Большинство процессов биотрансформации происходят в микросомах печени и являются несинтетическими реакциями, например, окисление, восстановление и гидролиз. Некоторые немикросомальные печеночные ферменты, например алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы, моноаминоксидазы и диаминоксидазы и большое количество эстераз и амидаз также принимают важное участие в биотрансформации. Поэтому вероятность возникновения и выраженность взаимодействия зависит от количества и активности метаболических ферментов (Romac D., Albertson T. // Clinics in Chest Medicine. 1999. Vol. 20, №2. P. 385-399.).

На межлекарственное взаимодействие оказывает большое влияние изменение активности цитохрома P450. Изучение метаболизма лекарств вызывает большой интерес как в научных кругах, так и в фармацевтической промышленности. Данные *in vitro* позволяют выявить изменения в биотрансформации лекарств, метаболизируемых изоферментами цитохрома P450, и следовательно, предсказать потенциальные серьезные межлекарственные взаимодействия в организме человека. В последние годы имеется значительный технологический прогресс в проведении исследований *in vitro*. Тем не менее, остается недоверие в трактовке результатов, в частности, ложноотрицательных и ложноположительных прогнозов. Это может отражать отсутствие понимания важности интегрирования данных, полученных *in vitro* с другими фармакокинетическими явлениями для достижения целостного представления о потенциальных межлекарственных взаимодействиях (Ito K. et al. // Pharmacol Rev. 1998. Vol. 50, №3. P. 387–412.; Tucker G.T. et al. // Clin Pharmacol Ther. 2001. Vol.

70, P.103–114.; Yao C., Levy R.H. // J Pharm Sci. 2002. Vol. 91, № 9. P. 1923–1935.; Evans G. / CRS PPESS, 2004. P. 398.).

### 1.1.1. Индукция и ингибирование

Различные химические соединения могут влиять на активность ферментов биотрансформации ЛС, как повышая ее (индукция), так и снижая (ингибирование). В качестве индукторов и ингибиторов могут выступать многие ЛС, компоненты пищи, алкоголь, соединения, содержащиеся в табачном дыме. При этом индукция ферментов не столь опасна в клинической практике, так как вызывает снижение концентрации ЛС, в отличие от ингибирования, которое может вызвать побочные эффекты. Лекарственное взаимодействие может произойти: а) в результате индукции экспрессии метаболизирующих ферментов, б) в результате ингибирования ферментативной активности или экспрессии. Известно, что не все изоферменты цитохрома P450 подвергаются индукции. Изоформы CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 человека индуцируются, в то время как изоформа CYP2D6 нет. Индукция возникает в результате активации транскрипции, что приводит к увеличению мРНК и белка в последующем синтезе (Barry M., Feely J. // Pharmac. Ther. 1990. Vol. 48, P.71-94.; Lin J. // Drug Metab. Dispos. 1995. Vol. 23, № 10. P.1008-1021.).

Наиболее распространенный механизм, лежащий в основе лекарственного взаимодействия является ингибирование активности цитохрома P450 (Walsky R., Obach S. // Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Drug Metabolism. 2004. Vol. 32, № 6. P. 647–660.).

Индукция ферментов биотрансформации – это абсолютное увеличение их количества и активности за счет воздействия на них определенного химического соединения, например ЛС. Индукции подвергаются как ферменты I фазы метаболизма (изоферменты цитохрома P450), так и ферменты II фазы биотрансформации (Кукес В.Г., Стародубцев А.К. // М.: ГЕОТАР-МЕД, 2003. 640 с.).

Механизмы индукции:



1. Воздействие молекулы – индуктора на регуляторную область гена, ответственного за синтез данного фермента. Данный механизм характерен при аутоиндукции, при которой увеличение активности фермента, метаболизирующего ксенобиотик, происходит под действием самого ксенобиотика;

2. Стабилизация молекулы изофермента вследствие образования комплекса с некоторыми ксенобиотиками (этанол, ацетон).

3. Индукция изоферментов цитохрома Р-450 СYP1A1, СYP3A4, СYP2B6 происходит в результате взаимодействия молекулы индуктора со специфическими рецепторами, которые относятся к классу белков – регуляторов транскрипции (CAR, PXR и др.) (Кукес В.Г., Фисенко В.П. / М.: Палея-М, 2001. 133с.).

Индукция ферментов приводит к ускорению биотрансформации соответствующих ЛС, и вследствие, к снижению фармакологической активности. Среди наиболее широко применяемых индукторов в клинической практике можно считать: рифампицин (индуктор изоферментов цитохрома Р-450 СYP1A2, СYP2C9,) и барбитураты (индукторы изоферментов цитохрома Р-450 СYP1A2, СYP2B6, СYP2C8, СYP2C9, СYP2C19, СYP3A4) (Schuetz E.G. et al. // Proc Natl Acad Sci. 1996. Vol. 93, P. 4001–4005.; Meadowcroft A.M. et al. // J Clin Pharmacol. 1999. Vol. 39, №4. P.418-424.; Park J.Y. et al. // Clin Pharmacol Ther. 2003. Vol.74, №4. P. 334-340.; Zhang J.G. et al. //Drug Metab Lett. 2010. Vol. 4, №4. P.185-194.).

Рифампицин, как индуктор, действует быстро, и его воздействие на ферменты биотрансформации может быть обнаружено уже через 2-4 дня от начала его применения, в отличие от барбитуратов, для развития индуцирующего эффекта которых требуется около 2-х недель. Совместное применение рифампицина и барбитуратов с непрямые антикоагулянтами (варфарин, фенилин), кетоконазола, глюкокортикоидов может приводить к снижению фармакологической активности последних. В связи с этим необходимо производить корректировку режима дозирования, т.е. увеличения доз (Frymoyer A. et al. // Clin Pharmacol Ther. 2010. Vol. 88, № 4. P.540-547.).

Некоторые соединения могут угнетать активность ферментов биотрансформации ЛС.

Основные механизмы ингибирования ферментов биотрансформации:

1. Связывание с геном, регулирующим синтез определенных изоферментов цитохрома Р-450 (циметидин, омепразол);

2. Прямая инактивация изоферментов Р-450 (гастоден) и угнетение взаимодействия цитохрома Р-450 с НАДФ-Н-Цитохром Р-450 редуктазой (флавоноиды);

Некоторые препараты, обладающие высоким аффинитетом к определенным ферментам, ингибируют метаболизм препаратов с более низким аффинитетом к этим ферментам. Такой механизм называется метаболическая конкуренция (Rowland M., Tozer T.N. // Williams&Wilkins, 1995.745 p.).

При снижении активности ферментов, метаболизирующих ЛС, происходит повышение концентрации в крови ЛС – субстратов данных ферментов, что является причиной развития побочных эффектов (там же).

Например: совместное применение непрямого антикоагулянта варфарина, который является субстратом CYP2C9 с сульфаниламидными препаратами, являющимися ингибиторами данного изофермента, приводит к усилению антикоагулянтного эффекта варфарина и повышению риска геморрагических осложнений. Поэтому при совместном применении варфарина с сульфаниламидами рекомендуется контролировать состояние пациента (Lumholtz B. et al. // Clin Pharmacol Ther. 1975. Vol .17, №6. P.731-734.).

### 1.1.2.Маркерные субстраты

Ученые разных стран все чаще признают важным то, что необходимо пытаться достичь максимальной согласованности в выборе маркерных субстратов изоферментов цитохрома Р450 для изучения фармакокинетических межлекарственных взаимодействий. Стандартизация субстратов изоферментов цитохрома Р450 в исследованиях *in vivo* позволила бы существенно

оптимизировать изучение межлекарственного взаимодействия. Характеристики идеального субстрата для цитохромов P450 включают в себя:

1. Субстрат для одного изофермента цитохрома P450;
2. Высокая чувствительность к изменениям в активности соответствующего изофермента P450;
3. Не зависит от Р-гликопротеина и других известных транспортеров;
4. Незначительный фармакодинамический эффект от дозы используемого субстрата;
5. Коммерческая доступность;
6. Высокая чувствительность метода количественного определения маркерного субстрата (Thorir D. et al. // Drug metabolism and disposition. 2003. Vol. 31, №7. P.815–832.).

В 1999 году в «Руководстве для промышленного изучения *in vivo* лекарственного метаболизма /лекарственного взаимодействия, изучения дизайна, анализ данных, и рекомендации по дозированию и маркировке» было предложено использовать специфичные препараты для клинического ингибирования соответствующих изоформ, которые должны быть выбраны в качестве предпочтительного субстрата для изоферментов цитохрома P450 (Таблица 1).

**Таблица 1 Классические субстраты для некоторых изоферментов цитохрома P450**

CYP1A2	Теofilлин, Кофенин
CYP2C9	S-варфарин, толбутамид, лозартан
CYP2C19	S-мефетоин, омепразол
CYP3A4	мидазолам, симвастатин

Что же касается CYP2C9, то накопленные данные позволяют сказать, что данная изоформа считается одним из самых важных ферментов, участвующих в метаболизме лекарств в организме человека (Miners J.O., Birkett D.J. // J Clin Pharmacol. 1998 Vol. 45, № 6. P.525-538.).

Субстратами CYP2C9 являются многие нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), в том числе селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (диклофенак, ибупрофен, напроксен), ингибиторы рецепторов ангиотензина (ирбесартан, лозартан), фенитоин, пероральные сахаропонижающие ЛС (производное сульфонилмочевины - глибурид), а также антикоагулянты непрямого действия (варфарин, аценокумарола) (Leemann T. et al. // *Life Sci.* 1993. Vol. 52, № 1. P.29-34.; Hamman M.A. et al. // *Biochem Pharmacol.* 1997. Vol. 54, № 1. P.33-41.; Tracy T.S. et al // *Eur J Clin Pharmacol.* 1997. Vol. 52, № 4. P.293-298.; Marino M.R., Vachharajani N.N. // *Clin Pharmacokinet.* 2001. Vol. 40, № 8. P.605-614.; Rajnarayana K. et al. // *Drug Metabol Drug Interact.* 2007. Vol. 22, № 2-3. P.165-174.; Zhou S.F. et al. // *Curr Med Chem.* 2009. Vol. 16, № 27. P. 3480-3675.).

В 2003 году авторами С. Lee и J. Pieper было проведено исследование, в котором они сравнивали субстраты - толбутамид, флурбипрофен и лозартан по изменению активности CYP2C9. В результате авторы делают вывод, что для данного изофермента лучшим субстратом является толбутамид (Lee C.R. et al. // *J Clin Pharmacol.* 2003. Vol.43, №1. P.84-91.).

### 1.1.3. Методы оценки межлекарственного взаимодействия

Для оценки межлекарственного взаимодействия используют два метода:

а) фенотипирование – прямой метод определения активности того или иного изофермента биотрансформации ЛС по фармакокинетике его специфического субстрата и его метаболита;

б) генотипирования - косвенный метод определения активности того или иного изофермента биотрансформации ЛС на основании изучения его гена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Кукес В.Г. // М: ГЭОТАР-МЕД, 2009. 432 с.).

Специфичность ферментов метаболизма позволила разработать методы их фенотипирования. Активность ферментов метаболизма определяется по маркерным субстратам при измерении их концентраций и концентраций метаболитов в плазме крови или моче.

Метаболическое отношение (метаболический индекс) – это отношение концентрации метаболита к концентрации неизмененного вещества. Варианты результатов исследования:

- метаболическое отношение не меняется, если нарушено всасывание ксенобиотиков, о чем говорят низкие значения концентрации «маркерного» субстрата и низкие значения концентрации его метаболита в плазме крови или моче;

- низкое метаболическое отношение говорит о снижении активности фермента метаболизма, если установлены высокие концентрации «маркерного» субстрата и низкие значения концентрации его метаболита в плазме крови или моче;

- высокое метаболическое отношение связано с повышением активности фермента метаболизма, когда имеются высокие значения концентрации метаболита и низкие значения концентрации «маркерного» субстрата в плазме крови или моче (Каркищенко Н.Н.// Ростов н/Д: Феникс, 2001. 384 с.).

Каждый изофермент цитохрома Р-450 кодируется определенным геном. Гены изоферментов находятся в разных хромосомах и занимают в них разные локусы. Известно 53 гена изофермента цитохрома Р-450. Определение этих изоферментов, осуществляемое с помощью полимеразной цепной реакции называется генотипированием изоферментов цитохрома Р-450 (Кукес В.Г., Фисенко В.П. // М.: Палея-М, 2001.133с.; Rothstein M.A. // John Wiley & Sons, 2003. 384 p.).

## **1.2 Изофермент CYP2C9, как составная часть суперсемейства цитохрома Р450**

Одной из наиболее важных метаболизирующих ферментных систем в организме человека является система цитохрома Р450 (СYP), которая отвечает за окислительный метаболизм многочисленных эндогенных веществ и ксенобиотиков (Frye R.F. // Mol Interv. 2004. Vol. 4, № 3. P.157-162.).

В мембранах печеночной эндоплазматической сети обнаружена группа ферментов, входящая в состав монооксигеназной системы и, из-за необычного

максимума поглощения СО-соединения при 450 нм, названная цитохромами P-450.

Цитохром P450 – суперсемейство ферментов, которые катализируют метаболизм большого числа эндогенных и экзогенных соединений. Он играет основную роль в биотрансформации ксенобиотиков и катализирует 70-80% реакций, протекающих во всех стадиях лекарственного метаболизма (Chang G.W., Kam C.A. // *Anaesthesia*. 1999.Vol. 54, № 1. P. 42.).

Изоферменты цитохрома P450 играют важную роль в биосинтезе стероидов, эйкозаноидов и других физиологически важных промежуточных продуктов. С другой стороны, они также очень важны для метаболизма жирных кислот и других липофильных эндогенных субстратов и для большинства лекарств и ксенобиотиков. Каталитическая функция цитохрома P450 является уникальным средством для включения полярных групп в системы, таких трудных для окисления, как насыщенные углеводороды. Включение гидроксильных групп особенно важно для метаболизма и выведения липофильных соединений, не содержащих их, поскольку полярные группы обеспечивают последующие реакции конъюгирования. С другой стороны, интенсивность окисления ферментов цитохрома P450 нередко превращает неактивный субстрат в химически реактивный, токсический метаболит (Guengerich F.P. // *Kluwer Academic/Plenum Press*, 2005. P. 377–531).

Лекарства и ксенобиотики у людей в первую очередь метаболизируются изоферментами семейств CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4 цитохрома P450. В организме человека, CYP3A4 является наиболее распространенной изоформой, и составляет в печени от от общего количества изоферментов цитохрома P450 около 30%, в то время как CYP1A2 составляет примерно 13%, CYP2A6 примерно 4%, CYP2C9 - 20%, CYP2D6 приблизительно 2% и CYP2E1 примерно 7% (Shimada T. et al. // *J.Pharmacol Exp Ther*. 1994. Vol. 270, № 1. P. 414-423.).

Около 90% метаболической активности зависит от 6 изоферментов: CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP2E1 (Wijnen P.A. et al. // *Aliment Pharmacol Ther*. 2007. Vol. 26, Suppl.2. P. 211- 219.).

Изоферменты цитохрома P450 широко распространены в живых организмах: от бактерий до млекопитающих. Эти изоферменты известны разнообразием катализируемых ими реакций и огромным количеством отличных друг от друга субстратов, на которые они воздействуют (Danielson, P.B. // *Curr. Drug Metab.* 2002. Vol. 3, № 6. P. 561-597.). Микросомальная система окисления в клетках печени осуществляет важнейшие функции биотрансформации эндогенных соединений и ксенобиотиков (Gonzalez F.J. et al. // *DNA.* 1987. Vol. 6, № 2. P. 149-161.; Archakov A.I., Bachmanova G.I. // London-New York-Philadelphia: Taylor & Francis, 1990. 435p.; Chen T.L. et al. // *Acta Anaesthesiol. Sin.* 1995. Vol. 33, № 3. P. 185-194.).

Доказано существование многочисленных изоформ цитохрома P-450 (Porter T.D., Coon M.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, № 21. P. 13469-13472.).

Одним из наиболее важных достижений является выявленный в человеческой популяции полиморфизм системы цитохрома P-450, определяющий особенности процессов окисления ксенобиотиков, в частности, лекарственных средств (Meyer U.A. et al. // *Pharmacol Ther.* 1990. Vol. 46, № 2. P.297-308.).

Цитохромы P-450 млекопитающих разделяются на два основных класса:

1) Микросомальные формы, которые окисляют эндогенные соединения, лекарства и другие ксенобиотики;

2) Микросомальные и митохондриальные стероидогенные цитохромы P-450, участвующие в катализе специфических реакций, приводящих к синтезу стероидов. Эта группа ферментов присутствует в специализированных тканях и не метаболизирует лекарства и другие чужеродные соединения (Gonzalez F.J. et al. // *DNA.* 1987. Vol. 6, № 2. P. 149-161).

Цитохромы P-450 образуют обширное надсемейство генов (1182 гена без учета аллельных вариантов, 800 выделенных белков) (Fischer M. et al. // *Bioinformatics.* 2007. Vol. 23, № 15. P. 2015-2017.).

Номенклатура цитохромов P-450 разработана в 1987 году и до настоящего времени не претерпела существенных изменений (Nebert D.W., Gonzalez F.J. // *Ann. Rev. Biochem.* 1987. Vol. 56, P. 945-993.).

Эта система базируется на гомологии их аминокислотных последовательностей. Все суперсемейство цитохромов подразделяется на семейства, подсемейства и индивидуальные цитохромы Р-450. С 1991 года цитохромы Р-450 (и кодирующие их гены) стали именовать как CYPs; аббревиатура CYP сопровождается арабской цифрой, обозначающей номер семейства, далее пишется заглавная буква, обозначающая подсемейство и, наконец, снова следует арабская цифра, уже обозначающая индивидуальный член семейства. Два цитохрома, которые обнаруживают не менее 40% сходства по аминокислотной последовательности, принадлежат к одному семейству. Члены подсемейства характеризуются более высокой степенью гомологии аминокислотной последовательности - 55 и более %. Между собой отдельные члены суперсемейства цитохромов по аминокислотной последовательности отличаются на 3 и более % (Anzenbacher P., Anzenbacherová E. // Cell. Mol. Life Sci. 2001. Vol. 58, №. 5-6. P. 737–747.).

#### 1.2.1. Изоферменты подсемейства CYP2C у крыс

У крыс подсемейство CYP2C включает ряд изоформ: CYP2C6, CYP2C7, CYP2C11, CYP2C12, CYP2C13, CYP2C22 и CYP2C23 (Nedelcheva V., Gut I. // Xenobiotica. 1994. Vol. 24, №. 12. P.1151-1175.).

Это подсемейство наиболее богато изоформами, которые участвуют в окислении дигидропиридинов и афлотоксина В1, а также в гидроксировании стероидов. Имеется половой диморфизм в экспрессии генов CYP2C у крыс. Иммунологические тесты показали, что экспрессия CYP2C12 выше у самок, чем в печени взрослых самцов, но такие различия отсутствуют у неполовозрелых и старых крыс. Изоформа CYP2C7, которая окисляет ретиноевую кислоту, преобладает у самок (Agrawal A.K., Shapiro B.H. // Drug Metab. Dispos. 1997. Vol.25, № 11. P.1249-1256.; Mugford C.A., Kedderis G.L. // Drug Metab Rev. 1998.Vol. 30, № 3. P. 441-498.).Изоформа CYP2C11 преобладает у самцов, достигая в гепатоцитах печени 50% от общего количества CYPs, а также



синтезируется в малых количествах в экстрапеченочных тканях, таких как почки и кишечник (Morgan E.T. et al. // *J Biol Chem.* 1985. Vol. 260, №22. P.11895-11898.)

#### 1.2.1.1. Изофермент цитохрома P450 CYP2C9 у крыс

Некоторые авторы считают, что CYP2C9 отсутствует у крыс (Stearns R.A. et al. // *Drug Metab.Dispos.* 1992. Vol.20, №2. P.281-287.; Nelson D.R. et al. // *DNA and Cell Biology.* 1993. Vol. 12, №1. P.1–51.), в то же время существуют работы, в которых авторы определяют данный изофермент у крыс. Например, авторы S. Zhang и соавт. и A. Soldner и соавт. определяли CYP2C9 в моче и плазме крови крыс. Первые по маркерному препарату толбутамид, а вторые по маркерному препарату лозартан (Soldner A. et al. // *J Pharm Biomed Anal.* 1998. Vol. 16, № 5. P.863-873.; Zhang S. et al. // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008. Vol. 871, № 1. P.78-89.).

Наличие данного CYP у крыс продемонстрировали и другие авторы. Y. Liu и соавт. определяли активность CYP2C9 у крыс по маркерному препарату – толбутамид (Liu Y. et al. // *J Chromatogr Sci.* 2013. Vol. 51, № 1. P. 26-32.). В работе Lewis показана гомологичность между некоторыми представителями подсемейства CYP2C крыс и людей. Так CYP2C8, CYP2C9 человека и CYP2C13, CYP2C11 крыс гомологичны на 68% и 77%, соответственно (Lewis D.F. et al. // *Drug Metab Rev.* 2002. Vol. 34, № 1-2. P. 69-82.).

#### 1.2.2. Изоферменты подсемейства CYP2C у приматов.

У обезьян подсемейство CYP2C представлено двумя изоформами, CYP2C20 и CYP2C43. Эти изоформы экспрессируются в печени и демонстрируют совпадение между собой нуклеотидной и аминокислотной последовательности на 83% и 77%, соответственно. При сравнении изоформы CYP2C43 с изоформами подсемейства CYP2C у человека установлено, что данная изоформа в большей степени совпадает с CYP2C9 (95% и 92% в нуклеотидных и аминокислотных последовательностях, соответственно), а затем с CYP2C19 (93% и 89%), с

CYP2C18 (86% и 80%) и с CYP2C8 (84% и 78%). У обезьян CYP2C43, а не CYP2C20, метаболизирует S-мефенитоин, являющимся субстратом CYP2C19 у человека. Напротив, CYP2C43 не способен метаболизировать толбутамид, который является субстратом CYP2C9 у человека. Поэтому, по всей видимости, CYP2C43 у обезьян функционально связан с CYP2C19 человека, но не с CYP2C9, хотя N-терминальная последовательность (первые 18 остатков) совпали для CYP2C43 и CYP2C9 (Matsunaga T. et al. // Drug Metab Pharmacokinet. 2002. Vol. 17, № 2. P.117-124.).

### 1.2.3. Изоферменты подсемейства CYP2C у человека

Существует три основных представителя подсемейства CYP2C: CYP2C8, CYP2C9 и CYP2C19. Четвертый представитель CYP2C18 был идентифицирован как копия мРНК, но по неизвестным причинам не эффективно транслируется в белок (Lofgren S. et al. // Drug Metab Dispos. 2008. Vol. 36, № 5. P.955–962.).

Все подсемейство CYP2C составляет около 30-40% от общего количества ферментов цитохрома P450 в печени, причем наиболее сильно выражена экспрессия у CYP2C9, затем у CYP2C8 и CYP2C19. Для трех изоформ подсемейства CYP2C (CYP2C8, CYP2C9 и CYP2C19) выявлена высокая гомологичность – более 82% идентичных аминокислотных последовательностей (Ferguson S.S. et al. // Mol Pharmacol. 2002. Vol. 62, № 3. P.737–746.; Pascussi J.M. et al. // Biochim Biophys Acta. 2003. Vol. 1619, № 3. P.243–253; Ferguson S.S. et al. // Mol Pharmacol. 2005. Vol. 68, № 3. P.747–757.).

Наиболее важную функцию из изоформ подсемейства цитохрома P450 CYP2C играют CYP2C9 и CYP2C19. Подсемейство CYP2C отвечает за биотрансформацию около 16% лекарственных препаратов, представленных на мировом рынке (Doherty M.M., Charman W.N. // Clin. Pharmacokinet. 2002. Vol. 41, № 4. P. 235 – 253.). Следовательно, изучение роли изоферментов подсемейства CYP2C в метаболизме ксенобиотиков занимает важное место при назначении лекарственных препаратов.

В человеческом организме основными изоформами подсемейства CYP2C являются CYP2C8 и CYP2C9, которые составляют 35% и 60% соответственно. Оставшиеся 5% составляют CYP2C18 – 4% и CYP2C19 - 1% (Romkes M.V. et al. // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30, № 13. P. 3247-3255.).

Изоформы CYP2C8, CYP2C9 и CYP2C19 расположены, главным образом, в гепатоцитах печени, где на их долю приходится приблизительно 20% от общего содержания цитохрома P450 (Zaphiropoulos P.G. // *Mol Cell Biol*. 1997. Vol. 17, № 6. P. 2985-2993.)

CYP2C8 обнаруживается в основном в гепатоцитах печени, но его мРНК была также обнаружена в почках, надпочечниках, мозге, матке, молочных железах, яичниках и двенадцатиперстной кишке (Klose T.S. et al. // *J Biochem Mol Toxicol*. 1999. Vol. 13, № 6. P. 289-295.). CYP2C8 участвует в метаболизме ретинола и ретиноевой кислоты, арахидоновой кислоты, бензо[а]пирена и в окислении противоракового препарата паклитаксела (Rahman A. et al. // *Cancer Res*. 1994. Vol. 54, № 21. P. 5543-5546.).

CYP2C19 обнаружен в печени и двенадцатиперстной кишке и участвует в метаболизме S-мефенитоина, омепразола и других ингибиторов протонной помпы, некоторых трициклических антидепрессантов таких как имипрамин, транквилизатора диазепам, некоторых барбитуратов и противомаларийных средств (Andersson T. et al. // *Pharmacogenetics*. 1992. Vol. 2, № 1. P. 25-31.; Adedoyin A. et al. // *Pharmacogenetics*. 1994. Vol. 4, № 1. P. 27-38.; Lapple F. et al. // *Pharmacogenetics*. 2003. Vol. 13, № 9. P. 565-575.). Не было отмечено различий в изоформах подсемейства CYP2C у мужчин и женщин (Reid J. et al. // *Clin Cancer Res*. 2002. Vol. 8, № 9. P. 2952-2962.).

#### 1.2.3.1. Изофермент цитохрома P450 CYP2C9 у человека

Изофермент CYP2C9 – белок, состоящий из 490 аминокислотных остатков. CYP2C9 находится в клетках различных органов, таких как: печень, почки, предстательная железа, яичники и двенадцатиперстная кишка. Наибольшая метаболическая активность изофермента CYP2C9 наблюдается в гепатоцитах

печени и клетках почек (Wijnen P.A. et al. // *Aliment Pharmacol Ther.* 2007. Vol. 26, Suppl.2. P. 211- 219.).

Следует отметить, что CYP2C9 стереоселективен и метаболизирует в основном *S*-стереоизомеры, например *S*-варфарин и *S*-аценокумарол (Verhoef T.I. et al. // *Br J Clin Pharmacol.* 2014. Vol. 77, №4. P.626-641.).

Изофермент CYP2C9 метаболизирует слабо кислые субстраты, имеющие водородную. Основными субстратами для CYP2C9 являются *S*-варфарин (Zhang Z.Y. et al. // *Thromb Res.* 1997. Vol. 88, № 4. P.389–398.), толбутамид и многие нестероидные противовоспалительные препараты, такие как целекоксиб, диклофенак, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, лорноксикам, мелоксикам, напроксен, пироксикам, супрофен, и теноксикам. Ингибиторами являются сульфаметоксазол, миконазол, флуконазол (Zhou S.F. et al. // *Curr Med Chem.* 2009. Vol. 16, № 27. P.3480-3675.).

Фактически, первое сообщение о лекарственном взаимодействии с участием CYP2C9 было сделано в 1963 г., в котором описывалось одновременное применение сульфаметоксазола и толбутамида, приводящее к тяжелой гипогликемии (Christensen L.K. et al. // *Lancet.*1963. Vol. 2, № 7321. P.1298–1301.).

#### 1.2.3.2. Генетический полиморфизм CYP2C9

Изоферменты обладают высоким полиморфизмом генов и ферментов, играющих ключевую роль в выведении большинства лекарств из организма человека. В настоящее время выявлено около 33-х вариантов CYP2C9, расположенных в пределах кодирующей области (Wang S.L. et al. // *Pharmacogenetics.* 1995. Vol. 5, №1. P.37-42.; Wang S.L. et al. // *Pharmacogenetics.* 1995. Vol. 5, №1. P.37-42.; Brockmüller J. et al. // *Pharmacogenomics.* 2000. Vol.1, № 2. P.125-51.; Home Page of the Human CytochromeP450 (CYP) Allele Nomenclature Committee, Available at. 2008. URL: <http://www.cypalleles.ki.se/>.).

Аллели CYP2C9 \*2 и CYP2C9\*3 присутствуют примерно у 25% представителей европеоидных расы, и менее распространены в негроидной и

монголоидных рассах (García-Martín E. et al. // *Mol Diagn Ther.* 2006. Vol. 10, № 1. P.29–40.).

При этом CYP2C9\*4 – аллель характерен только для японцев, а CYP2C9\*5 и CYP2C9\*6 аллели встречаются только среди афро-американцев (Schwarz U.I. // *Eur J Clin Invest.* 2003. Vol.33, №2. P. 23-30.).

Некоторые аллели встречаются единично, преимущественно у жителей африканского континента. Имеются данные о «новых» аллелях CYP2C9\*14 - CYP2C9\*19, открытых у жителей Азии (DeLozier T.C. et al. // *J Pharmacol Exp Ther.* 2005. Vol. 315, №3. P.1085-90.).

Определение полиморфизма изофермента цитохрома P450 CYP2C9 в различных этнических популяциях является важным для понимания различных клинических ответов на лекарственный препарат. В работе E.Varshney и соавт. исследователи определяли генетический полиморфизм CYP2C9 в Индийском национальном столичном округе и устанавливали соотношение фенотип-генотип. В результате проведенного исследования по генотипированию были найдены аллельные варианты CYP2C9 \*1/\*1, CYP2C9 \*1/\*2, CYP2C9 \*2/\*2. В то время как аллель CYP2C9 \*3 не был найден в исследовательской группе (Varshney E. et al. // *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2013. Vol.38, № 4. P. 275-281.).

Исследования *in vitro* достоверно показали, что аллели \*2 и \*3 связаны со значимыми, но сильно колеблющимися падениями истинного клиренса в зависимости от отдельного субстрата (Lee C.R. et al. // *Pharmacogenetics.* 2002. Vol. 12, № 3. P. 251–263.). Аллель \*3 более сильно влияет на снижение клиренса, чем аллель \*2 (до 90% для некоторых субстратов). Многочисленные исследования показали клиническую значимость полиморфизмов аллелей \*2 и \*3 для клиренса субстратных препаратов, назначенных перорально и проявление нежелательных лекарственных реакций, таких как гипогликемия из-за приема оральных противодиабетических препаратов, желудочно-кишечные кровотечения из-за приема НПВС, и серьезные кровотечения на фоне лечения варфарином (Zanger U. et al. // *Anal Bioanal Chem.* 2008. Vol. 392, № 6. P.1093–1108.).

Исследования *in vitro* показали, что ингибирование CYP2C9 зависит от генотипа. V. Kumar и соавт. сравнили степени ингибирования клиренсов флорбипрофена после перорального приема с помощью прототипичного ингибитора флуконазолом у здоровых добровольцев с различными генотипами \*1/\*1, \*1/\*3 и \*3/\*3 (Kumar V. et al. // Drug Metab Dispos. 2008. Vol. 36, № 7. P.1242–1248.).

Снижение кажущего клиренса флорбипрофена после совместного применения с флуконазолом зависело от дозы. Наблюдаемая степень межлекарственного взаимодействия снижалась вместе с метаболической активностью CYP2C9, вследствие большого количественного содержания аллелей CYP2C9\*3 без изменения содержания аллелей \*3/\*3 у испытуемых. Эти результаты позволяют предположить, что вклад остаточной активности \*3 аллеля (меньше 20-30 %) в общий клиренс флорбипрофена слишком мал, чтобы ингибировать флуконазол.

Следует отметить, что лучше всего изучены однонуклеотидные полиморфизмы CYP2C9 – «медленные» аллельные варианты. У носителей аллельных вариантов CYP2C9\*2 и CYP2C9\*3 низкая активность CYP2C9, что приводит к снижению скорости биотрансформации ЛС, метаболизирующихся данным изоферментом и к повышению их концентрации в плазме крови. Гетерозиготные носители аллельных вариантов CYP2C9\*1/\*2, CYP2C9\*1/\*3 и гомозиготные носители аллельных вариантов CYP2C9\*2/\*2, CYP2C9\*3/\*3, CYP2C9\*2/\*3 – «медленные» метаболизаторы по CYP2C9. Именно у этой категории пациентов наиболее часто возникают НЛР при применении ЛС, метаболизирующихся CYP2C9, таких как непрямые антикоагулянты, НПВП, пероральные сахароснижающие ЛС (производные сульфонилмочевины). В связи с этим, для повышения безопасности терапии, пациентам, относящимся к «медленным» метаболизаторам по CYP2C9, необходимо либо выбрать другие ЛС, в метаболизме которого не принимает участие CYP2C9, либо назначить меньшую дозу ЛС – субстрата CYP2C9 (Donner K.M. et al. // J Hypertens.2009. Vol. 27, №10. P.2001-2009.; Zhou S.F. et al. // Toxicology. 2010. Vol. 278, №2. P.165-88.; He S.M. et

al. // *Curr Med Chem*. 2011. Vol.18, № 5. P.667-713.).

Есть данные о влиянии полиморфизма гена CYP2C9 на фармакокинетику лекарственных препаратов – субстратов CYP2C9. Наиболее хорошо изучено влияние аллельных вариантов CYP2C9\*2 и CYP2C9\*3. В литературе описаны случаи, в которых показано влияние полиморфизма гена CYP2C9 на фармакокинетику лозартана (оценивается соотношение лозартана и его активного метаболита). В своем исследовании К. Sekino и соавт. показали, что у добровольцев с генотипом CYP2C9\*1/\*3 отношение концентрации E-3174 к концентрации лозартана через 6 часов после приема лозартана внутрь в дозе 25 мг/кг было достоверно меньше, чем у лиц с генотипом CYP2C9\*1/\*1 (Sekino K. et al. // *Eur J Clin Pharmacol*. 2003. Vol. 59, № 8-9. P.589-592.).

У. Yasar и соавт. в своей работе показали, что у гетерозиготных и гомозиготных носителей аллельных вариантов CYP2C9\*2 и CYP2C9\*3 (генотипы CYP2C9\*1/\*3, CYP2C9\*1/\*2, CYP2C9\*3/\*3 и CYP2C9\*2/\*2) после перорального приема лозартана максимальная концентрация E-3174 оказалась статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ), чем у лиц, не несущих данные аллельные варианты. Кроме того, у гомозиготных носителей аллельного варианта CYP2C9\*3 количество E-3174 в моче, которую собирали в течение 8 часов после приема лозартана в 40 раз ниже ( $p < 0,01$ ), чем у гомозиготных лиц с генотипом CYP2C9\*1. Из полученных данных авторы делают вывод, что носительство аллельных вариантов CYP2C9\*2 и CYP2C9\*3 приводит к нарушению образования активного метаболита лозартана за счет снижения активности CYP2C9. К одним из недочетов данного исследования можно отнести то, что в нем принимали участие только здоровые добровольцы, поэтому авторам не удалось найти связь между выявленными различиями в метаболизме лозартана и его гипотензивным действием. Из этого следует, что клиническое значение влияния генетического полиморфизма CYP2C9 на фармакокинетику лозартана может быть продемонстрировано только в исследованиях на больных с артериальной гипертензией (Yasar U. et al. // *J Clin Pharmacol*. 2002. Vol. 54, №2. P.183-185.).

### 1.2.3.3. Взаимодействие лекарственных веществ - субстратов CYP2C9 с пищей, лекарственными и фитопрепаратами

Лекарственные вещества могут вступать во взаимодействие с пищей, что может существенно влиять на эффективность и безопасность фармакотерапии. Компоненты некоторых продуктов влияют на метаболизм ЛС. Особенно много работ, посвященных фруктовым сокам, в том числе и по влиянию на активность CYP2C9 (Сычев Д.А. и др. // Клиническая фармакология и фармакоэкономика. 2008. Т.1, №2. С. 57-67.). В некоторых исследованиях обнаружено, что клюквенный сок влияет на фармакокинетику варфарина. Имеются данные о возникновении опасных для жизни кровотечений при совместном применении варфарина с клюквенным соком. Причиной данного взаимодействия является то, что клюквенный сок ингибирует CYP2C9 – главный изофермент биотрансформации варфарина (Grant P. // J Heart Valve Dis. 2004.Vol. 13, №1. P. 25-6.; Mergenhagen K.A., Sherman O. // Am J Health Syst Pharm. 2008. Vol. 65, № 22. P.2113-6.) Так, клюквенный сок, являясь ингибитором CYP2C9, повышает концентрацию варфарина в крови и это приводит к чрезмерной гипокоагуляции и, как следствие, кровотечениям. В своей работе D. Pham и A. Pham сообщают, что хотя прием клюквенного сока совместно с варфарином увеличивал значение показателя системы свертывания крови, однако нельзя однозначно утверждать, что единственной причиной этого могло стать употребление клюквенного сока (Pham D.Q., Pham A.Q. //Am J Health Syst Pharm. 2007. Vol. 64, № 5. P.490–494.). Таким образом, для полной оценки взаимодействия клюквенного сока и варфарина недостаточно данных, и в тоже время необходимо сообщать пациентам о возможном клиническом взаимодействии клюквенного сока и варфарина при их совместном приеме.

Есть также работы, посвященные и другим субстратам цитохрома CYP2C9. К. Ushijima и соавт. показали, что хоть клюквенный сок и угнетает метаболизм диклофенака, но только в случае *in vitro* и практически не влияет на его фармакокинетику у здоровых добровольцев (Ushijima K. et al. // J Clin Pharmacol. 2009. Vol. 68, №2. P.194-200.)



Имеются данные, показывающие влияние других соков на изоформу CYP2C9. Так, Nagata M. и соавт. в опытах *in vivo* на крысах изучили влияние гранатового сока на активность CYP2C9. Исследование проводили в два этапа. На первом этапе на микросомах печени было показано, что гранатовый сок является мощным ингибитором CYP2C9. Кроме этого, авторы исследовали эффект гранатового сока на фармакокинетику толбутамида, являющимся субстратом CYP2C9, у крыс. В результате экспериментов сделан вывод, что гранатовый сок ингибировал всасывание толбутамида в кишечнике крыс, не влияя на его метаболизм в печени (Nagata M. et al. // Drug metabolism and disposition. 2007. Vol. 35, №2. P.302–305.).

Также имеются данные по влиянию ананасового сока на активность CYP2C9 *in vitro*. В результате проведенного исследования M. Hidaka и соавт. обнаружили ингибирующий эффект ананасового сока на активность CYP2C9 *in vitro*, которую оценивали по фармакокинетики диклофенака и толбутамида. Ингибирующий эффект сока достигался за счет торможения гидроксилирования диклофенака и толбутамида из-за цистеиновой протеазы – бромелаина, содержащейся в ананасовом соке (Hidaka M. et al. // Biosci Biotechnol Biochem. 2008. Vol. 72, № 2. P.406-11.).

В связи с этим возникает необходимость в повышении информирования врачей и пациентов об опасном влиянии фруктовых соков на концентрацию некоторых ЛС в крови при совместном их применении.

Помимо соков, на фармакокинетику препаратов могут влиять и компоненты пищи. Например, G. Wang и соавт. в своем исследовании оценили влияние соевого экстракта на фармакокинетику лозартана и его активного метаболита E-3174. Было показано, что соевый экстракт является индуктором CYP2C9 и CYP3A4 *in vitro*.

Для определения фармакокинетического взаимодействия между лозартаном и соевым экстрактом *in vivo* исследование проводили на здоровых женщинах-добровольцах.

Восемнадцать здоровых китайских женщин-добровольцев принимали лозартан в дозе 50 мг с соевым экстрактом и без него. Концентрации в плазме крови лозартана и E-3174 были определены с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в течение 12 и 24 часов, соответственно. На 8 день через 21 день исследования, после 7-дневного периода отмывки, каждый доброволец принимал две таблетки Генистеин Соевый комплекс 1000 мг внутрь после еды, дважды в день, в течение 14 дней. На 22 день все добровольцы получали лозартан 50 мг и снова отбирались образцы крови.

В результате величины метаболических отношений с приемом и без приема соевого экстракта составили  $0,21 \pm 0,05$  и  $0,23 \pm 0,05$ , соответственно, где разница не была статистически значимой ( $p = 0,22$ ).

Из этого авторы делают вывод, что соевый экстракт не влияет на фармакокинетику лозартана (Wang G. et al. // *Ann Pharmacother.* 2009. Vol. 43, №6. P. 1045-1049.).

Взаимодействие ЛС с лекарственными растениями, входящими в состав фитопрепаратов, в настоящий момент активно изучается. Лекарственные растения чаще всего применяются врачами у детей, пожилых людей, беременных женщин. Однако не всегда данные препараты назначаются лечащим врачом, часто пациент начинает прием самостоятельно. В связи с этим возрастает необходимость в клинических исследованиях, посвященных изучению влияния лекарственных растений на фармакокинетику и фармакодинамику некоторых ЛС (Gurley J. et al. // *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2002. Vol.7 2, №3. P.276-287.).

Взаимодействие ЛС с компонентами лекарственных растений может происходить на уровне всасывания, распределения, метаболизма и выведения. Но наибольшее значение имеет влияние компонентов на уровне всасывания и метаболизма ЛС. Фармакокинетическое взаимодействие ЛС с компонентами лекарственных растений может происходить по двум направлениям – индукция и ингибирования ферментов биотрансформации. Существует ряд работ, посвященных данному виду взаимодействия.

В своем исследовании Z. Wang и соавт. продемонстрировали, что зверобой является мощным индуктором изофермента цитохрома P450 CYP3A4, при этом не оказывал никакого влияния на активность ферментов CYP1A2, CYP2C9 и CYP2D6 (Wang Z. et al. // Clin Pharmacol Ther. 2001. Vol. 70, №4. P. 317-326.). Однако в работе других авторов было показано, что гиперфорин, являющийся компонентом экстракта зверобоя, увеличивал активность CYP3A4 и CYP2C9, но также не оказывал никакого влияния на CYP1A2 и CYP2D6 (Komoroski B.J. et al. // Drug Metab Dispos. 2004. Vol. 32, №5. P.512-518.)

J. Gorski и соавт. в своей работе показали способность эхинацеи ингибировать CYP1A2 и CYP2C9 в печени, CYP3A4 в стенке кишечника. Из этого авторы делают вывод о том, что эти свойства эхинацеи могут иметь клиническое значение при ее совместном применении с ЛС – субстратами данных изоформ (Gorski J.C. et al. // Clin Pharmacol Ther. 2004. Vol. 75, №1. P.89-100.).

### **1.3. Маркерный препарат - субстрат изофермента CYP2C9- лозартан**

Лозартан является первым пероральным антагонистом ангиотензивных рецепторов без свойств агониста (Dickstein K. et al. // Expert Opin Investig Drugs. 1998. Vol. 7, №11. P.1897-1914.).

После перорального приема, лозартан быстро всасывается, достигая максимальной концентрации ( $C_{max}$ ) через 1-2 часа. После приема внутрь примерно 14% от дозы лозартана превращается в метаболит лозартановую кислоту (Е-3174), который в 10-49 раз активнее, чем исходное соединение и его период полувыведения колеблется от 6 до 9 часов (Sica D.A. et al. //Clin Pharmacokinet. 2005. Vol. 44, №8. P. 797-814.).

Биодоступность лозартана составляет 35%, вероятно это связано с «эффектом первопрохождения через печень». Лозартан и его фармакологически активный метаболит Е-3174 имеют относительно небольшой объем распределения ( $V_d/F$ ). Время полувыведения ( $t_{1/2el}$ ) лозартана колеблется от 1,5 до 2,5 часов – это фаза, которая связана с распределением препарата в организме по внутренним органам.

Затем наступает фаза элиминации, которая продолжается до 24 часов. Для E-3174  $t_{1/2el}$  от 6 до 9 часов (Lo M.W. et al. // Clin Pharmacol Ther. 1995. Vol. 58, №6. P.641-649.).

### 1.3.1. Фармакокинетика и межлекарственные взаимодействия лозартана у крыс

В работе Yang S. и соавт. проведено исследование, в котором оценили эффект тиклопидина на биодоступность и фармакокинетику лозартана у крыс, чтобы изучить потенциальное межлекарственное взаимодействие двух лекарственных препаратов. Из литературных источников известно, что обычно фармакокинетику лозартана у крыс изучают после его орального введения в дозах 3-10 мг/кг. Поэтому в данном исследовании была использована доза лозартана 9 мг/кг. Из литературных данных также известно, что фармакокинетика лозартана схожа у крыс и у людей. В обоих случаях в плазме крови был обнаружен метаболит E-3174. Абсолютная биодоступность лозартана составляла 31,5%-38,2% у крыс и 33% у людей. Выведение с мочой лозартана в течение 24 ч после орального применения составляло примерно 0,3% от дозы у крыс и 5,0% людей, соответственно, что указывает на небольшой почечный клиренс относительно общего клиренса. Эти данные подтверждают, что крыса – подходящая модель для изучения фармакокинетики лозартана (Yang S. et al. // Acta Pharmacologica Sinica. 2011. Vol. 32, № 7. P.967–972.; Yoshitani T. et al. // Biol .Pharm.Bull. 2002. Vol. 25, № 8. P.1077–1083.).

Тиклопидин (в дозе 10 мг/кг), введенный орально в сочетании с лозартаном, значительно увеличил площадь под фармакокинетической кривой (AUC) последнего (до 65,0%), из чего следует, что тиклопидин может эффективно ингибировать метаболизм лозартана в кишечнике и/или печени. В то же время при совместном введении лозартана (в дозе 10 мг/кг) с тиклопидином AUC метаболита E-3174 также значительно увеличилась (до 41,8%). E-3174 выводится почками (за счет 55% клиренса), и непечечным путем. Несмотря на то, что площадь под кривой метаболита после совместного применения с тиклопидином увеличилась, метаболическое отношение ( $AUC_{E-3174} / AUC_{losartan}$ ) уменьшилось

незначительно ( $P > 0.05$ ) по сравнению с контрольной группой. После введения лозартана внутрь площадь под кривой метаболита была больше, чем у исходного соединения благодаря низкому значению клиренса метаболита (Tamaki T. et al. // *Cardiovasc Drug*. 1997. Vol. 15, № 2. P.122–136.; Yang S. et al. // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011. Vol. 32, № 7. P.967–972.). Аналогичные результаты были получены ранее, где показано, что площадь под кривой и период полувыведения метаболита выше, чем у лозартана как у крыс, так и у человека (Munafo A. et al. // *Clin Pharmacol Ther*. 1992. Vol. 51, № 5. P. 513–521.; Lo M.W. et al. // *Clin Pharmacol Ther*. 1995. Vol. 58, №6. P.641-649.).

Рекомбинантные формы изоферментов CYP2C9 и CYP3A4 в эксперименте были подвержены ингибирующему эффекту тиклопидина. Тиклопидин оказывал ингибирующий эффект на CYP2C9 и CYP3A4 с  $IC_{50}$  26.0 и 32.3  $\mu\text{mol/L}$ , соответственно. Полученные результаты показали, что AUC лозартана значительно увеличилась после его введения внутрь совместно с тиклопидином в дозе 10 мг/кг. В то же время в опытах *in vitro* ингибирование лозартана тиклопидином было слабо выражено. Хотя эксперименты *in vitro* полезны для изучения ингибиторных механизмов, они ограничены, потому что условия проведения эксперимента могут не точно соответствовать условиям *in vivo*. Таким образом, могут происходить некоторые расхождения между данными *in vivo* и *in vitro*. В исследовании, в котором использовались микросомы печени человека и рекомбинантные изоферменты человека, было показано что тиклопидин является мощным, конкурентным ингибитором и CYP2C19 и CYP2D6, но слабым ингибитором CYP2C9 и CYP3A4 (Ko J. et al. // *Br J Clin Pharmacol*. 2000. Vol. 49, № 4. P.343–351.).

Вероятно существуют некоторые различия в активности изоферментов CYP2C9 и CYP3A4 у крыс и у людей (Cao X. et al. // *Pharm Res*. 2006. Vol. 23, № 8. P.1675–1686.). Белковая гомология между CYP2C9 и CYP3A4 у крыс и людей очень сходна, 73 и 77%, соответственно (Lewis D. / Bristol: Taylor & Francis, 1996. P.115–167.).

Например,  $AUC_{\text{losartan}}$  значительно увеличивались, а  $AUC_{\text{E-3174}}$  уменьшалась в случае введения буколома, ингибитора CYP2C9 и у крыс и у людей (Kobayashi M. et al. // *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008. Vol 23, №2. P.115-119.).

Полученные результаты подтверждают, что изоформы крыс с очень похожими ферментативными свойствами на CYP2C9 человека могли бы быть вовлечены в метаболический клиренс лозартана, хотя у крыс (по мнению некоторых авторов) нет изоформ CYPs ортологичных человеческому CYP2C9. Из этого авторы делают выводы, что значительное увеличение AUC лозартана после перорального, сочетанного введения лозартана и тиклопидина (10 мг/кг) может быть объяснено ингибированием метаболизма лозартана в результате влияния тиклопидина на подсемейства CYP2C и CYP3A в тонком кишечнике и/или в печени (Yoshitani T. et al. // *Biol .Pharm.Bull.* 2002. Vol. 25, № 8. P.1077–1083.; Yang S. et al. // *Acta Pharmacologica Sinica.* 2011. Vol. 32, № 7. P.967–972.).

D. Choi и соавт. изучали влияние мироцетина, который является антиоксидантом, на фармакокинетику лозартана и его метаболита у крыс при совместном их применении. Оказалось, что при одновременном введении этих препаратов мироцетин на 20% снижает соотношение E-3174/ лозартан, ингибируя CYP2C9 (Choi D.H. et al. // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2010. Vol. 62, №7. P.908-914.).

### 1.3.2. Метаболизм, фармакокинетика и межлекарственные взаимодействия

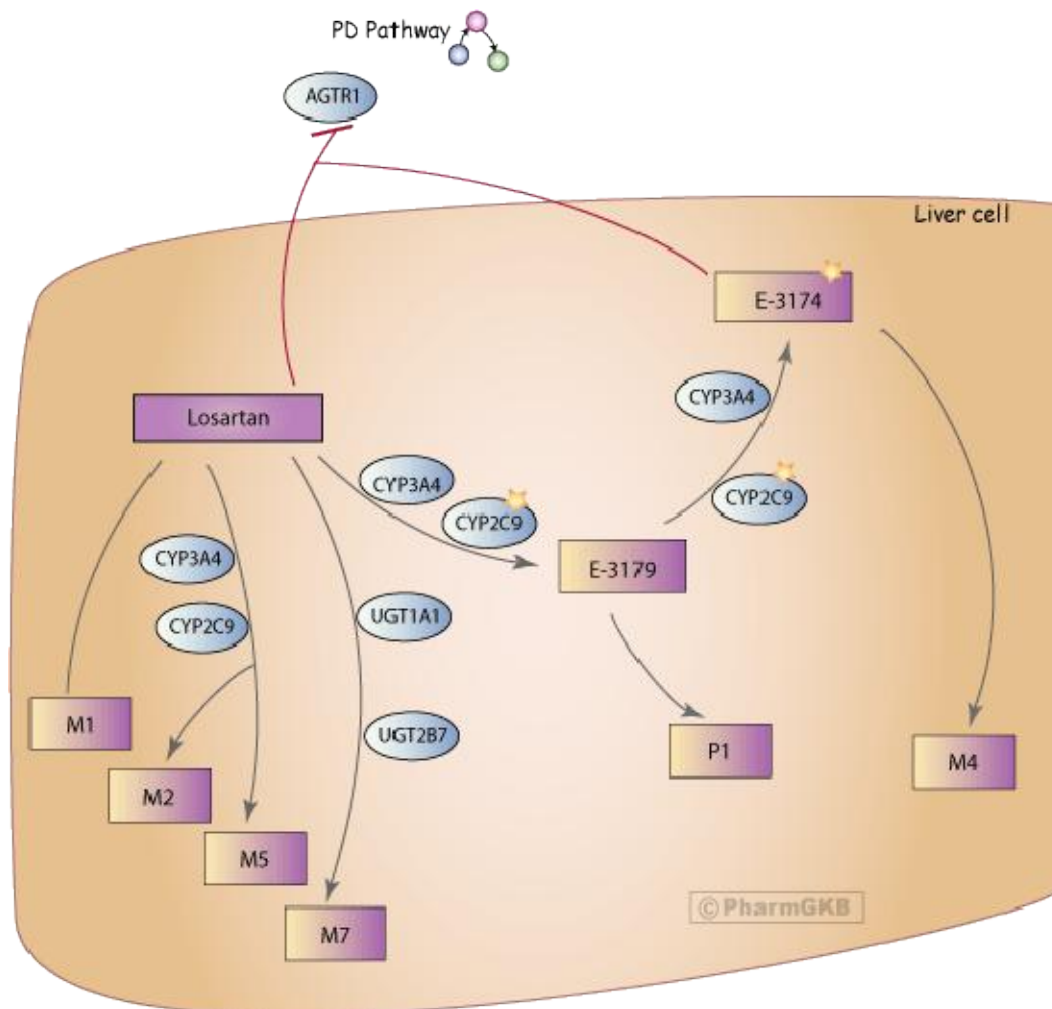
#### лозартана у людей

##### 1.3.2.1. Метаболизм лозартана

Лозартан в основном метаболизируется изоферментами цитохрома P450 CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C10. В целом, лозартан имеет благоприятный межлекарственный профиль (*drug-drug interaction profile*), о чем свидетельствует отсутствие клинически значимых взаимодействий между этим препаратом и рядом ингибиторов и индукторов системы изоферментов цитохрома P450. Лозартан не вступает в межлекарственные взаимодействия с гидрохлортиазидом,

варфарином и дигоксином (Sica D.A. et al. // Clin Pharmacokinet. 2005. Vo.1 44, №8. P. 797-814.).

На рисунке 1 представлена схема метаболизма лозартана, отражающая три основных направления: окисление, гидроксилирование и глюкуронирование.



**Рисунок 1** Схема метаболизма лозартана у человека

Превращение лозартана в метаболит происходит через окисление спирта в карбоновую кислоту. Биотрансформация катализируется с помощью изоферментов цитохрома P450 CYP3A4 и CYP2C9 с образованием E-3179 (промежуточного альдегида). Кроме промежуточного альдегида также может образоваться гидроксилированный неактивный метаболит P1. Исследования *in vitro* с гомогинатом печени человека показали, что кроме образования основного активного метаболита E-3174, лозартан интенсивно метаболизируется, превращаясь в пять других неосновных метаболитов, которые обладают гораздо меньшей

активностью, чем исходное соединение (M1, M2, M4, M5, M7) (Stearns R.A. et al. // Drug Metab.Dispos. 1992. Vol.20, №2. P.281-287.)

В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что лозартан метаболизируется до E-3174 с помощью CYP3A4 и CYP2C9. Ферменты, катализирующие эти реакции идентифицировали, изучая метаболизм каждого субстрата в присутствии: 1) ингибиторов селективных по отношению к определенным изоформам CYP, 2) рекомбинантных CYPs, выделенных из печени человека и 3) антител, специфичных к определенным изоформам. Характеристика изоферментов, отвечающих за метаболизм лозартана *in vitro*, предоставила информацию, необходимую для дизайна клинического исследования по оценке межлекарственных взаимодействий *in vivo* (Stearns R.A. et al. // Drug Metab Dispos. 1995. Vol.23, №2. P.207-15.; Yun C.H. et al. // Drug Metab Dispos. 1995. Vol. 23, №2. P. 285-289.).

#### 1.3.2.2. Фармакокинетика и межлекарственные взаимодействия лозартана

Фармакокинетика лозартана и метаболита E-3174 линейна, дозозависима и существенно не изменяется при повторных приемах. Нет никаких клинически значимых эффектов возраста, пола или расы на фармакокинетику лозартана. В то же время требуется корректировка доз у пациентов с умеренными нарушениями функции печени или почечной недостаточности. Лозартан и его метаболит не удаляются при гемодиализе.

Существует большое количество исследований, где описано влияние лекарственных препаратов на фармакокинетику лозартана (субстрат CYP2C9).

В 2007 году М. Kobayashi и соавт. провели исследование, в котором оценили влияние буколома, ингибитора CYP2C9, на фармакокинетику лозартана и его метаболита E-3174 на добровольцах. Исследование проводили в двух группах добровольцев. В первой группе добровольцы принимали перорально однократно лозартан в дозе 25 мг/кг, а во второй лозартан в дозе 25 мг/кг давали после многократного перорального приема буколома в дозе 300 мг в течение 7 дней. В результате в первой группе  $C_{max}$  и AUC лозартана были значительно



ниже, чем в группе, где давали лозартан после приема буколома (Kobayashi M. et al. // Drug Metab Pharmacokinet. 2008. Vol 23, №2. P.115-119.). Это свидетельствует об ингибирующем эффекте буколома на данную изоформу.

У. Хан и соавт. в своей работе показали влияние силимарина на фармакокинетику лозартана на добровольцах. Двенадцать здоровых мужчин с известным генотипом CYP2C9 (шесть CYP2C9\*1/\*1 и шесть CYP2C9\*1/\*3) были набраны в двухфазное рандомизированное перекрестное исследование. Фармакокинетику лозартана и E-3174 изучали до и после 14-дневного применения 140 мг силимарина три раза в день. В результате AUC лозартана значительно увеличилась после 14-дневного приема силимарина добровольцами с генотипом CYP2C9 \*1/\*1, но не с генотипом CYP2C9 \*1/\*3. А площадь под фармакокинетической кривой метаболита E-3174 значительно снизилась после предварительного приема силимарина в обоих случаях (CYP2C9\*1/\*1 и CYP2C9\*1/\*3). Метаболическое отношение (E-3174/лозартан) значительно снизилось после 14-дневного приема силимарина у пациентов с CYP2C9\*1/\*1 генотипом ( $p < 0,05$ ), но не с генотипом CYP2C9\*1/\*3 ( $p = 0,065$ ). Авторы делают вывод о том, что метаболизм лозартана до E-3174 ингибируется силимарином, а величина данного лекарственного взаимодействия у людей зависит от разных генотипов CYP2C9 (Han Y. et al. // Eur J Clin Pharmacol. 2009. Vol. 65, №6. P.585-591.).

Другими авторами было проведено исследование, в котором они оценивали эффект флувастатина - ингибитора CYP2C9, на фармакокинетику лозартана. Лозартан метаболизируется двумя изоформами CYP2C9 и CYP3A4. Исследование взаимодействия с ингибиторами CYP3A4 не показало существенных изменений в фармакокинетики лозартана или его метаболита E-3174. Авторы оценили изменения в фармакокинетики лозартана и E-3174 при введении его отдельно и одновременно с флувастатином, ингибитором CYP2C9. Открытое, перекрестное исследование было проведено на 12 здоровых добровольцах, которые принимали только лозартан и лозартан в комбинации с флувастатином. Лозартан принимали в дозе 50 мг, флувастатин в дозе 40 мг. Авторы обнаружили, что флувастатин

существенно не влияет на  $AUC_{0-24}$  или  $t_{1/2el}$  лозартана и его метаболита Е-3174. Ингибирование метаболизма лозартана возможно связано как с CYP2C9, так и CYP3A4 (Meadowcroft A.M. et al. // J Clin Pharmacol. 1999. Vol. 39, №4. P.418-424.).

Среди наиболее широко применяемых индукторов лозартана является рифампицин. К. Williamson и соавт. в своей работе оценили влияние рифампицина и эритромицина на фармакокинетику лозартана. На 10 здоровых добровольцах было изучено влияние ингибирования CYP3A4 и неспецифической индукции изоферментов цитохрома P450 на фармакокинетику лозартана. Испытуемые подверглись трем однонедельным исследованиям. Каждое исследование отделено от другого 6 дневным отмывочным периодом. В течение 1-й недели испытуемые получали однократно 50 мг лозартана (утром), в течение 2-й недели - 50 мг лозартана однократно и 500 мг эритромицина 4 раза в день, в течение III-й недели - 50 мг лозартана однократно и 300 мг рифампицина дважды в день. На 8 день каждого исследования в течение 32 ч у испытуемых отбирали пробы крови, определяли концентрации лозартана и Е-3174 и рассчитывали фармакокинетические параметры исследуемых веществ. Как показали проведенные исследования, рифампицин уменьшал  $AUC_{0-24}$  лозартана на 35% и  $AUC_{0-24}$  его метаболита Е-3174 на 40%. Клиренс (CL/F) лозартана увеличивался на 44% ( $p=0,0001$ ). Период полувыведения обоих соединений уменьшался на 50% ( $p < 0,005$ ). В то же время эритромицин не оказывал существенного влияния на  $AUC_{0-24}$  или  $t_{1/2el}$  лозартана и его метаболита Е-3174. Авторы делают вывод, что рифампицин является мощным индуктором CYP2C9, метаболизирующего лозартан. Так как в случае приема эритромицина наблюдается минимальный ингибирующий эффект, авторы делают вывод, что CYP3A4 по-видимому играет незначительную роль в метаболизме лозартана до Е-3174. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить вклад других изоферментов, в частности CYP2C9, на фармакокинетику лозартана (Williamson K.M. et al. // Clin Pharmacol Ther. 1998. Vol. 63, №3. P. 316-23.).

Одним из наиболее сильных ингибиторов CYP2C9 является флуконазол.

D. Kazierad и соавт. в своей работе показали влияние флуконазола на фармакокинетику эпросартана и лозартана. Исследование продолжалось 20 дней. Шестнадцать здоровых мужчин (I группа) получали 300 мг эпросартана каждые 12 часов и шестнадцать здоровых мужчин (II группа) получали 100 мг лозартана каждые 24 часа во все дни исследования с 1-го до 20-го. Все 32 добровольца получали 200 мг флуконазола каждые 24 часа, начиная с 11 дня, вплоть по 20-й день. На 10-й и 20-й день у всех добровольцев в дискретные временные интервалы были отобраны образцы крови для измерения концентраций эпросартана, лозартана и E-3174. В результате не было найдено существенных различий в площадях под фармакокинетической кривой эпросартана при применении его самостоятельно и совместно с флуконазолом. Однако после одновременного приема флуконазола и лозартана, AUC и  $C_{max}$  последнего были значительно увеличены на 66% и 30%, соответственно, по сравнению со значениями лозартана без приема флуконазола. AUC и  $C_{max}$  для метаболита E-3174 были значительно снижены на 43% и 56%, соответственно, после приема лозартана с флуконазолом. Авторы делают вывод о том, что флуконазол значительно увеличивает AUC лозартана и ингибирует образование его активного метаболита - E-3174. Но на фармакокинетику эпросартана флуконазол не оказывает никакого влияния (Kazierad D.J. et al. // Clin Pharmacol Ther. 1997. Vol. 62, №4. P. 417-25.).

#### **1.4. Основные рекомендации по изучению межлекарственных взаимодействий новых лекарственных средств *in vivo***

В последнее время возросла потребность в изучении биотрансформации для оценки межлекарственного взаимодействия. Существует мнение экспертов, что пути биотрансформации нового ЛС должны быть изучены в ходе его разработки, и что его взаимодействие с другими ЛС на уровне биотрансформации должны исследоваться на предмет возможных клинических последствий в виде снижения эффективности или развития нежелательных лекарственных реакций (НЛР) при межлекарственном взаимодействии. Мнение о необходимости изучения

биотрансформации и транспортеров новых ЛС основано на международном опыте снятия с регистрации ряда ЛС в связи с многочисленными случаями развития серьезных нежелательных реакций, причиной которых являлись межлекарственные взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров. Исследования биотрансформации и транспортеров необходимы для регистрации всех новых лекарственных средств, содержащих новую молекулу (для синтетических и иммунобиологических ЛС) или новые компоненты (для ЛС природного происхождения). Также эти исследования нужны для перерегистрации ЛС, если такие данные отсутствовали (Сычев Д.А. // М.: 2009. 32 с.). Изучение биотрансформации ЛС должно соответствовать определенной последовательности. Сначала необходимо провести исследования *in vitro*.

Если по данным исследования *in vitro* ЛС окажется субстратом и / или ингибитором / индуктором изоферментов цитохрома Р-450, то для подтверждения этих фактов, необходимо проведение исследований *in vivo* у человека. Если ЛС, исходя из своих фармакологических эффектов, может часто применяться в комбинации с другими ЛС (например, в составе комбинированных схем лечения онкологических заболеваний, ВИЧ-инфекции, туберкулеза и т.д.), и возможно при этом межлекарственное взаимодействие на уровне биотрансформации и транспортеров, то необходимо проведение клинического исследования, для разработки тактики по изменению режимов дозирования ЛС или других вариантов лечения пациентов в подобных ситуациях. Если же информация о биотрансформации и транспотерах ЛС по результатам исследований *in vivo* и *in vitro*, стала известна уже после проведения клинических исследований ЛС, то рекомендуется ретроспективно проанализировать результаты этих клинических исследований на предмет выявления случаев межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров, что позволит выявить его клинические последствия, а также тактику по изменению режимов дозирования ЛС или других вариантов лечения пациентов в подобных ситуациях. В этих случаях проведение дополнительных клинических исследований не требуется.

Взаимосвязь между результатами исследований биотрансформации и транспортеров ЛС *in vitro* и *in vivo*, до конца не выяснена. Тем не менее, исследования *in vitro*, могут служить скрининговым механизмом для исключения роли биотрансформации в фармакокинетике ЛС, а также ингибирующих / индуцирующих его свойств по отношению к изоферментам цитохрома Р-450 (The Merck Manual.2012.).

Кроме исследований биотрансформации ЛС *in vitro*, для подтверждения роли того или иного изофермента цитохрома Р-450 / транспортера в биотрансформации изучаемого ЛС и /или ингибирующих / индуцирующих свойств изучаемого ЛС по отношению к тому или иному изоферменту цитохрома Р-450 / транспортеру, необходимо проведения исследований *in vivo*. Основной целью исследования *in vitro* является вычисление кинетических параметров, которые могут быть использованы в рамках прогнозирования стратегий для оценки возможных последствий *in vivo*. Наиболее распространенным параметром *in vivo*, используемым для оценки межлекарственных взаимодействий является площадь под фармакокинетической кривой «концентрация ЛВ-время» (AUC) (Yao C., Levy R.H. // J Pharm Sci. 2002. Vol. 91, № 9. P. 1923–1935.).

Исследования *in vivo* представляют собой фармакокинетические исследования соответствующего дизайна. Совместно с информацией, полученной в ходе исследований *in vitro*, исследования *in vivo* могут быть основным фундаментом разработки инструкции (или коррекции уже имеющейся) по применению ЛС, что может помочь избежать возникновения потребности в дальнейших клинических исследованиях (Baillie G.R. et al. // Med facts. - Bone: Care International, 2004. 69 p.).

#### 1.4.1. Дизайн исследований межлекарственных взаимодействий *in vivo*

Исследование биотрансформации *in vivo* необходимо проводить после исследований *in vitro*.

В «Medfacts Pocket Guide of Drug Interactions» говорится о том, что использование лабораторных животных *in vivo* для исследования системы

ингибирования / индукции, где уровни изоформ цитохрома P450 контролируются последующими повторениями доз новых субстанций, может быть полезным на ранних стадиях разработки ЛС. Так же в документе подчеркивается, что предсказывать результаты исследований для человека при использовании данных, полученных на животных, нужно предельно осторожно по причине межвидовых различий (Bailie G.R. et al. // Med facts. - Bone: Care International, 2004. 69 p.).

Исследования межлекарственных взаимодействий на уровне биотрансформации *in vivo* у человека разработаны для проведения сравнения фармакокинетики ЛС-субстрата при наличии или отсутствии взаимодействующего ЛС.

Рекомендуется выбрать один из двух вариантов дизайна исследования:

1) Перекрестное исследование. Используется одна группа участников исследования. Участникам исследования однократно назначается ЛС-субстрат и проводится изучение его фармакокинетики, затем этой же группе в течение 8 дней назначается взаимодействующее ЛС (ингибитор / индуктор), после чего на 7-й день применения взаимодействующего ЛС (ингибитора / индуктора) повторно назначается ЛС-субстрат и повторно проводится изучение его фармакокинетики;

2) Параллельный дизайн. Используются 2 группы участников исследования (основная и контрольная), сформированных путем рандомизации. Первой группе (основная группа) в течение 8 дней назначается взаимодействующее ЛС (ингибитор / индуктор), после чего на 7-й день применения взаимодействующего ЛС (ингибитора / индуктора) однократно назначается ЛС-субстрат и проводится изучение его фармакокинетики. Второй группе (контрольная группа), которым не назначалось взаимодействующее ЛС (ингибитор / индуктор) однократно назначается ЛС-субстрат и проводится изучение его фармакокинетики.

При планировании исследований *in vivo*, должны также учитываться следующие положения:

1) Следует отметить, что для ЛС-субстратов с узким терапевтическим диапазоном, следует изучить влияние взаимодействующего ЛС (ингибитора /

индуктора) не только на его фармакокинетику при однократном назначении, но и на его равновесную концентрацию при длительном применении. В этом случае можно также выбрать один из выше изложенных вариантов дизайна исследования *in vivo*. С тем отличием, что ЛС-субстрат будет применяться курсами до достижения равновесного состояния, после чего должна определяться равновесная концентрация ЛС-субстрата в плазме крови (максимальная и минимальная);

2) Взаимодействующие ЛС (ингибиторы индукторы), должны дозироваться так, чтобы экспозиция этих препаратов соответствовала их клиническому применению, включая максимальные дозировки, которые должны быть использованы в исследовании *in vivo*;

3) Если ЛС-субстрат является пролекарством или имеет активные метаболиты, то в исследовании *in vivo* необходимо изучать не только фармакокинетику самого ЛС, но и его активного метаболита;

4) Исследования *in vivo* обычно могут быть доступными, кроме случаев, когда «фармакодинамические» показатели (включая НЛР) являются важными для оценки межлекарственного взаимодействия;

5) В случае если на всасывание взаимодействующего ЛС (ингибитора / индуктора) могут влиять различные факторы (например, pH желудка), может быть целесообразным определение равновесной концентрации (минимальной и максимальной) в плазме крови (обычно, не раньше чем через 5 периодов полувыведения ЛС) (Сычев Д.А. // М.: 2009. 32 с.). Исследования биотрансформации *in vivo*, в большинстве случаев могут проводиться с участием здоровых добровольцев. Данные, полученные в этой популяции, позволяли предсказать эффекты, которые могут быть получены в популяции пациентов, для применения у которых предназначено изучаемое ЛС. Минимальное количество участников исследования составляет 18 человек в случае перекрестного исследования и также как минимум по 18 человек в каждой из групп в случае параллельного дизайна исследования. Определение у участников исследования *in vivo* генетических полиморфизмов ферментов, участвующих в биотрансформации

желательно при исследовании изоферментов цитохрома P-450 CYP2D6, CYP2C19 и CYP2C9, т.к. степень лекарственного взаимодействия может быть различной в зависимости от генотипа по исследуемому изоферменту. Эта информация может оказаться полезной для интерпретации полученных в ходе исследования *in vivo* результатов (Сычев Д.А. // М.: 2009. 32 с.; Bailie G.R. et al. // Med facts. - Bone: Care International, 2004. 69 p.).

#### 1.4.2. Выбор субстратов для изучения межлекарственных взаимодействий ЛС

Выбор субстратов для исследований *in vivo* зависит от изоферментов цитохрома P450, на которые оказывало влияние изучаемое ЛС в исследовании *in vitro*.

При исследовании ингибирующих свойств изучаемого ЛС, выбирается маркерный субстрат, фармакокинетика которого значительно изменяется при совместном применении с известными специфическими ингибиторами того или иного изофермента цитохрома P-450. Например, AUC маркерного субстрата должна увеличиваться в 5 или более раз при одновременном его применении с известным ингибитором того или иного изофермента цитохрома P-450.

Исследование *in vivo* выявляет ингибирующее, либо индуцирующее действие ЛС на тот или иной изофермент цитохрома P-450. В то же время рекомендуется проведение дополнительных исследований с использованием набора других ЛС-субстратов, которые наиболее вероятно будут применяться в клинической практике вместе с изучаемым ЛС. Если исследование *in vivo* дает отрицательный результат взаимодействия ЛС с чувствительными субстратами, можно предположить, что также не будет обнаружено его влияние на менее чувствительные субстраты, а значит, дополнительные исследования не требуются (Nagai N. //Drug Metab Pharmacokinet. 2010. Vol. 25, №1. P. 3-15.)

Если исследования *in vivo*, показали, что изучаемое ЛС является ингибитором того или иного изофермента цитохрома P-450, то его следует отнести к одной из трех групп ингибиторов (слабые, умеренные, сильные), что важно при внесении информации о возможном межлекарственном



взаимодействии в инструкцию по применению ЛС и ТКФС ( типовые клинико-фармакологические статьи ). Включение изучаемого ЛС по данным исследования *in vivo* в одну из трех групп ингибиторов, позволяет определить вероятность его взаимодействия с чувствительными субстратами и ЛС-субстратами с узким терапевтическим диапазоном, что должно найти отражение в инструкции по применению ЛС и ТКФС. При исследовании *in vivo* изучаемого ЛС в качестве субстрата, выбор ингибиторов для данных исследований зависит от изофермента цитохрома P450, который по данным исследования *in vitro* метаболизирует исследуемое ЛС. При этом, для исследования *in vivo*, необходимо выбрать сильный ингибитор того или иного изофермента цитохрома P-450, который будет являться «маркерным» ингибитором (Сычев Д.А. // М.: 2009. 32 с.).

#### 1.4.2.1. Пути введения и дозы ЛС-субстратов, ингибиторов и индукторов

Для изучаемого ЛС путь введения обычно должен соответствовать планируемому для использования в клинике. Если разрабатываются как пероральный, так и парентеральный путь введения ЛС, то потребность в исследовании межлекарственного взаимодействия для нескольких путей введения, чаще всего перорального и парентерального, зависит от наличия у изучаемого ЛС эффекта «первого прохождения», который может быть связан с активностью изоферментов цитохрома P-450 стенки и транспортеров кишечника. Если для изучаемого ЛС в качестве субстрата, характерен эффект «первого прохождения» через печень, то необходимо изучение межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров как при его пероральном, так и парентеральном введении. Для ЛС-субстратов и взаимодействующих ЛС (ингибиторов / индукторов), использующихся в качестве «маркеров», путь введения будет зависеть от доступных на рынке форм выпуска данных ЛС, хотя и предпочтительным является пероральный путь.

Выбор доз в исследовании *in vivo* должно способствовать максимальной вероятности обнаружения межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров, как для субстрата (изучаемого ЛС или

«маркера»), так и для взаимодействующего ЛС (ингибитора / индуктора) (Сычев Д.А. // М.: 2009. 32 с.).

1.4.2.2. Фармакокинетические параметры, фармакодинамические показатели и статистические расчеты, применяемые для оценки межлекарственных взаимодействий

Изменения фармакокинетических параметров могут быть использованы для оценки клинической значимости межлекарственных взаимодействий на уровне биотрансформации и транспортеров. Интерпретация результатов, полученных в ходе этих исследований, будет облегчаться если они будут дополнены изучением изменения фармакодинамики ЛС, если это возможно (Bailie G.R. et al. // Med facts. - Bone: Care International, 2004. 69 p.).

В ходе каждого исследования *in vivo* должны быть получены следующие фармакокинетические параметры ЛС-субстрата (изучаемого ЛС или «маркера»): площадь под фармакокинетической кривой (AUC), максимальная концентрация ( $C_{max}$ ), время достижения  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), общий клиренс (CL), объем распределения (Vd) и периоды полувыведения ( $t_{1/2el}$ ). В некоторых случаях эти параметры также могут быть интересны и для взаимодействующего ЛС (ингибитора / индуктора), особенно в случаях, если в исследовании оцениваются возможные влияния на оба исследуемых ЛС. Дополнительные измерения могут помочь в исследованиях равновесного состояния (например, минимальная и максимальная равновесная концентрация) для демонстрации того, что стратегии дозирования были адекватно подобраны для достижения состояния, близкого к равновесному, до и во время взаимодействия. Частота забора образцов крови должна быть адекватной для обеспечения точного определения соответствующих фармакокинетических показателей самого ЛС и его активных метаболитов (при их наличии). Для ЛС-субстрата, вне зависимости от того, является ли он изучаемым ЛС или «маркером», важным является определение активных метаболитов (при их наличии) (The Merck Manual.2012).

Фармакокинетические показатели обычно являются достаточными для исследований межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и

транспортеров, хотя фармакодинамические показатели могут иногда дать полезную дополнительную информацию. Определение фармакодинамических показателей показано, если взаимосвязь фармакокинетики и фармадинамики ЛС-субстрата не выяснена, или если фармакодинамические изменения происходят не только вследствие фармакокинетических, но и фармакодинамических взаимодействий (например, аддитивное влияние хинидина и трициклических антидепрессантов на интервал QT).

Статистическая значимость различий фармакокинетических и фармакодинамических параметров ЛС-субстрата (изучаемого ЛС или «маркера») до и после взаимодействия должна быть оценена с помощью непараметрических статистических методов т.к. в большинстве случаев полученные данные не соответствуют нормальному распределению. В случае, если исследование *in vivo* было перекрестным рекомендуется использовать парный критерий Вилкоксона, а при параллельном дизайне - метод Манна-Уитни. Различия необходимо расценивать как статически значимые при  $p < 0,05$  (Сычев Д.А. // М.: 2009. 32 с.).

### Заключение

Анализ литературных источников показал, что процессы фармакокинетики и биотрансформации препарата-маркера лозартана у крыс и человека *in vivo* по образованию основного метаболита E-3174 подобны. Таким образом можно сделать заключение, что крыса – подходящая биологическая модель для изучения фармакокинетики лозартана с целью оценки влияния новых фармакологических средств (афобазола) на активность изоформы P450 CYP2C9 с использованием стандартных модификаторов и субстратов-маркеров.

В связи с высокой степенью гомологичности крыс и человека данные, полученные в эксперименте на этом виде животных имеют важное прогностическое значение при переносе их на человека.

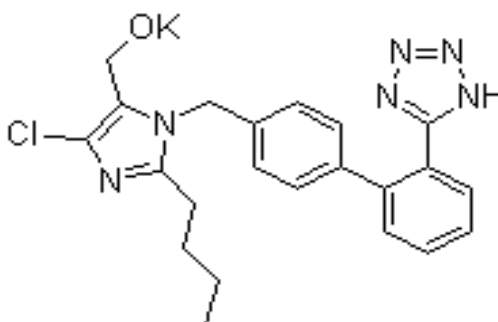
## Глава 2. Материалы и методы исследования

Исследование выполнено согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Часть 1; «Методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований фармакокинетики фармакологических веществ и лекарственных средств» (Миронов А.Н. // Тула: ЗАО «Гриф и К», 2012. 944 с.).

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. Объекты исследования

Лозартан-(2-Бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил)[1,1'-бифенил]-4-ил]-метил]-1Н-имидазол-5-метанол (в виде калиевой соли)



Лозартан калия — белый или почти белый кристаллический порошок. Хорошо растворим в воде, растворим в этаноле, плохо растворим в органических растворителях (ацетонитрил и метилэтилкетон).

Фармакологически активный метаболит лозартана - E-3174 - (2-Бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил)[1,1'-бифенил]-4-ил]-метилимидазол-5-карбоновая кислота)

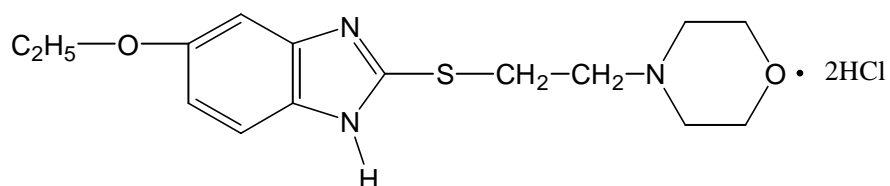


По своим физико-химическим свойствам E-3174 представляет собой белый порошок, плохо растворимый в воде и хорошо в метиловом спирте.

Афобазол: 2-(2-морфолиноэтилтио)-5-этоксibenзилимидазола дигидрохлорид

CAS No.: 173352-39-1

Молекулярная формула:  $C_{15}H_{21}N_3O_2S$



Структурная формула:

Молекулярная масса: 380,35 а.е.м.

Физико-химические свойства: белый кристаллический порошок, хорошо растворим в воде, умеренно в спирте.

В работе использовались:

Субстанция афобазола дигидрохлорида,

Производитель – «Erregiere SpA.» (Италия)

Партия (лот) производителя – сер. 0704011Н

Срок годности – 2 года

Субстанция лозартана калиевая соль, Usp rockville (США), № 1370462, Lot gog169.

Субстанция лозартанкарбоновой кислоты (E-3174), Toronto Research Chemical Inc (США), №470510, LOT NON572.

Субстанция рифампицина «Женгжоу Минжонг Фармасьютикал Ко., Лтд., КНР», серия № 201203001, срок годности – 02.2016.

Капсулы флуконазола –150 мг, серия № 20213 , фармацевтическая компания ООО «Здоровье» Украина, срок годности - 03.2018.

Условия хранения – в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С.

### 2.1.2. Химические реактивы

В работе использованы следующие реактивы:

Ацетат аммония (Merck, Германия);

Ацетонитрил для хроматографии (сверхчистый, Merck, Германия);

Вода деионизованная (Merck, Германия);

Вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);

Глицин (SERVA, Германия);

Эфир диэтиловый химически чистый МедХимПром (Россия)

Метанол MERCK (Германия);

Калия фосфат однозамещенный (ч.д.а., Sigma, США);

Раствор гепарина 5000 Ед/мл (Московский эндокринный завод, Россия);

Соляная кислота (о.с.ч., Химмед, Россия);

Этиловый спирт 96,4% (ЗАО Сармаковский СДК, Россия);

Фосфорная кислота 85% (Across Organiks).

### 2.1.3. Аналитическая аппаратура и средства измерений

#### 2.1.3.1. Основные аналитические приборы

Жидкостной хроматограф фирмы “Beckman Coulter” (США), оснащенный помпой – “Beckman System Gold 127 Solvent Module”, спектрофлуорометрический детектор RF-10AXL Shimadzu (Япония) и компьютера с

соответствующим пакетом программ для обсчета хроматограмм «Амперсенд» (Россия).

Весы лабораторные (ГОСТ 24104-2001) аналитические “AR 2140” (Ohaus, США) с погрешностью взвешивания не более  $\pm 0,0001$  г, весы лабораторные (ГОСТ 24104-2001) технические “BA310S” (Sartorius, Германия) с погрешностью взвешивания не более  $\pm 0,01$  г, мерные колбы на 50,0; 100,0; 250,0 мл (ГОСТ 1770-74), мерные цилиндры объемом 25,0; 50,0; 250,0; 1000,0 мл (ГОСТ 1770-74).

### 2.1.3.2. Вспомогательные устройства

Шприцы медицинские вместимостью 2,0 и 5,0 мл (ГОСТ 24861-91);

Дозаторы переменного объема на 100,0; 200,0; 1000,0; и 5000,0 мкл (Eppendorf, Германия) со сменными одноразовыми пластиковыми наконечниками (Eppendorf, Германия);

pH-метр “Seven Easy S20-K” (Mettler-Toledo, Швейцария);

Аппарат для встряхивания жидкости “K-550 GE” (Vortex, США);

Центрифуга “ОПн-8” (ДАСТАН, Кыргызстан);

Центрифуга с охлаждением “Sigma 2 - 16” (Wiegand, Германия);

Ультразвуковая баня “Elmasonic S 40H” (Elma, Германия);

Пробирки со шлифами на 5,0; 10,0; и 15,0 мл (ГОСТ 1770-74);

Бумага фильтровальная “ФБ” (Невалаб, Россия, ГОСТ 12026-76).

### 2.1.4. Приготовление растворов для анализа

#### 2.1.4.1. Приготовление концентрированных и рабочих стандартных растворов

Концентрированный матричный раствор лозартана готовили растворением навески (10,0 мг) в мерной колбе на 100,0 мл дистиллированной водой.

Концентрированный матричный раствор E-3174 готовили растворением навески (10,0 мг) в мерной колбе на 100,0 мл смесью из метанол-вода (50:50).

Рабочие растворы готовили последовательным разведением концентрированных растворов до получения необходимой концентрации.

Концентрированные и рабочие растворы хранили в холодильнике при 5°C.

#### 2.1.4.2. Приготовление фосфатного буферного раствора (рН 1,9)

Отвешивали 6,8 г однозамещенного фосфата калия, переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили до метки дистиллированной водой. В колбу на 500 мл добавляли 25 мл р-ра однозамещенного фосфата калия, 0,5 мл 85% фосфорной кислоты. Объем полученной смеси доводили до метки дистиллированной водой. Затем при помощи рН - метра раствор доводили 85% фосфорной кислотой до значения рН=1.9.

Значение рН полученного буферного раствора контролировали с помощью рН-метра, предварительно проверенном и откалиброванном по стандартным буферным растворам (ГОСТ 8.134-74 и ГОСТ 8.135-74). Полученный буферный раствор дегазировали на ультразвуковой бане, переносили в сухую склянку с хорошо притертой пробкой и хранили при комнатной температуре в месте, защищенном от попадания прямых солнечных лучей. Срок хранения буферного раствора – 1 неделя.

#### 2.1.4.3. Приготовление подвижной фазы для хроматографического анализа биологических образцов животных

В качестве подвижной фазы для хроматографического анализа биологических образцов использовали смесь ацетонитрила для хроматографии марки УФ и фосфатного буфера (рН 1,9).

К 315 мл фосфатного буфера приливали 195 мл ацетонитрила. Полученную подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и хранили в холодильнике при 5°C.

#### 2.1.4.4. Приготовление глициновой буферной смеси для экстракции

Готовили 0,2М раствор глицина растворением навески вещества массой 7,51 г в дистиллированной воды с использованием мерной колбы. Объем раствора доводили до 500 мл. Затем в сухую склянку на 50 мл отмеряли 5 мл 0,2М раствора глицина, добавляли 4,4 мл 0,2М раствора соляной кислоты и 10,6 мл дистиллированной воды. Полученный буферный раствор дегазировали на



ультразвуковой бане и хранили в холодильнике при 5°C. Срок хранения буферного раствора – 1 неделя.

#### 2.1.5. Экспериментальные животные

Изучение влияния афобазола на активность изоформы CYP2C9 после введения перорально проводили на бодрствующим белым крысам-самцам (масса тела  $200 \pm 30$  г), полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” при 12-ти часовом световом режиме (Хабриев Р.У. // М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. С. 217-229.).

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики (Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации №708н от 23 августа 2010г.).

## 2.2. Методы

### 2.2.1. Введение препарата

Водный раствор лозартана калиевой соли, а также раствор афобазола дигидрохлорида готовили *ex tempore* и вводили крысам перорально натошак с помощью металлического зонда. После введения препарата крыс помещали в индивидуальные клетки.

Доза лозартана для изучения влияния афобазола на активность CYP2C9 после перорального введения препарата составила 30 мг/кг. Дозы афобазола 5,25,50,75,100 и 125 мг/кг.

### 2.2.2. Способ отбора мочи и крови

С целью сбора суточной мочи 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°C без добавления консервантов.

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности изофермента CYP2C9 (по данным мочевой экскреции) крысам каждой группы сначала вводили лозартан без афобазола, индуктора или ингибитора (контроль), затем по истечении 3-х суток этим же животным вводили афобазол (индуктор или ингибитор) в течение 4-х суток (субхроническое введение). Последнее введение афобазола (индуктора или ингибитора) производили вместе с лозартаном. Для этого получали раствор лозартана и афобазола в воде и вводили поочередно (через 30 минут). Совместное введение было невозможно из-за происходящей химической реакции и выпадения осадка.

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности CYP2C9 сбор мочи крыс проводили по следующей схеме:

Контроль. После введения лозартана без афобазола (индуктора или ингибитора) крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Отсчет времени начинался после введения препарата-маркера.

Субхроническое введение. После последнего введения афобазола (индуктора или ингибитора) совместно с лозартаном крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Отсчет времени начинался после введения афобазола (индуктора или ингибитора) с препаратом-маркером.

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 (Хабриев Р.У. // М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. С. 217-229.).

Кровь сливали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки, обработанные гепарином. С целью получения плазмы образцы крови центрифугировали (4000 об/мин в течение 15 минут). Объем полученной плазмы крови измеряли и записывали в лабораторный журнал для дальнейших расчетов. Плазма крови хранилась в замороженном виде при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  без добавления консервантов.

### 2.2.3. Построение калибровочных кривых

Количественное определение препарата проводили методом абсолютной калибровки. Валидацию метода проводили в согласии с руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств (Береговых В.В. / М.: Литтерра, 2008. 132с.).

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). Количество лозартана и его метаболита в хроматографических фракциях определяли методом нормализации по данным калибровки с внешним стандартом. В изучаемом диапазоне 2,5 – 200,0 нг/мл концентраций (С) отмечена линейная зависимость между концентрациями анализируемых соединений и соответствующих площадей пиков, усредненное значение которых описывалось следующим уравнением (n=7):

1) Для лозартана  $S = -65,53 + 89,14 \times C$  ( $r=0.9999$ )

2) 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.

### 2.2.4. Метрологическая характеристика методик определения лозартана и его метаболита E-3174

Разработанная методика метрологически оценена на растворах стандартного образца лозартана и его метаболита (E-3174) после шести определений.

В таблицах 2 и 3 представлены полученные результаты.

**Таблица 2 Метрологические характеристики методики определения лозартана**

Взято (нг/мл)	Найдено нг/мл)						$\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	$\epsilon\%$
2,5	2,4	2,5	2,3	2,2	2,6	2,8	2,47	0,216	0,088	0,226	9,1
5,0	6,0	5,7	5,9	6,2	6,5	6,2	6,08	0,279	0,114	0,293	4,8
10,0	9,8	10,3	10,5	10,1	9,5	10,4	10,10	0,385	0,157	0,403	4,0

**Таблица 3 Метрологические характеристики методики определения E-3174**

Взято (нг/мл)	Найдено нг/мл)						$\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	$\epsilon\%$
5	7,5	7,9	8,3	7,1	8,0	8,2	7,83	0,455	0,186	0,478	6,1
10	12,0	12,7	13,3	13,5	13,4	13,0	12,98	0,564	0,230	0,591	4,5
25	24,9	26,5	25,3	24,8	25,1	26,0	25,43	0,674	0,275	0,707	2,8

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.

#### 2.2.5. Условия количественного определения лозартана и его метаболита E-3174 в моче и плазме крови животных с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии

Количественный анализ лозартана и его метаболита в моче и плазме крови животных проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Нами была воспроизведена с некоторыми модификациями методика количественного определения лозартана и его метаболита в моче и плазме крови

крыс (Пронина О.Г. (Грибакина) и др. // Вестник Московского Университета. 2012. Том.53. №2. С. 194-197).

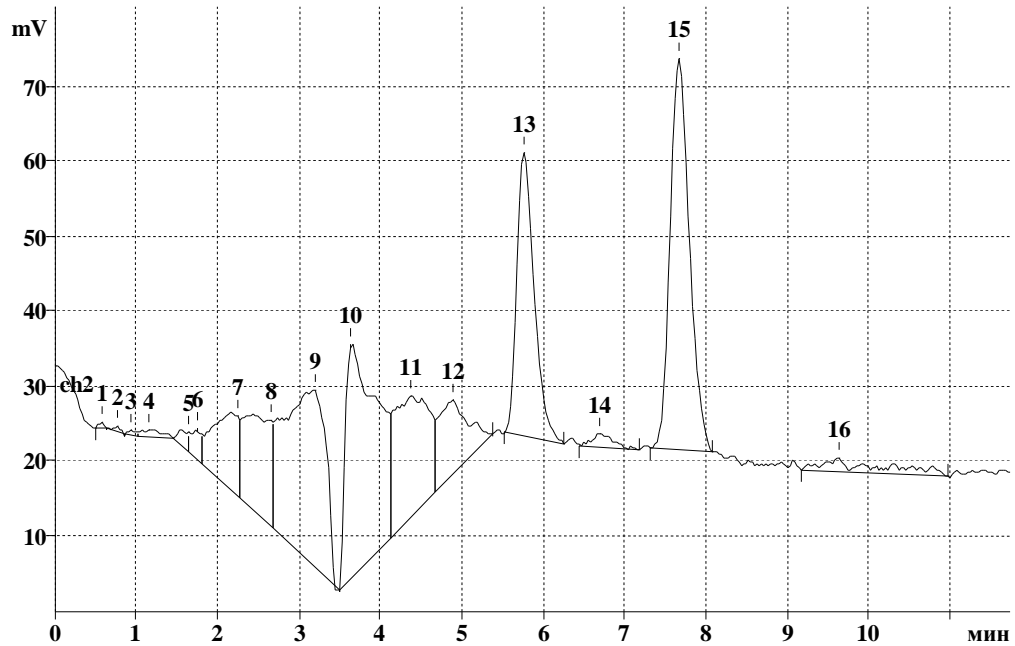
Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе фирмы “Beckman Coulter” (США), оснащенный помпой – “Beckman System Gold 127 Solvent Module” и спектро-флуорометрическим детектором RF-10AXL Shimadzu (Япония).

Условия хроматографирования:

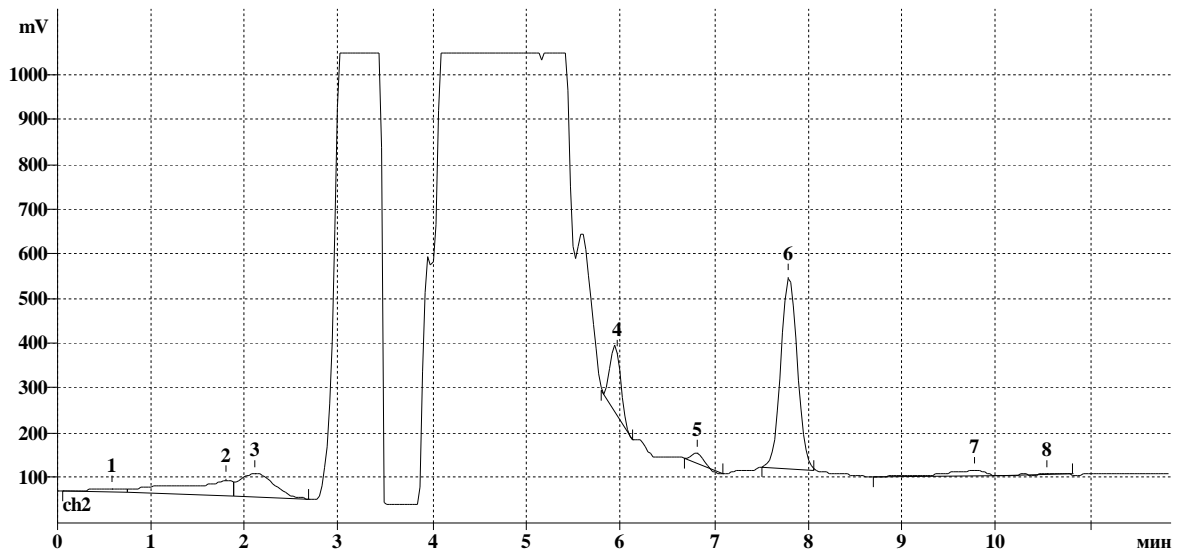
Аналитическая колонка – Luna CN 5 мкм , 250×4,6 мм, детектирование проводили при значениях экстинкции (длина волны поглощения) 250 нм и эмиссии (длина волны возбуждения) 375 нм. Подвижная фаза – фосфатный буфер (рН 1,9): ацетонитрил (315:195); скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Хроматографический анализ проводили при комнатной температуре (22-24°C). Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и фильтровали.

В этих условиях время удерживания лозартана в среднем составило  $7,7 \pm 0,3$  мин, а его метаболита  $5,8 \pm 0,2$  мин (Рис. 2). Коэкстрактивные вещества не мешали определению.

Типичная хроматограмма суточной мочи крысы после перорального введения лозартана в дозе 30 мг/кг представлена на рисунке 3.

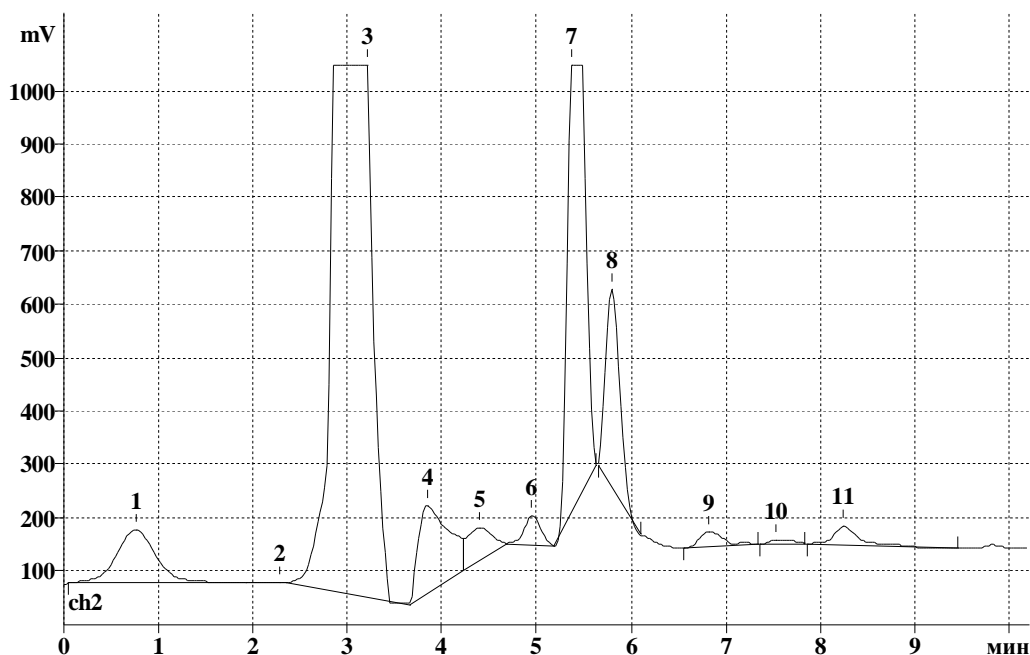


**Рисунок 2. Хроматограмма рабочего стандартного раствора E-3174 и лозартана в дозе 10 нг/мл (№ пиков: 13 - метаболит, 15 - лозартан).**



**Рисунок 3 Хроматограмма суточной мочи крысы после перорального введения лозартана в дозе 30 мг/кг [№/№ пиков: 5, 7, 8, – пики коэкстрактивных веществ; 4 – E-3174 ( $t_R$  – 5,8 мин); 6 – лозартан ( $t_R$  – 7,7 мин)].**

Типичная хроматограмма плазмы крови крысы через 30 минут после перорального введения лозартана в дозе 30 мг/кг представлена на рисунке 4.



**Рисунок 4** Хроматограмма плазмы крови крысы через 30 минут после перорального введения лозартана в дозе 30 мг/кг [№№ пиков: 1- 7, 9,11 – пики коэкстрактивных веществ; 8 – E-3174 ( $t_R$  – 5,8 мин); 10 – лозартан ( $t_R$  – 7,7мин)].

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

##### 2.2.6.1. Подготовка мочи крыс к хроматографическому анализу

В экстракционную пробирку к 1,0 мл опытного образца мочи прибавляли 1 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  $-18^{\circ}\text{C}$  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.

#### 2.2.6.2 Определение процента извлечения лозартана и его метаболита E-3174 из мочи

С целью определения полноты экстракции лозартана и его метаболита готовили стандартные растворы в смеси метиловый спирт-вода (1:1). Растворы лозартана с концентрациями 50,0, 100,0 и 200,0 нг/мл и E-3174 с концентрациями 100,0, 200,0 и 500,0 нг/мл. В экстракционную пробирку к 0,9 мл мочи прибавляли 0,05 мл стандартного раствора лозартана и 0,05 мл стандартного раствора E-3174, тщательно перемешивали и инкубировали на водяной термостатической бане при 37°C в течение 1 часа. Температуру контролировали с помощью встроенного термометра (ГОСТ 29224-91). Затем проводили двойную экстракцию диэтиловым эфиром.

Полученные результаты представлены в таблицах 4 и 5.

Концентрацию лозартана и его метаболита в моче и плазме крови крыс рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{C_x}{V_2} \times V_1$$

где  $C_x$  – концентрация лозартана или E-3174, найденная по калибровочной кривой,

$V_1$  – объем растворителя сухого остатка,

$V_2$  – объем мочи (плазмы крови).

**Таблица 4 Процент извлечения лозартана из мочи крыс**

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			$\bar{x}$	SD
2,5	77,5	91,4	85,2	84,7	6,96
5,0	87,3	83,6	79,2	83,4	4,06
10,0	83,1	84,3	78,8	82,1	2,89
				83,4	4,64



**Таблица 5 Процент извлечение E-3174 из мочи крыс**

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			$\bar{x}$	SD
5,0	78,3	90,1	92,5	87,0	7,60
10,0	89,5	91,4	82,1	87,7	4,91
25,0	86,4	81,2	85,6	84,4	2,80
				86,4	5,10

Установлено, что процент экстракции лозартана из мочи составил  $83,4 \pm 4,64$ , а его метаболита  $86,4 \pm 5,10$  (среднее из 3 определений).

#### 2.2.6.3. Подготовка плазмы крови крыс к хроматографическому анализу

Экстракцию соединения лозартана из плазмы крови проводили диэтиловым эфиром. Предварительно размороженную плазму крови (1,0 мл) вносили в экстракционную пробирку, добавляли эквивалентное количество глицинового буфера, 15,0 мл диэтилового эфира и встряхивали в течение 15 мин. Далее поступали, как описано в подразделе 2.2.6.1. Подготовка мочи крыс к хроматографическому анализу.

#### 2.2.6.4. Определение процента извлечения лозартана и его метаболита E-3174 из плазмы крови

**Таблица 6 Процент извлечения лозартана из плазмы крови крыс**

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			$\bar{x}$	SD
2,5	85,6	81,8	96,4	87,9	7,57
5,0	83,7	91,5	94,2	89,8	5,45
10,0	90,3	86,1	85,6	87,3	2,58
				88,3	5,20

**Таблица 7 Процент извлечение E-3174 из плазмы крови крыс**

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			$\bar{x}$	SD
5,0	84,9	95,3	98,1	92,8	6,96
10,0	91,4	87,6	83,8	87,6	3,80
25,0	92,9	90,7	96,2	93,3	2,77
				91,2	4,51

Установлено, что процент экстракции лозартана из плазмы крови составил  $88,3 \pm 5,20$ , а его метаболита  $91,2 \pm 4,51$  (среднее из 3 определений).

#### 2.2.6.5. Испытание на разведение опытных образцов суточной мочи и плазмы крови крыс

Возможность разбавления образцов, содержащих лозартан и его метаболит E-3174 в концентрациях, превышающих верхний предел калибровочной кривой, изучалась на модельном образце мочи крыс, в который был внесен раствор с концентрацией 1500 нг/мл. После разбавления данного образца мочи в 10 раз (подвижной фазой) проводили пробоподготовку, описанную ранее (разделы 2.2.6.1 и 2.2.6.3). Для определения правильности и достоверности концентрацию лозартана в пробе определяли в 5 повторах. Полученные значения должны были удовлетворять критерию приемлемости:

**Правильность:** коэффициент вариации (CV%) значений концентрации разбавленного образца не должен превышать 15%.

**Воспроизводимость:** среднее значение концентрации разбавленного образца не должно превышать 15% теоретической величины.

Результаты представлены в таблицах 8 и 9.

Из данных таблиц 8 и 9 следует, что разведение образцов мочи крыс в 10 раз обеспечивает получение, приемлемых по правильности и достоверности, концентраций лозартана и его метаболита E-3174.

**Таблица 8 Результаты испытания на разведение образца раствора лозартана с концентрацией 1500 нг/мл**

Разведение – 10 раз

Калибровочная кривая	Образец, концентрация 150 нг/мл
1	148,5
	152,0
	146,7
	158,4
	148,1
$\bar{x}$	<b>150,74</b>
SD	<b>4,71</b>
CV%	<b>3,12</b>
% от теоретического	100,49

**Таблица 9. Результаты испытания на разведение образца раствора E-3174 с концентрацией 1500 нг/мл**

Разведение – 10 раз

Калибровочная кривая	Образец, концентрация 150 нг/мл
1	153,7
	150,9
	142,5
	157,3
	143,6
$\bar{x}$	<b>149,60</b>
SD	<b>6,41</b>
CV%	<b>4,28</b>
% от теоретического	99,73

Возможность разбавления образцов, содержащих лозартан и его метаболит E-3174 в концентрациях, превышающих верхний предел калибровочной кривой,

изучалась на модельном образце плазмы крови крыс, в который был внесен раствор с концентрацией 500 нг/мл. После разбавления данного образца плазмы крови в 5 раз (подвижной фазой) проводили пробоподготовку, описанную ранее (разделы 2.2.6.1 и 2.2.6.3). Для определения правильности и достоверности концентрацию лозартана в пробе определяли в 5 повторах. Полученные значения должны были удовлетворять критерию приемлемости:

Правильность: коэффициент вариации (CV%) значений концентрации разбавленного образца не должен превышать 15%.

Воспроизводимость: среднее значение концентрации разбавленного образца не должно превышать 15% теоретической величины. Результаты представлены в таблицах 10 и 11.

**Таблица 10 Результаты испытания на разведение образца раствора лозартана с концентрацией 500 нг/мл**

Разведение – 5 раз

Калибровочная кривая	Образец, концентрация 150 нг/мл
1	99,7
	103,7
	86,0
	108,3
	96,1
$\bar{x}$	<b>98,76</b>
SD	<b>8,46</b>
CV%	<b>8,57</b>
% от теоретического	98,76

**Таблица 11 Результаты испытания на разведение образца раствора Е-3174 с концентрацией 500 нг/мл**

Разведение – 5 раз

Калибровочная кривая	Образец, концентрация 100 нг/мл
1	106,9
	97,4
	104,6
	101,5
	98,3
$\bar{x}$	<b>101,74</b>
SD	<b>4,05</b>
CV%	<b>3,98</b>
% от теоретического	101,74

Из данных 10 и 11 следует, что разведение образцов плазмы крови крыс в 5 раз обеспечивает получение, приемлемых по правильности и достоверности, концентраций лозартана и его метаболита Е-3174.

#### 2.2.7. Фармакокинетические параметры, используемые для интерпретации экспериментальных данных

Основные фармакокинетические параметры рассчитаны модельно-независимым методом (программа “M-IND”) (Агафонов А.А., Пиотровский В.К. //Хим.-фарм.журн. 1991. № 10. С.16-19.).

- $AUC_{0-\infty}$  (мкг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой концентрация лекарственного вещества – время) после перорального введения крысам.  $AUC_{0-\infty}$  рассчитывается от момента введения до бесконечности;

- $AUC_{0-T}$  (мкг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой концентрация лекарственного вещества – время) после

перорального введения крысам.  $AUC_{0-t}$  рассчитывается от момента введения до некоторого времени;

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

#### 2.2.8. Статистическая обработка полученных результатов

Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны с помощью программы “Microsoft® Excel® v.11.0”. Достоверность различий для сравниваемых концентраций исследуемых соединений оценивали с помощью критерия Стьюдента (программа “Statistica 6.0”) (Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. // М.:ГЭОТАР-МЕД, 2001. 256 с.).

Для оценки достоверности между ФК параметрами значения концентраций лозартана и его метаболита в плазме крови крыс в различные дискретные интервалы времени подвергали математической статистической обработке согласно одностороннему ANOVA-тесту.

Поскольку на каждую временную точку использовали по 8 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усредненным концентрациям, поэтому при расчетах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов.

Поскольку на каждую временную точку использовали по 8 животных, результирующие фармакокинетические кривые представлены в виде средней арифметической и соответствующего ей стандартного отклонения средней арифметической ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).

Рисунки были выполнены с использованием графического редактора “Origin v.7.0”.

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.

#### 2.2.9. 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.

#### Заключение

Воспроизведенная и модифицированная методика ВЭЖХ может применяться для количественного определения лозартана и его метаболита в биопробах. Метод обладает рядом достоинств: время определения каждой пробы составляет около 10 мин, простая пробоподготовка. Методику можно использовать для оценки активности изоформы CYP2C9 при изучении межлекарственных взаимодействий.

### **Глава 3. Изучение влияния афобазола на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 по данным экскреции с мочой**

В настоящем исследовании представлены данные по влиянию афобазола на изофермент цитохрома P450 CYP2C9 с использованием субстратного маркера – лозартана (Testa B., Kramer S.D. // Weinheim: Wiley-VCH, 2008. Vol.1. 319 p.).

Индущирующий или ингибирующий эффект афобазола оценивали по абсолютным величинам метаболических отношений препарата-маркера. В главе 3 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) (Seredenin S.B. // Psychopharmacol. Biol. Narcol. 2003. Vol.3, № 1-2. P. 494-509.).

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

#### **3.1 Изучение влияния афобазола на изменение активности изоформы CYP2C9 после его введения в различных дозах**

**Цель исследования** – оценить влияние афобазола на изменение активности изофермента CYP2C9 в анксиолитической дозе 5 мг/кг в сравнении с многократным увеличением дозы (5-125 раз) при одинаковой длительности введения препарата (в течение 4х дней, трехкратно через каждые 3 часа).

#### **Материалы и методы**

В настоящем исследовании оценивали влияние афобазола в анксиолитической дозе 5 мг/кг в сравнении с многократным увеличением дозы до 125 мг/кг при одинаковой продолжительности введения препарата в течение 4х дней, трехкратно через каждые 3 часа. Выбор доз основывался на результатах



ранее проведенных исследований анксиолитической активности и экспериментальных данных фармакокинетики афобазола у крыс (Середенин С.Б. и др. // Вестник РАМН. 1998. №11. С.3-9.; Середенин С.Б. и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. Т. 70, №2. С.59-64.), а также характеристики токсичности афобазола ( $LD_{50}$  для крыс – 1,1 г/кг) (Соловьева И.К. // Российский медицинский журнал. 2006. Т.14, №5. С. 385–388.).

Исследования проводили на 5 группах крыс. На данном этапе исследования определяли метаболические отношения (Е-3174 /лозартан) после введения лозартана без афобазола (контроль; группа I) в сравнении с введением лозартана на фоне 4х - дневного введения афобазола в различных дозах. Введение 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 4х суток этим же животным вводили афобазол в течение 4х дней, трехкратно через каждые 3 часа (субхроническое введение). Лозартан животным II- VI групп вводили через 30 мин после последнего введения афобазола.

Совместное введение было невозможно из-за происходящей химической реакции и выпадения осадка. Препарат-маркер лозартан вводили в дозе 30 мг/кг. Крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Сбор мочи проводили по схеме, описанной в гл.2 (см. раздел. 2.2.2). Анализ проб мочи животных проводили с использованием ВЭЖХ. Методики экстракции и количественного определения исследуемых веществ подробно изложены в гл.2 (см. раздел 2.2.5, 2.2.6.).

Достоверность различий между величинами метаболических отношений (МО) препарата-маркера после введения лозартана без афобазола (контроль) и на фоне субхронического введения афобазола оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента (2.2.8).

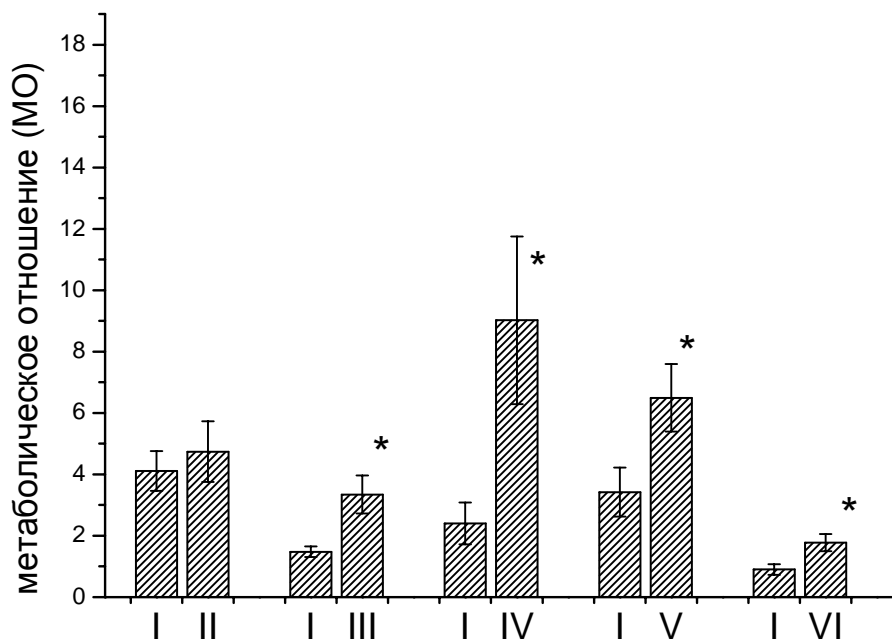
### **Результаты и их обсуждение**

В результате проведенного исследования установлено, что афобазол в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг не оказывал

индуцирующего/ингибирующего эффекта на изофермент CYP2C9 ( $p < 0,05$ ). (Рис. 5, табл. 12). 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), установлено, что афобазол оказывал умеренный индуцирующий эффект (Рис.5, табл.12-16) ( $p < 0,05$ ).

На рисунке 5 представлены метаболические отношения после введения крысам лозартана без афобазола (контроль) и введения лозартана на фоне субхронического введения афобазола в дозах 5 - 125 мг/кг.



**Рисунок 5** Метаболические отношения (МО) (Е-3174 /лозартан) после многократного введения афобазола крысам в дозах 5 - 125 мг/кг (n=8;  $\bar{x} \pm S$ ):

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)

В таблицах 12-16 представлены МО после введения лозартана без афобазола (контроль) и введения лозартана на фоне субхронического введения афобазола в дозах 5,25,75,100 и 125 мг/кг.

После перорального субхронического введения афобазола в дозе 25 мг/кг выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p < 0,05$ ). МО после введения лозартана без афобазола составило  $1,48 \pm 0,17$ , а после введения

препарата-маркера на фоне субхронического введения афобазола –  $3,34 \pm 0,62$  (табл.13).

**Таблица 12. Метаболические отношения (Е-3174 /лозартан) в суточной моче крыс до и после введения афобазола в дозе 5 мг/кг**

№/№	А	Б
1	3,48	6,15
2	5,03	3,70
3	4,34	1,87
4	2,0	4,53
5	8,0	10,6
6	2,58	5,64
7	3,45	2,07
8	4,02	3,39
<b>x</b>	<b>4,11</b>	<b>4,74</b>
<b>SD</b>	<b>1,84</b>	<b>2,81</b>
<b><math>S_{\bar{x}}</math></b>	<b>0,65</b>	<b>0,99</b>
<b>CV</b>	<b>44,8</b>	<b>59,3</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола

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

**Таблица 13. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) в суточной моче крыс до и после введения афобазола в дозе 25 мг/кг**

№/№	А	Б
1	2,17	2,77
2	1,71	3,25
3	0,79	4,90
4	1,93	6,88
5	0,92	1,39
6	1,67	3,02
7	1,16	2,20
8	1,52	2,34
<b>x</b>	<b>1,48</b>	<b>3,34*</b>
<b>SD</b>	<b>0,48</b>	<b>1,75</b>
<b>S<math>\bar{x}</math></b>	<b>0,17</b>	<b>0,62</b>
<b>CV</b>	<b>33,4</b>	<b>52,4</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола

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

**Таблица 14. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) в суточной моче крыс до и после введения афобазола в дозе 75 мг/кг**

75 мг/кг

№/№	А	Б
1	2,59	7,38
2	4,44	8,80
3	6,13	5,92
4	0,96	3,14
5	0,91	27,44
6	1,73	9,15
7	1,38	4,06
8	1,04	6,27
<b>x</b>	<b>2,39</b>	<b>9,02*</b>
<b>SD</b>	<b>1,91</b>	<b>7,73</b>
<b>S<sub>x̄</sub></b>	<b>0,67</b>	<b>2,73</b>
<b>CV</b>	<b>79,9</b>	<b>85,7</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола

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

После перорального субхронического введения афобазола в дозе 75 мг/кг выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p < 0,05$ ). МО в контрольной группе составило  $2,39 \pm 0,67$ , а после субхронического введения афобазола –  $9,02 \pm 2,73$  (табл.14).

**Таблица 15. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) в суточной моче крыс до и после введения афобазола в дозе 100 мг/кг**

№/№	А	Б
1	2,21	4,81
2	6,50	6,10
3	3,08	3,50
4	0,38	3,70
5	1,83	12,42
6	3,52	8,93
7	2,79	4,38
8	7,03	8,11
<b>x</b>	<b>3,41</b>	<b>6,49*</b>
<b>SD</b>	<b>2,27</b>	<b>3,11</b>
<b>S<sub>x̄</sub></b>	<b>0,80</b>	<b>1,10</b>
<b>CV</b>	<b>66,57</b>	<b>47,9</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола

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

После перорального субхронического введения афобазола в дозе 100 мг/кг выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p < 0,05$ ). МО после введения лозартана без афобазола составило  $3,41 \pm 0,80$ , а на фоне субхронического введения афобазола –  $6,49 \pm 1,10$  (табл.15).

**Таблица 16. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) в суточной моче крыс до и после введения афобазола в дозе 125 мг/кг**

№/№	А	Б
1	0,55	1,72
2	1,17	1,35
3	0,32	0,62
4	1,63	2,22
5	1,50	1,56
6	0,45	2,04
7	0,74	1,32
8	0,85	3,37
<b>x</b>	<b>0.90</b>	<b>1.77*</b>
<b>SD</b>	<b>0.49</b>	<b>0.81</b>
<b>S <math>\bar{x}</math></b>	<b>0.17</b>	<b>0.29</b>
<b>CV</b>	<b>54.4</b>	<b>45.8</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола

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

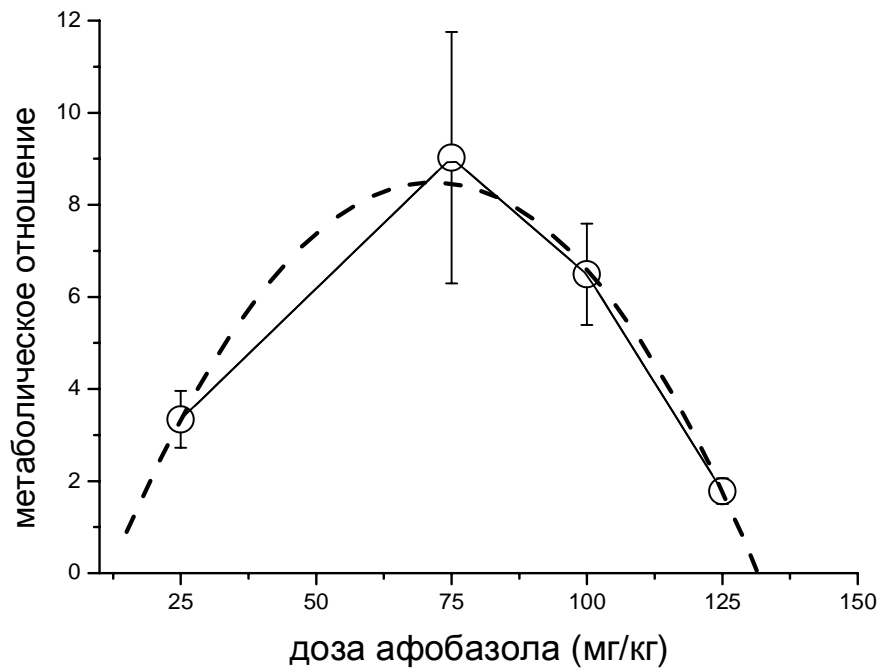
После перорального субхронического введения афобазола в дозе 125 мг/кг выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p < 0,05$ ). МО после введения лозартана без афобазола составило  $0,90 \pm 0,17$ , а на фоне субхронического введения афобазола –  $1,77 \pm 0,29$  (табл.16).

Анализ полученных результатов показал, что величина МО Е-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 метаболическое отношение. Увеличение дозы анксиолитика до 100 и 125 мг/кг вело к снижению индукции.

На рисунке 6 показана зависимость метаболического отношения препарата-маркера от дозы афобазола.



**Рисунок 6. Куполообразная кривая зависимости метаболического отношения (Е-3174/ лозартан) в зависимости от дозы афобазола ( $n=8$ ;  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).**

Как видно из рисунка 6, данную зависимость можно описать уравнением полинома следующего вида:  $y = -3,660 + 0,339x - 0,002x^2$  ( $r^2 = 0.9981$ ). Данная функция имеет максимум, которому соответствует доза 75 мг/кг, при последующем увеличении дозы афобазола индуцирующий эффект ослабевает, что отражается на нисходящей части кривой. Использование этой функции позволяет рассчитать МО в диапазоне доз от 1 мг/кг до 130 мг/кг.

Снижение индуцирующего эффекта может быть объяснено насыщением активных центров изофермента молекулами афобазола. При увеличении дозы

афобазола (выше 125 мг/кг) возможно дальнейшее снижение индуцирующего действия.

### **3.2. Изучение влияния длительности введения крысам афобазола в дозе 25 мг/кг на изменение активности изоформы CYP2C9**

**Цель исследования** – оценить влияние афобазола на изменение активности изофермента CYP2C9 в завышенной дозе 25 мг/кг при разной длительности введения препарата (3х и 4х дневное введение).

#### **Материалы и методы**

Исследования проводили на 2 группах крыс. В каждую группу входило по 8 животных. Субхроническое 3х дневное введение афобазола – группа I и субхроническое 4х дневное введение афобазола – группа II. Крысам I группы сначала вводили лозартан (контроль), затем по истечении 3х суток этим же животным вводили афобазол в течение 3х дней, трехкратно через каждые 3 часа. Крысам II группы сначала вводили лозартан (контроль), затем по истечении 3х суток этим же животным вводили афобазол в течение 4х дней, трехкратно через каждые 3 часа. Лозартан животным обеих групп вводили через 30 мин после последнего введения афобазола.

Препарат-маркер лозартан вводили животным в дозе 30 мг/кг. Крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Сбор мочи проводили по схеме, описанной в гл.2 (см. раздел. 2.2.2). Анализ проб мочи животных проводили с использованием ВЭЖХ. Методики экстракции и количественного определения исследуемых веществ подробно изложены в гл.2 (см. раздел 2.2.5, 2.2.6.).

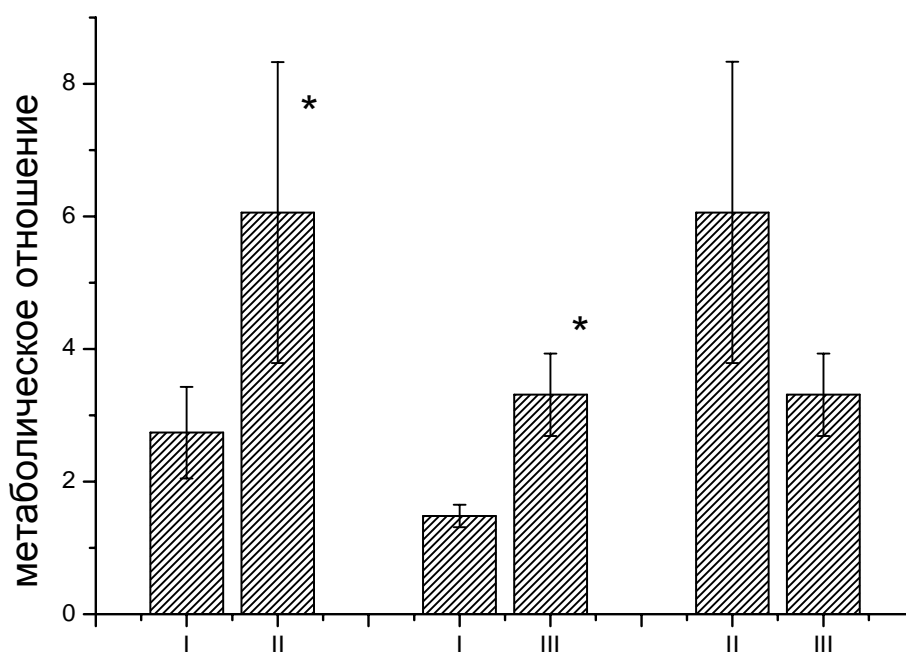
Достоверность различий между величинами МО препарата-маркера после введения лозартана без афобазола (контроль) и на фоне субхронического введения афобазола оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента (2.2.8).

#### **Результаты и их обсуждение**

При сравнении величин метаболических отношений (Е-3174/лозартан) выявлены статистически значимые различия после введения лозартана без

афобазола (контрольные группы) в сравнении с введением лозартана на фоне 3х и 4х - дневного введения афобазола.

На рисунке 7 показаны абсолютные величины метаболических отношений, полученные в контрольных группах в сравнении с аналогичными параметрами, полученными после введения лозартана на фоне 3х и 4х - дневного введения афобазола. В таблице 17 представлены МО после введения лозартана без афобазола (контроль) и аналогичные параметры полученные после введения лозартана на фоне 3х - дневного введения афобазола. В таблице 18 представлены МО после введения лозартана без афобазола и введения лозартана на фоне 4х - дневного субхронического введения афобазола.



**Рисунок 7. Метаболические отношения (МО) (Е-3174/лозартан) после субхронического введения афобазола крысам в дозе 25 мг/кг (n=8;  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ):**

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)

**Таблица 17. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) в суточной моче крыс после субхронического 3х дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг**

№/№	А	Б
1	2,8	8,2
2	1,7	6,8
3	2,6	5,9
4	1,9	5,1
5	0,9	2,4
6	7,2	13,3
7	3,3	4,6
8	1,5	2,1
<b>x</b>	<b>2,73</b>	<b>6,06*</b>
<b>SD</b>	<b>1,96</b>	<b>3,61</b>
<b>S<sub>x̄</sub></b>	<b>0,69</b>	<b>1,28</b>
<b>CV</b>	<b>71,8</b>	<b>59,6</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 3-х дневного введения афобазола

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

**Таблица 18. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) в суточной моче крыс после субхронического 4х дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг**

№/№	А	Б
1	2,17	2,77
2	1,71	3,25
3	0,79	4,90
4	1,93	6,88
5	0,92	1,39
6	1,67	3,02
7	1,16	2,20
8	1,52	2,34
<b>x</b>	<b>1,48</b>	<b>3,34*</b>
<b>SD</b>	<b>0,48</b>	<b>1,75</b>
<b>S<sub>x̄</sub></b>	<b>0,17</b>	<b>0,62</b>
<b>CV</b>	<b>33,4</b>	<b>52,4</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола

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

При сравнении величин метаболических отношений выявлены статистически значимые различия в контрольных группах в сравнении с введением лозартана на фоне 3-х и 4-х дневного введения афобазола ( $p < 0,05$ ). (Рис.7, табл.17, табл.18).

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

Как видно из рисунка 7, афобазол оказывает умеренный индуцирующий эффект на изофермент CYP2C9. Метаболическое отношение на фоне 3х - дневного введения афобазола превышает аналогичный параметр лозартана без

введения афобазола (контроль) в 2,2 раза. После 4х дневного введения анксиолитика данный параметр в сравнении с контрольной группой увеличился в 2,3 раза.

При сравнении МО после 3х и 4х-дневного введения афобазола статистически значимые различия не были выявлены ( $p < 0,05$ ). МО после субхронического 3х-дневного введения афобазола составило  $6,06 \pm 1,28$ . МО после субхронического 4х-дневного введения анксиолитика –  $3,34 \pm 0,62$  (Рис.7, табл.17, табл.18). Таким образом, продолжительность введения афобазола в течение 3х или 4х дней в дозе 25 мг/кг не влияет на выраженность индуцирующего эффекта изофермента CYP2C9.

Из литературы 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 (Levy R.H. et al. // 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. et al. // 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.

### **Заключение**

На крысах изучено влияние афобазола на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 (маркерный субстрат - лозартан). МО Е-3174/лозартан

определяли по концентрациям неизмененного соединения и его метаболита в суточной моче крыс.

Изучение влияния величины вводимой дозы на изменение активности изофермента CYP2C9 показало, что афобазол в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг после 4-х дневного введения (3 раза в день) не вызывает изменения активности изоформы CYP2C9. В то время как увеличение дозы афобазола до 25 и 75 мг/кг после субхронического введения препарата позволило выявить омепразол является умеренным конкурентным ингибитором CYP2C9. Дальнейшее её увеличение до 100 и 125 мг/кг вело к снижению индукции, что может быть объяснено насыщением активных центров изофермента молекулами афобазола. Изучение влияния продолжительности введения афобазола в дозе 25 мг/кг на изменение активности изофермента CYP2C9 показало, что введение афобазола в течение 3х или 4х дней не влияет на выраженность индуцирующего эффекта изофермента CYP2C9 (Грибакина О.Г. и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. Том 76, № 3. С. 35-37.).

## **Глава 4. 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.

Известно, что в организме лозартан метаболизируется в основном представителем суперсемейства цитохромов P450 изоферментом CYP2C9. Данный изофермент участвует в метаболизме таких препаратов, как нестероидные противовоспалительные средства, пероральные гипогликемические средства, фенитоина, непрямых антикоагулянтов (варфарин, аценокумарол) и других лекарственных веществ. Все это делает лозартан одним из наиболее широко используемых маркеров активности изофермента CYP2C9 для изучения комбинированного действия лекарственных препаратов (Testa B., Kramer S.D. // Weinheim: Wiley-VCH, 2008. Vol.1. 319 p.)/



#### **4.1. Влияние величины дозы афобазола на фармакокинетику лозартана и его метаболита у крыс**

В данном разделе представлены результаты влияния афобазола на фармакокинетику субстратного маркера CYP2C9 – лозартана и его метаболита E-3174 после введения анксиолитика крысам в дозах 5 и 25 мг/кг.

##### **Материалы и методы**

Изучение влияния афобазола на изофермент CYP2C9 проводили после перорального введения на белых крысах-самцах (масса тела  $200 \pm 20$  г), полученных из питомника “Столбовая” (см. гл. 2 раздел. 2.1.5). Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” при 12-ти часовом световом режиме.

Анализ проб плазмы крови крыс проводили с использованием метода ВЭЖХ. Методики извлечения из плазмы крови и количественного определения исследуемых веществ подробно изложена в гл. 2 (см. раздел. 2.2.5, 2.2.6.).

Для изучения влияния величины вводимой дозы на изучаемые процессы использовали эффективную, анксиолитическую дозу афобазола – 5 мг/кг (Seredenin S.B. // 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<sub>50</sub> афобазола для крыс составляет 1100 мг/кг (Соловьева И.К. //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. и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. Т. 70, №2. С.59-64.)

Пробы крови отбирали в течение 24 ч 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. Поскольку на каждую временную

точку использовали по 8 животных, результирующую фармакокинетическую кривую строили по усредненным концентрациям.

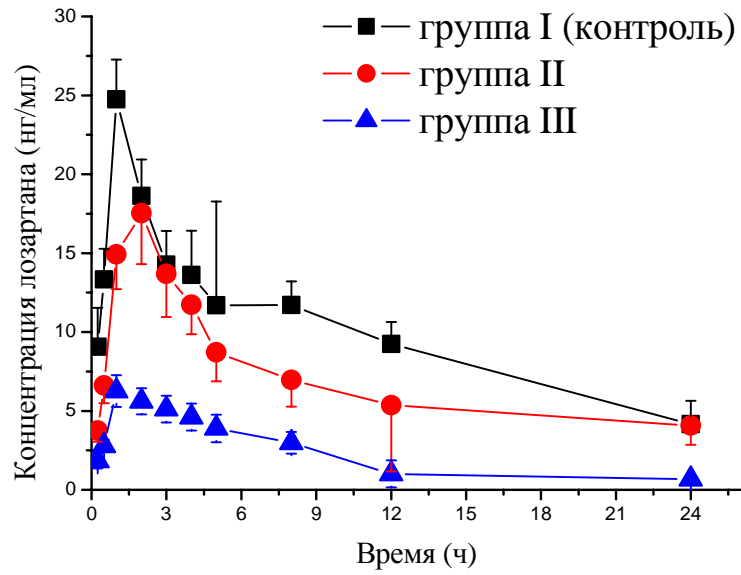
Фармакокинетические параметры лозартана и его метаболита подробно описаны в главе 2 (см. раздел 2.2.7).

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 (более 20% в некоторых случаях), сравнительная оценка изменений площади под фармакокинетической кривой проводилась от нуля до момента последнего отбора пробы, т.е.  $AUC_{0-t}$  (Табл.19-20). 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).

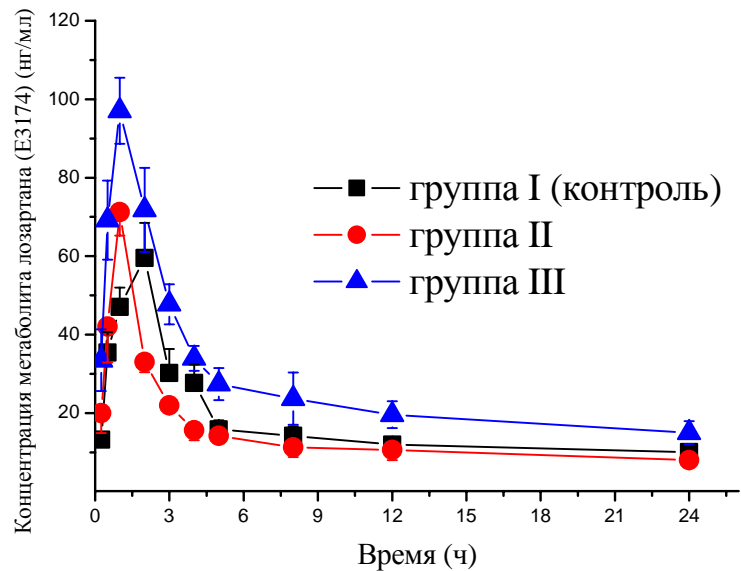
### **Результаты и их обсуждение**

На рисунке 8 представлены фармакокинетические кривые лозартана, а на рисунке 9 его метаболита E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах.

После перорального введения крысам лозартан подвергается интенсивной биотрансформации, и уже в первые минуты в плазме крови крыс регистрируется его метаболит E-3174. Неизмененное соединение и его метаболит определяются в плазме крови животных в течение 24 часов. Снижение концентраций лозартана носит двухфазный характер, а снижение концентраций его метаболита носит ярко выраженный двухфазный характер (Рис.8-9).



**Рисунок 8. Усредненные фармакокинетические кривые лозартана в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах.**



**Рисунок 9. Усредненные фармакокинетические кривые метаболита E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах.**

В таблице 19 представлены фармакокинетические параметры лозартана, а в таблице 20 его метаболита Е-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах.

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.19) показал, что изучаемое соединение всасывается из желудочно-кишечного тракта примерно с одинаковой скоростью (величины  $C_{max}/AUC_{0-t}$  составили 0,105 – 0,121 ч<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.

Как видно из таблицы 19, время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) лозартана в плазме крови в I и в III группах крыс составило 1,0 ч, во II группе – 2,0 ч. Максимальная концентрации ( $C_{max}$ ) лозартана в контрольной группе составила 24,74 нг/мл, во II группе – 17,53, в то же время величина  $C_{max}$  в III группе была значительно ниже и составила 6,26 нг/мл.

Анализ параметров кинетики позволяет заключить, что лозартан медленно выводится из организма, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы крови ( $K_{el}$ ), 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  $K_{el}$  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 ( $t_{1/2el}$ ) для крыс II группы составил 11,39 ч и 6,60 ч для животных III группы (Табл.19).

**Таблица 19. 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)

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.

Учитывая большие абсолютные величины периодов полуэлиминации лозартана препарат можно отнести к группе «долгоживущих» ЛВ.

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 ( $AUC_{0-T} = 166,64$  и  $51,85$  нг/мл·ч, соответственно) по сравнению с контролем ( $AUC_{0-T} = 235,58$  нг/мл·ч). Абсолютные величины  $AUC_{0-\infty}$  в плазме крови крыс II и III групп составили 221,47 и 56,82 нг/мл·ч. Величина  $AUC_{0-\infty}$  в контрольной группе составила 295,63 нг/мл·ч.

Величина общего 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.19).

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. Кажущийся объем распределения обычно неэквивалентен анатомическому объему, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так, если препарат связывается преимущественно белками крови,  $Vd/F$  будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения  $Vd/F$  над реальным. В нашем случае расчет величин  $Vd/F$  дал значительно большие результаты, указывающие, что лозартан распределяется во всех жидких средах организма животных и накапливается в тканях (Davies B., Morris T. // Pharm Res. 1993. Vol. 10, №7. P. 1093-1095.).

Необходимо отметить, что величины кажущихся объемов распределения у животных II и III групп, выше аналогичного параметра контрольной группы (в 1,5 и 3,3 раза, соответственно (Табл.19).

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 (Рис.9), и как следствие, значениями площадей под фармакокинетическими кривыми. Как видно из таблицы 20, время достижения максимальной концентрации E-3174 в плазме крови крыс контрольной группы составило 2,0 ч, во II и в III группе 1,0 ч. Сокращение времени наступления максимальной концентрации 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.20).

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

Из данных таблицы 20 видно, что E-3174 выводится из организма крыс всех трех групп примерно с одинаковой скоростью, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы крови, которые составили для крыс I группы –  $0,062 \text{ ч}^{-1}$ , для крыс II группы –  $0,070 \text{ ч}^{-1}$  и для крыс III группы –  $0,069 \text{ ч}^{-1}$ , соответственно. Оценка параметров, характеризующих продолжительность выведения метаболита лозартана из организма животных, показала, что величины периодов полуэлиминации 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.20).

Более медленное снижение концентраций E-3174 в плазме крови III группы крыс обуславливает увеличение величины площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-t}=645,11$  нг/мл×ч) по сравнению с контролем ( $AUC_{0-t}=406,75$  нг/мл×ч).



**Таблица 20. Фармакокинетические параметры метаболита Е-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах**

№/№ групп	Фармакокинетические параметры							
	AUC <sub>0-t</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	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)

Таким образом, с увеличением дозы афобазола до 25 мг/кг, вводимой в течение 4х дней, трехкратно через каждые 3 часа, интенсивность образования метаболита E-3174 возросла в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили лозартан без афобазола. 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.

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

Настоящий раздел является продолжением работы, описанной в разделе 4.1.

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 метаболических отношений. 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 и их обсуждение**

Для удобства обсуждения результатов, данные таблиц 19 и 20, касающиеся параметра «площадь под фармакокинетической кривой» ( $AUC_{0-t}$ ) лозартана и его

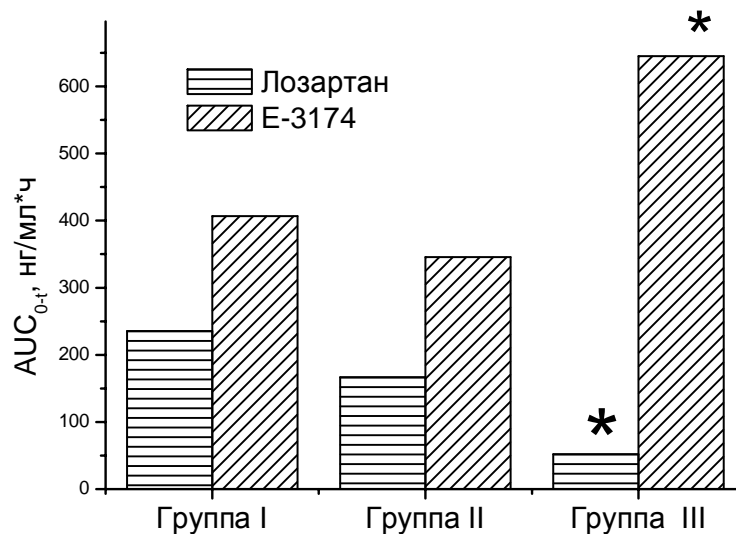
метаболита E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в дозах 5 и 25 мг/кг, обобщены в таблицу 21.

**Таблица 21. Значения параметра «площадь под фармакокинетической кривой» ( $AUC_{0-t}$ , нг/мл×ч) лозартана и его метаболита в плазме крови крыс после различных режимов введения и доз афобазола**

<b>Исследуемые группы</b>	<b>Лозартан</b>	<b>E-3174</b>
Группа I (контроль)	235,58	406,75
Группа II	166,64	345,69
Группа III	51,85*	645,11*

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

Статистический анализ не выявил достоверно значимых различий как между величинами  $AUC_{0-t}$  лозартана так и метаболита E-3174 в плазме крови крыс групп I и II. Статистическая обработка проводилась по величинам концентраций лозартана и его метаболита в плазме крови в различные дискретные интервалы времени (см. раздел 2.2.8). В то же время были выявлены достоверно значимые различия как между величинами  $AUC_{0-t}$  лозартана так и метаболита E-3174 в плазме крови крыс контрольной группы и группы III (Табл. 21, рис. 10).

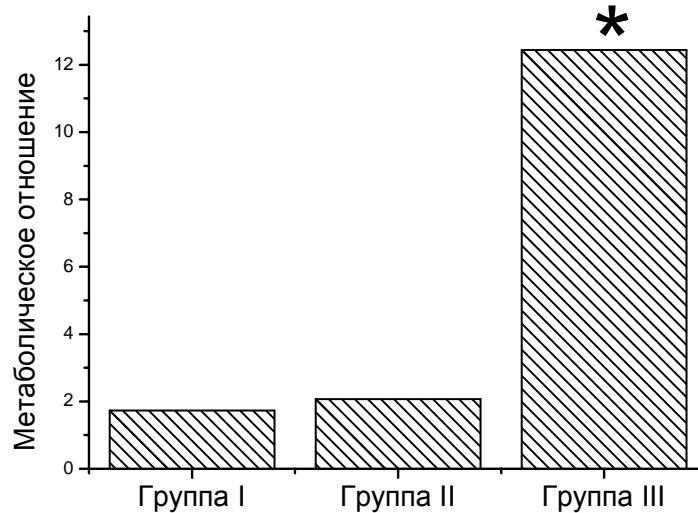


**Рисунок 10. Площади под фармакокинетическими кривыми (AUC<sub>0-t</sub>) лозартана и его метаболита Е-3174 после введения лозартана без афобазола (группа I) и на фоне 4-х дневного введения афобазола в дозах 5 мг/кг (группа II) и 25 мг/кг (группа III)**

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

Результаты исследования по изучению влияния эффективной, анксиолитической дозы афобазола на активность изоформы CYP2C9 представлены на рисунке 11. Статистический анализ не выявил достоверно значимых различий между величинами МО метаболита Е-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.11).



**Рисунок 11. Метаболические отношения 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)**

Примечание: \* -  $p=0,05$  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.

Известно, что ведущая роль в метаболизме бензимидазолов принадлежит изоферментам цитохрома P450 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 и CYP2C9. Производные бензимидазола могут быть как индукторами, так и ингибиторами, вышеперечисленных изоформ (Levy R.H. et al. // Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000. 793 p.).

Афобазол может применяться одновременно с другими лекарственными препаратами, метаболизируемыми изоформой цитохрома P450 CYP2C9, например, со многими нестероидными противовоспалительными средствами (диклофенак, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, лорноксикам,

мелоксикам), пероральными гипогликемическими препаратами (производные сульфонилмочевины), непрямыми антикоагулянтами (варфарин, аценокумарол), флуконазолом, рифампицином и другими, что требует выяснения возможных межлекарственных взаимодействий. Из литературы известно, что широко применяемое другое производное бензимидазола – омепразол является умеренным конкурентным ингибитором изофермента CYP2C9 (Ko J.W. et al. // *Drug Metab. Dispos.* 1997. Vol. 25, № 7 .P. 853-862.), пантопразол обладает наибольшей ингибирующей активностью среди замещенных бензимидазолов на данную изоформу *in vitro* (Li X. et al. // *Drug Metab Dispos.* Vol. 32, № 8. 2004. P. 821-827.).

Афобазол в отличие от вышеназванных производных бензимидазола в эффективной, анксиолитической дозе (5 мг/кг) не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего действия на активность изоформы CYP2C9. При увеличении дозы анксиолитика до 25 мг/кг выявлен умеренный индуцирующий эффект.

Учитывая высокую степень гомологичности изоформы CYP2C9 у крыс и человека (Lewis D.F. et al. // *Drug Metab Rev.* 2002. Vol. 34, № 1-2. P. 69-82.), можно предположить, что терапевтическая доза афобазола у человека (10 мг) также не будет влиять на изменение активности данной изоформы.

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

### **Заключение**

На крысах изучено влияние афобазола на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 (маркерный субстрат - лозартан). Афобазол вводили перорально в дозах 5 мг/кг и 25 мг/кг в течение 4-х дней, трехкратно через каждые 3 часа, лозартан – 30 мг/кг (однократно).

Фармакокинетические параметры маркера лозартана и его метаболита E-3174 на фоне 4-х дневного введения афобазола крысам в дозе 5 мг/кг достоверно не

отличались от аналогичных параметров, рассчитанных для контрольной группы животных. Следовательно, афобазол в эффективной, анксиолитической дозе не вызывает ни ингибирующего, ни индуцирующего действия на активность изоформы CYP2C9. Увеличение дозы в 5 раз при прочих равных условиях эксперимента приводит к достоверному изменению фармакокинетических параметров:  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $K_{el}$ ,  $t_{1/2el}$ , MRT, CL/F, Vd/F лозартана и  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  метаболита E-3174, что указывает на индукцию афобазолом изофермента CYP2C9.

Метаболическое отношение E-3174 к лозартану на фоне 4-х дневного введения афобазола в дозе 5 мг/кг также достоверно не отличалось от аналогичного параметра, рассчитанного для контрольной группы крыс. Увеличение дозы афобазола до 25 мг/кг позволило выявить умеренный индуцирующий эффект. Величина MO, полученная после 4-х дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг превышает аналогичную величину в контроле в 7,2 раза.

## **Глава 5. Оценка метаболических отношений препарата-маркера изофермента CYP2C9 после введения афобазола, стандартных индуктора и ингибитора у крыс**

Многие лекарственные препараты могут влиять на активность изоформ цитохрома P450, являясь либо его ингибиторами, либо индукторами, что может лежать в основе межлекарственного взаимодействия, и требует учета при сочетанной фармакотерапии. При этом ЛС способны как повышать активность ферментов метаболизма (индукция), так и снижать ее (ингибирование) (Кукес В.Г. и др. // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 293 с.; Testa V., Kramer S.D. // Weinheim: Wiley-VCH, 2008. Vol.1, 319 p.). Подобного рода активность новых лекарственных веществ (ЛВ) оценивается еще на доклиническом уровне с использованием экспериментальных животных либо *in vitro* методами. Несмотря на существенные технологические преимущества в проведении *in vitro* исследований, интерпретация, полученных параметров, остается проблематичной из-за недостатка оснований для количественной оценки данных *in vivo* - *in vitro* (Tucker G.T. et al. // Clin Pharmacol Ther. 2001. Vol. 70 P.103–114.).

Все выше сказанное, в той или иной степени, относится и к процессам, протекающим в организме крыс. Так, установлено, что белки CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 2D6 и 3A4 человека и CYP 1A1, 1A2, 2C13, 2C11 2D1 и 3A1(23) крыс гомологичны на 78%, 70%, 68%, 77%, 71% и 73%, соответственно. Другими словами, использование экспериментальных животных в исследованиях по выявлению межлекарственного взаимодействия в ряде случаев может оказаться полезным.

В Российской Федерации, США, Японии действуют рекомендации для разработчиков новых ЛС, в которых описаны правила проведения исследований, касающихся оценки действия тех или иных изоформ цитохрома P450 на биотрансформацию исследуемого ЛВ. Здесь же перечислены стандартные (классические) индукторы и ингибиторы активности различных изоформ



цитохрома P450 (Сычев Д.А. // М.: 2009. 32 с.); Bailie G.R. et al. // Med facts. - Bone: Care International, 2004. 69 p.).

При этом следует отметить, что списки этих веществ не являются чем-то неизменным, постоянным. Ежегодно они обновляются и дополняются.

Ранее нами было показано, что афобазол в эффективной (анксиолитической) дозе не является ни индуктором, ни ингибитором (Грибакина О.Г. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. Том 76, № 3. С. 35-37.). При этом осталась не определена степень избирательности используемого метода. Поэтому в данной работе предпринята попытка доказать правильность разработанной методологии на примере определения изменения активности изоформы CYP2C9 при введении стандартных ингибитора и индуктора данного изофермента в эффективных дозах 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.

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах (масса тела  $220 \pm 20$  г), полученных из питомника «Столбовая» РАМН. Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при 12-часовом световом режиме. За 12 ч до эксперимента животных лишали корма. Крыс содержали в индивидуальных клетках.

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).

Среди индукторов ферментов биотрансформации ЛС наиболее широко в клинической практике применяют рифампицин (индуктор изоферментов цитохрома P-450 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5-7) и

барбитураты (индукторы изоферментов цитохрома P-450 CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5-7). В отличие от барбитуратов, для развития индуцирующего эффекта которых требуется несколько недель, рифампицин действует быстро (индукцию ферментов биотрансформации при его назначении можно обнаружить уже через 2-4 дня), а своего максимума эффект достигает через 6-10 дней (Королева В.Г., Фомина И.П. // Антибиотики. 1976. Том 21, №8. С. 722-725.).

Противогрибковый препарат флуконазол угнетает активность изофермента цитохрома P-450 2C9 в дозе 100 мг/сут, а при повышении дозы до 400 мг также угнетается активность и изофермента цитохрома P-450 CYP3A4. Кроме того, чем выше доза ингибитора, тем быстрее наступает его действие и тем ярче оно выражено. Ингибирование вообще развивается быстрее, чем индукция, обычно его можно зарегистрировать уже через 24 ч от момента назначения препарата.

Эффективные дозы для ЛВ рассчитывали, исходя из терапевтических доз, рекомендованных для человека, по соответствующей формуле: (Reagan-Shaw S. et al. // FASEB J. 2008. Vol. 22, №3. P. 659-61.).

$HED (mg/kg) = Animal\ dose (mg/kg) \times Animal\ Km / Human\ Km$ , где

HED - эквивалентная доза для человека,

Km фактор для человека – 37,

Km фактор для крыс – 6.

Режим дозирования индуктора и ингибитора основывался на величинах периодов полувыведения исследуемых ЛВ (Королева В.Г., Фомина И.П. // Антибиотики. 1976. Том 21, №8. С. 722-725.; Louie A. et al. // 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).

Для изоформы CYP2C9 был выбран препарат-маркер лозартан, который

вводили перорально, однократно в дозе 30 мг/кг без и на фоне субхронического введения афобазола, рифампицина и флуконазола.

Анализ биопроб (суточная моча крыс) проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофлуориметрическим детектированием (Пронина О.Г. (Грибакина) и др. // Вестник Московского Университета. 2012. Том.53. №2. С. 194-197).

Индуцирующий или ингибирующий эффекты оценивали по абсолютным величинам метаболических отношений. В данной главе под «метаболическим отношением» понимали отношение концентрации метаболита лозартана Е-3174 к концентрации исходного соединения в суточной моче.

На рисунке 12 представлены средние арифметические МО и соответствующие им стандартные отклонения средней арифметической ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).

Достоверность различий между величинами МО препарата-маркера после его однократного введения и введения на фоне субхронического введения афобазола и соответствующих индуктора и ингибитора оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента (Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. // М.:ГЭОТАР-МЕД, 2001. 256 с.).

### **Результаты и их обсуждение**

В Таблицах 22, 23, 24 и Рисунке 12 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.

**Таблица 22. Метаболические отношения (Е-3174 /лозартан) в суточной моче крыс после введения афобазола в дозе 5 мг/кг**

№/№	А	Б
1	3,48	6,15
2	5,03	3,70
3	4,34	1,87
4	2,0	4,53
5	8,0	10,6
6	2,58	5,64
7	3,45	2,07
8	4,02	3,39
<b>x</b>	<b>4,11</b>	<b>4,74</b>
<b>SD</b>	<b>1,84</b>	<b>2,81</b>
<b>S<sub>x̄</sub></b>	<b>0,65</b>	<b>0,99</b>
<b>CV</b>	<b>44,8</b>	<b>59,3</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения афобазола

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

**Таблица 23. Метаболические отношения (Е-3174 /лозартан) в суточной моче крыс после введения рифампицина в дозе 13,4 мг/кг**

№/№	А	Б
1	0,18	0,25
2	1,03	1,60
3	0,66	1,76
4	2,38	4,22
5	0,40	0,46
6	4,38	5,77
7	1,20	2,97
8	1,62	2,81
<b>x</b>	<b>1,48</b>	<b>2,48</b>
<b>SD</b>	<b>1,36</b>	<b>1,87</b>
<b>S<sub>x̄</sub></b>	<b>0,48</b>	<b>0,66</b>
<b>CV</b>	<b>91,9</b>	<b>75,4</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения рифампицина

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

**Таблица 24. Метаболические отношения (Е-3174 /лозартан) в суточной моче крыс после введения флуконазола в дозе 35,7 мг/кг**

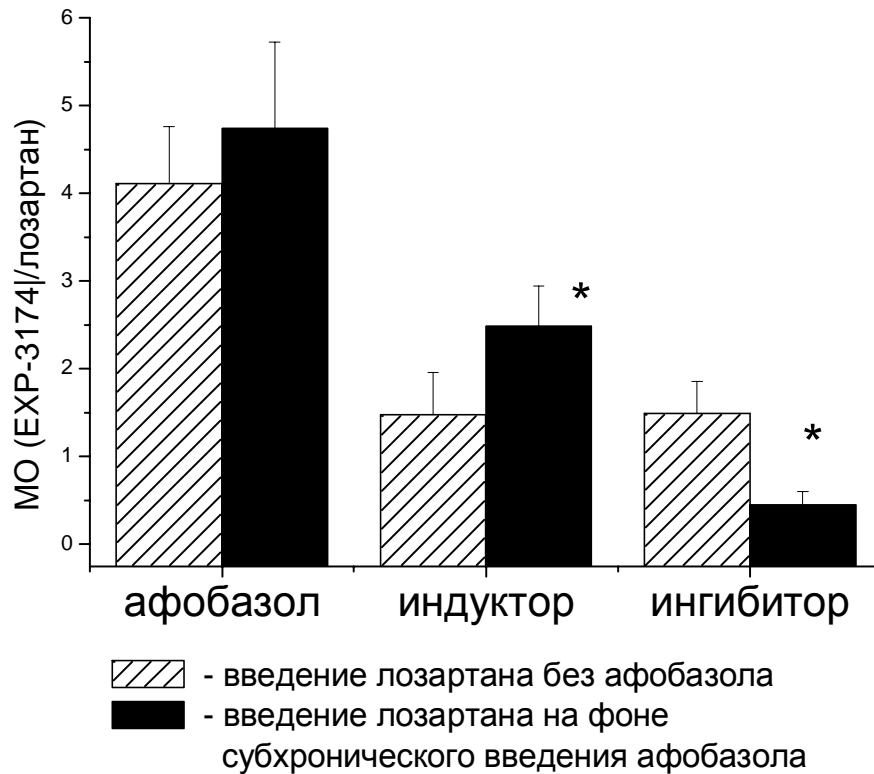
№/№	А	Б
1	0,60	0,30
2	2,42	0,20
3	1,07	0,22
4	0,36	0,13
5	1,82	0,48
6	0,80	0,19
7	1,30	1,44
8	3,56	0,64
<b>x</b>	<b>1,49</b>	<b>0,45</b>
<b>SD</b>	<b>1,07</b>	<b>0,43</b>
<b>S<sub>x̄</sub></b>	<b>0,38</b>	<b>0,15</b>
<b>CV</b>	<b>71,8</b>	<b>95,5</b>

Примечание:

А – введение лозартана без афобазола

Б – введение лозартана на фоне 4-х дневного введения флуконазола

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



**Рисунок 12. Метаболические отношения Exр-3174 к лoзартану после введения афобазола, индуктора и ингибитора изофермента СYP 2С9:**

По оси ординат – метаболическое отношение;

По оси абсцисс – индуктор (рифампицин), ингибитор (флуконазол);

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

Из рисунка 12 видно, что после перорального субхронического введения крысам афобазола в эффективной дозе 5 мг/кг индуцирующий/ингибирующий эффект на изофермент СYP2С9 не выявлен ( $p < 0,05$ ). Так, после введения лoзартана без афобазола МО составило  $4,11 \pm 0,65$ , а после введения лoзартана 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 ( $p < 0,05$ ). МО после однократного введения лoзартана 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  $1,49 \pm 0,38$ , а после его субхронического введения –  $0,45 \pm 0,15$ . При этом выявлены статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ). 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).

### **Заключение**

На крысах изучено влияние субхронического перорального введения в эффективных дозах афобазола, индуктора рифампицина и ингибитора флуконазола на изменение метаболических отношений препарата-маркера активности изофермента CYP2C9 лозартана. Афобазол в эффективной дозе 5 мг/кг не является ни индуктором, ни ингибитором. После перорального введения индуктора выявлены статистически значимые индуцирующие эффекты. В случае введения ингибитора наблюдались противоположные эффекты. Для оценки активности изоформы CYP2C9 нами доказана возможность использования в качестве модели крыс. Данный подход может быть полезен при изучении межлекарственных взаимодействий новых ЛВ на этапе их доклинического изучения.



## Общее 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 Exr-3174 в биологическом материале на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофлуориметрическим 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 сокращений и обозначений

- АГ – артериальная гипертензия
- ВС – внутренний стандарт
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГФ – государственная фармакопея
- ЛВ – лекарственное вещество
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛС – лекарственное средство
- МНО – международное нормализованное отношение
- МО – метаболическое отношение
- AUC – площадь под фармакокинетической кривой
- $C_{\max}$  – максимальная концентрация лекарственного вещества в плазме крови
- CYP – цитохром P450-зависимая монооксигеназа
- $f_a$  – абсолютная биодоступность
- MRT – среднее время пребывания ЛВ в организме
- $R_t$  – время удерживания
- $T_{\max}$  – время достижения максимальной концентрации препарата в плазме крови после перорального введения
- E-3174 (EXP-3174) – активный метаболит лозартана – лозартановая кислота

## Список литературы

1. Агафонов, А.А. Программа M-ind системы параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов [Текст] / А.А. Агафонов, В.К. Пиотровский // Хим.-фарм.журн. - 1991. - № 10. - С.16-19.
2. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. - М.: Литтерра, 2008. - 132с.
3. 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 // Экспер. и клин. фармакол. - 2013. - Т.76, № 3. - С. 35-37.
4. Деримедведь, Л.В. Взаимодействие лекарств и эффективность фармакотерапии: Справочное пособие для врачей и фармацевтов / Л.В. Деримедведь, И.М. Перцев, Е.В. Шуванова, И.А. Зупанец, В.Н. Хоменко; Под ред. проф. И.М. Перцева.— Х.: Изд-во «Мегаполис», 2002.— 784 с.
5. Жердев, В.П. Взаимодействие лекарственных средств в зависимости от направлений и интенсивности их биотрансформации [Текст] / В.П. Жердев, А.О. Виглинская, Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин // Тезисы 5-й Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», Москва. - 2010. - с. 15
6. Каркищенко, Н.Н. Фармакокинетика / Н.Н. Карнищенко. – Ростов н/Д: Феникс, 2001. – 384 с.
7. Королева, В.Г. Фармакокинетика рифампицина у экспериментальных животных [Текст] / И.П. Фомина // Антибиотики. - 1976. - Том 21, №8. - С. 722-725.
8. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология и фармакотерапия / В.Г.Кукес, А.К. Стародубцев. - М.: ГЕОТАР-МЕД, 2003. - 640 с.
9. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология: учебник для вузов/ Под ред. В.Г. Кукеса.- 4-е издание, перераб. и доп.– М: ГЭОТАР-МЕД, 2008. - 1056 с.
10. Кукес, В.Г. Клиническая фармакокинетика: теоретические, прикладные и

аналитические аспекты: Руководство/ Под ред. В.Г. Кукеса – М: ГЭОТАР-МЕД, 2009. - 432 с.

11. Кукес, В.Г. Метаболизм лекарственных препаратов / В.Г.Кукес, В.П. Фисенко. - М.: Палея-М, 2001.-133с.

12. Кукес, В.Г. 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. с.293.

13. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств/А.Н. Миронов. - Тула: ЗАО «Гриф и К», 2012. - 944 с.

14. 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 // Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия. - 2012. - Том. 53, №2. – С.194-197.

15. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [Текст] / Под ред. Р.У. Хабриева.– 2-изд. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. - С. 217-229.

16. Сергиенко, В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях/ В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева – М.:ГЭОТАР-МЕД, 2001. - 256 с.

17. Середенин, С.Б. Фармакогенетическая концепция анксиолитического эффекта [Текст] /С.Б. Середенин, Т.А. Воронина, Г.Г. Незнамов// Вестник РАМН. - 1998. - №11. - С.3-9.

18. Середенин, С.Б. Фармакокинетика афобазола у крыс [Текст] / С.Б.Середенин, А.О. Виглинская, Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин, О.Ю.Кравцова, В.П. Жердев // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2007.- Т.70, №2. - С.59-64102.

19. Соловьева, И.К. Анксиолитики: вчера, сегодня, завтра [Текст] /И.К. Соловьева // Российский медицинский журнал. - 2006. - Т.14, №5. - С. 385–388.

20. Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии / Под ред. И.С. Чекмана, А.П. Пелешука, О.А. Пятака.— К.: Здоровья, 1986.— 736 с.

21. Сычев, Д.А. Фармакокинетическое взаимодействие лекарственных

средств с фруктовыми соками. Клиническое значение / Д.А. Сычев, Г.С. Аникин, Е.К. Александрова, М.В. Щадрина, В.В. Смирнов, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес// Клиническая фармакология и фармакоэкономика. - 2008. - Т.1, №2. - С. 57-67.

22. 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 / Д.А. Сычев. - М.: 2009. - 32 с.

23. Харкевич, Д.А. Фармакология / Д.А. Харкевич: Учебник — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 736 с.

24. Adedoyin, A. Stereoselective disposition of hexobarbital and its metabolites: relationship to the S-mephenytoin polymorphism in Caucasian and Chinese subjects [Text] / A. Adedoyin, C. Prakash, D. O'Shea, I.A. Blair, G.R. Wilkinson // Pharmacogenetics. - 1994. - Vol. 4, № 1. - P.27-38.

25. Agrawal, A.K. Gender, age and dose effects of neonatally administered aspartate on the sexually dimorphic plasma growth hormone profiles regulating expression of the rat sex-dependent hepatic CYP isoforms [Text] / A.K. Agrawal, B.H. Shapiro // Drug Metab. Dispos. - 1997. - Vol. 25, № 11. - P.1249-1256.

26. Andersson, T. Polymorphic hydroxylation of S-mephenytoin and omeprazole metabolism in Caucasian and Chinese subjects [Text] / T. Andersson, C.G. Regardh, Y.C. Lou, Y. Zhang, M.L. Dahl, L. Bertilsson // Pharmacogenetics. - 1992. - Vol. 2, № 1. - P.25-31.

27. Anzenbacher, P. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics [Text] / P. Anzenbacher, E. Anzenbacherová // CMLS, Cell. Mol. Life Sci. – 2001. –Vol. 58, № 5-6. – P. 737–747.

28. Archakov, A.I. Cytochrome P450 and active oxygen / A.I. Archakov, G.I. Bachmanova // London-New York-Philadelphia: Taylor & Francis, 1990. - 435p.

29. Bailie, G.R. 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.

30. Barry, M. Enzyme induction and inhibition [Text] / M. Barry, J. Feely // *Pharmac. Ther.* - 1990. - Vol. 48, № 1. - P. 71-94.
31. Brockmüller, J. Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment [Text] / J. Brockmüller, J. Kirchheiner, C. Meisel, I. Roots // *Pharmacogenomics.* - 2000. - Vol. 1, № 2. - P. 125-51.
32. Cao, X. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model [Text] / X. Cao, S. Gibbs, L. Fang, H. Miller, C. Landowski, H. Shin // *Pharm Res.* - 2006. - Vol. 23, № 8. - P. 1675–1686.
33. Chang, G.W. The physiological roles of cytochrome P450 isoenzymes [Text] / G.W. Chang, P.C.A. Kam // *Anaesthesia.* - 1999. - Vol. 54, № 1. - P. 42.
34. Chen, T.L. Cytochrome P-450-dependent monooxygenase system and anesthetics [Text] / T.L. Chen, C.J. Lin, C.C. Liu // *Acta Anaesthesiol. Sin.* – 1995. - Vol. 33, № 3. – P. 185-194.
35. Choi, D.H. Effects of myricetin, an antioxidant, on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite, EXP-3174, in rats: possible role of cytochrome P450 3A4, cytochrome P450 2C9 and P-glycoprotein inhibition by myricetin [Text] / D.H. Choi, C. Li, J.S. Choi // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* - 2010. - Vol. 62, № 7. - P. 908-914.
36. Christensen, L.K. Sulphaphenazole-induced hypoglycaemic attacks in tolbutamide-treated diabetics [Text] / L.K. Christensen, J.M. Hansen, M. Kristensen // *Lancet.* - 1963. - Vol. 2, № 7321. - P. 1298–1301.
37. Danielson, P.B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans [Text] / P.B. Danielson // *Curr. Drug Metab.* - 2002. - Vol. 3, № 6. – P. 561- 597.
38. Davies, B. Physiological parameters in laboratory animals and humans [Text] / B. Davies, T. Morris // *Pharm Res.* - 1993. - Vol. 10, № 7. - P. 1093-1095.
39. DeLozier, T.C. Functional characterization of novel allelic variants of CYP2C9 recently discovered in southeast Asians [Text] / T.C. DeLozier, S.C. Lee,



S.J. Coulter, Goh BC, Goldstein JA // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2005. - Vol. 315, №3. - P.1085-90.

40. Dickstein, K. Losartan: a selective angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist for the treatment of heart failure [Text] / K. Dickstein, P. Timmermans, R. Segal // *Expert Opin Investig Drugs.* - 1998. – Vol. 7, №11. - P.1897-1914.

41. Doherty, M.M. The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism [Text] / M.M. Doherty, W.N. Charman // *Clin. Pharmacokinet.* - 2002. - Vol. 41, № 4. - P.235 – 253.

42. Donner, K.M. CYP2C9 genotype modifies activity of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive men [Text] / K.M. Donner, T.P. Hiltunen , T. Suonsyrjä , T. Hannila-Handelberg , I. Tikkanen , M. Antikainen, A. Hirvonen , K. Kontula // *J Hypertens.* - 2009. - Vol. 27, №10. - P.2001-2009.

43. Evans, G. A handbook of bioanalysis and drug metabolism / G. Evans. – CRS PPESS, 2004 – C. 398.

44. Ferguson, S.S. Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site [Text] / S.S. Ferguson, E.L. LeCluyse, M. Negishi, J.A. Goldstein // *Mol Pharmacol.* - 2002. - Vol. 62, № 3. - P. 737–746.

45. Ferguson, S.S. Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4alpha [Text] / S.S. Ferguson, Y. Chen, E.L. LeCluyse, M. Negishi, J.A. Goldstein // *Mol Pharmacol.* - 2005. - Vol. 68, № 3.- P.747–757.

46. Fischer, M. The Cytochrome P450 Engineering Database: A Navigation and Prediction Tool for the Cytochrome P450 Protein Family [Text] / M. Fischer, M. Knoll, D. Sirim, F. Wagner, S. Funke, J. Pleiss // *Bioinformatics.* - 2007. - Vol. 23, № 15. - P. 2015-2017.

47. Frye, R.F. Probing the world of cytochrome P450 enzymes [Text] / R.F Frye // *Mol Interv.* - 2004. - Vol. 4, №3. - P.157-162.

48. Frymoyer, A. Effect of single-dose rifampin on the pharmacokinetics of warfarin in healthy volunteers [Text] / A. Frymoyer, S. Shugarts, M. Browne, A.H.

Wu, L. Frassetto, L.Z. Benet// Clin Pharmacol Ther. -2010. - Vol. 88, № 4. - P.540-547.

49. García-Martín, E. Interethnic and intraethnic variability of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in healthy individuals [Text] / E. García-Martín, C. Martínez, J. Ladero, J. Agúndez // Mol Diagn Ther. - 2006. - Vol. 10, № 1. - P.29–40.

50. Gonzalez, F.G. Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice [Text] / F.G. Gonzalez, S. Kimura // Archives of Biochemistry and Biophysics. - 2003 . - Vol. 409, № 1. - P. 153–158.

51. Gonzalez, F.J. Debrisoquine 4-hydroxylase: characterization of a new P-450 gene subfamily, regulation, chromosome mapping, and molecular analysis of the DA rat polymorphism [Text] / F.J. Gonzalez, T. Matsunaga, K. Nagata // DNA. - 1987. - Vol.6, № 2. - P.149-161.

52. Gorski, J.C. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity in vivo [Text] / J.C. Gorski, S.M. Huang, A. Pinto, M.A. Hamman, J.K. Hilligoss // Clin Pharmacol Ther. - 2004. - Vol.75, №1. - P.89-100.

53. Grant, P. Warfarin and cranberry juice: an interaction [Text] / P. Grant // J Heart Valve Dis. - 2004.- Vol. 13, №1.- P. 25-6.

54. Guengerich, F.P. Human cytochrome P450 enzymes. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry [Text] / F.P. Guengerich // Kluwer Academic/Plenum Press, 2005. - P. 377–531.

55. Gurley, J. Cytochrome P450 phenotypic ratio for predicting herb-drug interaction in humans [Text] / J. Gurley, S.F. Gardner, M.A. Hubbard, D.K. Williams, W.B. Gentry, Y. Cui, C.Y. Ang // Clinical pharmacology and therapeutics. - 2002. - Vol.72, №3. - P.276-287.

56. Hamman, M.A. Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C [Text] / M.A. Hamman, G.A. Thompson, S.D. Hall // Biochem Pharmacol. - 1997. - Vol.54, №1. - P.33-41.

57. Han, Y. Effect of silymarin on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite E-3174 in healthy Chinese volunteers [Text] / Y. Han, D. Guo, Y. Chen, Y.

Chen , Z.R. Tan , H.H. Zhou // Eur J Clin Pharmacol. - 2009. - Vol. 65, №6. - P.585-91.

58. He, S.M. Clinical drugs undergoing polymorphic metabolism by human cytochrome P450 2C9 and the implication in drug development [Text] / S.M. He, Z.W. Zhou , X.T. Li , S.F. Zhou // Curr Med Chem. - 2011. - Vol. 18, № 5. - P.667-713.

59. Hidaka, M. Inhibitory effects of fruit juices on cytochrome P450 2C9 activity in vitro [Text] / M. Hidaka, M. Nagata, Y. Kawano, H. Sekiya, H. Kai, K. Yamasaki, M. Okumura, K. Arimori // Biosci Biotechnol Biochem. - 2008. - Vol. 72, № 2. - P.406-11.

60. Ingelman-Sundberg, M, Daly AK and Nebert DW Home Page of the Human CytochromeP450 (CYP) Allele Nomenclature Committee, Available at. 2008. URL: <http://www.cypalleles.ki.se/>.

61. Ito, K. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug–drug interactions: metabolic interaction in the liver [Text] / K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, K. Ueda, H. Suzuki, Y. Sugiyama // Pharmacol Rev. - 1998. - Vol. 50, №3. - P. 387–412.

62. Kazierad, D.J. Effect of fluconazole on the pharmacokinetics of eprosartan and losartan in healthy male volunteers [Text] / D.J. Kazierad, D.E. Martin , R.A. Blum , D.M. Tenero , B. Ilson , S.C. Boike , R. Etheredge , D.K. Jorkasky // Clin Pharmacol Ther. - 1997. - Vol.62, №4 .- P.417-25.

63. Klose, T.S. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs [Text] / T.S. Klose, J.A. Blaisdell, J.A. Goldstein // J Biochem Mol Toxicol. - 1999. - Vol. 13, № 6. - P.289-295.

64. Ko, J. In vitro inhibition of the cytochrome P450 (CYP450) system by the antiplatelet drug ticlopidine: potent effect on CYP2C19 and CYP2D6 [Text] / J. Ko, Z. Desta, N. Soukhova, T. Tracy, D. Flockhart // Br J Clin Pharmacol. - 2000. - Vol. 49, № 4. - P.343–351.

65. Ko, J.W. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms [Text] / J.W. Ko, N. Sukova, D. Thacker // Drug Metab. Dispos. - 1997. - Vol. 25, № 7.- P. 853-862.

66. Kobayashi, K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat [Text] / K. Kobayashi, K. Urashima, N. Shimada, K. Chiba // Biochem Pharmacol. - 2002. - Vol.63, №5. - P. 889-896.

67. Kobayashi, M. The effect of bucolome, a CYP2C9 inhibitor, on the pharmacokinetics of losartan [Text] / M. Takagi, K. Fukumoto, R. Kato, K. Tanaka, K. Ueno // Drug Metab Pharmacokinet. - 2008. - Vol 23, №2. -P.115-119.

68. Komoroski, B.J. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures [Text] / B.J. Komoroski, S. Zhang, H. Cai, J.M. Hutzler, R. Frye, T.S. Tracy, S.C. Strom, T. Lehmann, C.Y. Ang, Y.Y. Cui, R. Venkataramanan // Drug Metab Dispos. -2004. - Vol.32, №5.- P.512-518.

69. Kumar, V. Differential genotype dependent inhibition of CYP2C9 in humans [Text] / V. Kumar, R.C. Brundage, W.S. Oetting, I.E. Leppik, T.S. Tracy // Drug Metab Dispos. - 2008. - Vol. 36. - P.1242–1248.

70. Lapple, F. Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver [Text] / F. Lapple, O. von Richter, M.F. Fromm, T. Richter, K.P. Thon, H. Wisser, E.U. Griese, M. Eichelbaum, K.T. Kivisto // Pharmacogenetics. - 2003. - Vol.13, № 9. - P.565-575.

71. Lasker, J.M. Characterization of CYP2C19 and CYP2C9 from human liver: respective roles in microsomal tolbutamide, S-mephenytoin, and omeprazole hydroxylations [Text] / J.M. Lasker, M.R. Wester, E. Aramsombatdee, J.L. Raucy // Arch Biochem Biophys. - 1998. - Vol. 353, № 1. - P.16–28.

72. Lee, C.R. Tolbutamide, flurbiprofen, and losartan as probes of CYP2C9 activity in humans [Text] / C.R. Lee, J.A. Pieper, R.F. Frye, A.L. Hinderliter, J.A. Blaisdell // J Clin Pharmacol. - 2003. - Vol.43, №1. - P.84-91.

73. Lee, C.R. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data [Text] / C.R. Lee, J. Goldstein, J. Pieper // Pharmacogenetics. - 2002. - Vol. 12, № 3. - P. 251–263.

74. Lee, D. Effect of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous omeprazole in rats [Text] / D. Lee, H.S. Shin, S.K. Bae, M.G. Lee // Biopharm. Drug Dispos. - 2006.- Vol. 27, № 5. - P. 209-218.

75. Leemann, T. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver [Text] / T. Leemann, C. Transon, P. Dayer // Life Sci. - 1993. - Vol.52, №1. - P.29-34.

76. Levy, R.H. Metabolic drug interactions / R.H. Levy, K.E. Thummel, W.F. Trager. - Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000. - 793 p.

77. Lewis, D. Cytochrome P450. Substrate specificity and metabolism. In: Cytochromes P450: structure, function, and mechanism - Bristol: Taylor & Francis. 1996. - P.115–167.

78. Lewis, D.F. Structure-activity relationship for human cytochrome P450 substrates and inhibitors [Text] / S. Modi, M. Dickins // Drug Metab Rev. - 2002. - Vol. 34, № 1-2. - P. 69-82.

79. Li, A.P. Drug–drug interactions in pharmaceutical development / A.P. Li - New Jersey: WILEY, 2008. – 244 p.

80. Li, X. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities [Text] / X. Li, T.B. Andersson, M. Ahlström, L. Weidolf // Drug Metab Dispos. - 2004. - Vol. 32, № 8. - P. 821-827.

81. Lin, J. Species similarities and differences in pharmacokinetics [Text] / J. Lin // Drug Metab. Dispos. - 1995. - Vol. 23, №10. - P.1008-1021.

82. Liu, Y. UPLC-MS-MS method for simultaneous determination of caffeine, tolbutamide, metoprolol, and dapson in rat plasma and its application to cytochrome P450 activity study in rats [Text] / Y. Liu, X. Li, C. Yang, S. Tai, X. Zhang, G. Liu // J Chromatogr Sci. - 2013. - Vol.51, №1. - P.26-32.

83. Lo, M.W. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans [Text] / M.W. Lo, M.R. Goldberg, J.B. McCrea, H. Lu, C.I. Furtek, T.D. Bjornsson // *Clin Pharmacol Ther.* - 1995. - Vol.58, №6. - P.641-649.

84. Lofgren, S. Generation of mice transgenic for human CYP2C18 and CYP2C19: characterization of the sexually dimorphic gene and enzyme expression [Text] / S. Lofgren, R.M. Baldwin, M. Hiratsuka, A. Lindqvist, A. Carlberg, S.C. Sim, M. Schulke, M. Snait, A. Edenro, R. Fransson-Steen, Y. Terelius, M. Ingelman-Sundberg // *Drug Metab Dispos.* - 2008. - Vol. 36, № 5. - P.955–962.

85. Louie, A. 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 [Text] / A. Louie, Q-F. Liu, G.L. Drusano // *Antimicrob. Agents. Chemother.* - 1998. - Vol. 42, №6. - P. 1512-1514.

86. Lumholtz, B. Sulfamethizole-induced inhibition of diphenhydantoin, tolbutamide, and warfarin metabolism [Text] / B. Lumholtz, K. Siersbaek-Nielsen, L. Skovsted, J. Kampmann, J.M. Hansen // *Clin Pharmacol Ther.* - 1975. - Vol. 17, №6. - P.731-734.

87. Marino, M.R. Drug interactions with irbesartan [Text] / M.R. Marino, N.N. Vachharajani // *Clin Pharmacokinet.* - 2001. - Vol. 40, №8. - P.605-614.

88. Matsunaga, T. Molecular cloning of monkey CYP2C43 cDNA and expression in yeast [Text] / T. Matsunaga, S. Ohmori, M. Ishida, Y. Sakamoto, H. Nakasa, M. Kitada, // *Drug Metab Pharmacokinet.* - 2002. - Vol. 17, № 2. - P.117-124.

89. Meadowcroft, A.M. The effects of fluvastatin, a CYP2C9 inhibitor, on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers [Text] / A.M. Meadowcroft, K.M. Williamson, J.H. Patterson, A.L. Hinderliter, J.A. Pieper // *J Clin Pharmacol.* - 1999. - Vol. 39, №4. - P.418-424.

90. Meyer, U.A. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-molecular mechanisms [Text] / U.A. Meyer, R.C. Skoda, U.M. Zanger // *Pharmacol Ther.* - 1990. - Vol. 46, № 2. - P.297-308.

91. Mergenhagen, K.A. Elevated International Normalized Ratio after concurrent ingestion of cranberry sauce and warfarin [Text] / K.A. Mergenhagen, O. Sherman // *Am J Health Syst Pharm.* - 2008. - Vol. 65, №22. - P.2113-2116.
92. Miners, J.O. Cytochrome P450C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism [Text] / J.O. Miners, D.J. Birkett // *J Clin Pharmacol.* – 1998. - Vol. 45, №6. - P.525-538.
93. Morgan, E.T. Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in the rat [Text] / E.T. Morgan, C. MacGeoch, J.A. Gustafsson // *J Biol Chem.* - 1985. - Vol. 260, № 22. - P.11895-8.
94. Mugford, C.A. Sex-dependent metabolism of xenobiotics [Text] / C.A. Mugford, G.L. Kedderis // *Drug Metab Rev.* - 1998. - Vol. 30, № 3. - P. 441-498.
95. Munafo, A. Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist[Text] / A. Munafo, Y. Christen, J. Nussberger, L. Shum, R. Borland, R. Lee // *Clin Pharmacol Ther.* - 1992. - Vol. 51, № 5. - P. 513–521.
96. Nagai, N. Drug interaction studies on new drug applications: current situations and regulatory views in Japan[Text] / N.Nagai // *Drug Metab Pharmacokinet.* - 2010.- Vol.25, №1. - P. 3-15.
97. Nagata, M. Effects of Pomegranate Juice on Human Cytochrome P450 2C9 and Tolbutamide Pharmacokinetics in Rats [Text] / M. Nagata, M. Hidaka, H. Sekiya, Y. Kawano, K.Yamasaki, M. Okumura, K. Arimori // *Drug metabolism and disposition.* - 2007. – Vol. 35, №2. - P.302–305.
98. Nebert, D.W. P-450 Genes: structure, evolution, and regulation [Text] / D.W. Nebert, F.J. Gonzalez // *Ann. Rev. Biochem.* – 1987. – Vol. 56. – P. 945-993.
99. Nedelcheva, V. P450 in the rat and man: methods of investigation, substratespecificities and relevance to cancer [Text] / V. Nedelcheva, I. Gut // *Xenobiotica .* - 1994. - Vol. 24, № 12. - P.1151-1175.
100. Nelson, D.R. The P450 superfamily: update on newsequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature [Text] / D.R.

Nelson, T. Kamataki, D. J. Waxman, F.P. Guengerich, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, F.J. Gonzalez, M.J. Coon, , I.C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda, D. W. Nebert // DNA and Cell Biology. -1993. -Vol. 12, № 1. -P.1–51.

101. Park, J.Y. Effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide[Text] / J.Y. Park, K.A. Kim , P.W. Park , C.W. P ark , J.G. Shin // Clin Pharmacol Ther. - 2003. - Vol. 74, № 4. - P. 334-340.

102. Pascussi, J.M. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors [Text] / J.M. Pascussi, S. Gerbal-Chaloin, L. Drocourt, P. Maurel, M.J. Vilarem // Biochim Biophys Acta. - 2003. - Vol. 1619, № 3. - P.243–253.

103. Pham, D.Q. Interaction potential between cranberry juice and warfarin [Text] / D.Q. Pham, A.Q. Pham //Am J Health Syst Pharm. - 2007. - Vol. 64, № 5. - P.490–494.

104. Porter, T.D. Cytochrome P-450 multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms [Text] / T.D. Porter, M.J. Coon // J. Biol. Chem. - 1991. - Vol. 266, №21. - P. 13469-13472.

105. Rahman, A. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8 [Text] / A. Rahman, K. R. Korzekwa, J. Grogan, F.J. Gonzalez, J.W. Harris // Cancer Res. - 1994. - Vol.54, № 21. - P.5543-5546.

106. Rajnarayana, K. Bioavailability of diclofenac sodium after pretreatment with diosmin in healthy volunteers [Text] / K. Rajnarayana, A. Venkatesham , D.R. Krishna // Drug Metabol Drug Interact. - 2007. - Vol.22, №2-3. - P.165-174.

107. Reagan-Shaw, S. Dose translation from animal to human studies revisited [Text] /S. Reagan-Shaw , M. Nihal, N. Ahmad // FASEB J. - 2008. - Vol. 22, №3. - P. 659-61.

108. Reid, J. Rat and human liver cytochrome P-450 isoform metabolism of ecteinascidin743 does not predict gender-dependent toxicity in humans[Text] / J. Reid, M.J. Kuffel, S.L. Ruben, J.J. Morales, K.L. Rinehart, D.P. Squillace, M.M. Ames // Clin Cancer Res. - 2002. - Vol. 8, № 9. - P. 2952-2962.



109. Rodrigues A. D. Drug-Drug Interactions - 2nd ed. / A. D. Rodrigues - New Jersey: Informa healthcare, 2008. – 745 p.

110. Romac, D. Drug interactions in the intensive care unit [Text] / D. Romac, T. Albertson // Clinics in Chest Medicine. - 1999. – Vol. 20, №2. - P. 385-399.

111. Romkes, M.B. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily [Text] / M.B. Romkes, J.A. Faletto, J.L. Blaisdell, Raucy, J.A. Goldstein // Biochemistry. - 1991. - Vol. 30, № 13. - P. 3247-3255.

112. Rothstein, MA. Pharmacogenomics / MA. Rothstein. - Edinburgh: John Wiley & Sons, 2003. - 384 p.

113. Rowland, M. Clinical pharmacokinetics: concepts and applications / M. Rowland, T.N. - Baltimore: Tozer. Williams&Wilkins, 1995. - 745 p.

114. Schuetz, E.G. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans [Text] / E.G. Schuetz, A.H. Schinkel, M.V. Relling, J.D. Schuetz // Proc Natl Acad Sci. - 1996. - Vol. 93. - P. 4001–4005.

115. Schwarz, U.I. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene [Text] / U.I. Schwarz // Eur J Clin Invest. - 2003. - Vol.33, №2. - P. 23-30.

116. Sekino, K. Effect of the single CYP2C9\*3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects [Text] / K. Sekino, T. Kubota , Y. Okada , Y. Yamada , K. Yamamoto , R. Horiuchi , K. Kimura , T. Iga // Eur J Clin Pharmacol. - 2003. - Vol. 59, № 8-9. - P.589-592.

117. Seredenin, S.B. Genetic differences in response to emotional stress and tranquilizers [Text] / S.B. Seredenin// Psychopharmacol. Biol. Narcol. - 2003. - Vol.3, № 1-2. - P. 494-509.

118. Shimada, T. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians [Text] / T. Shimada,

M.Yamazaki, Y. Mimura, F. Inui, P. Guengerich // J.Pharmacol Exp Ther. - 1994. - Vol.270, № 1. - P. 414-423.

119. Sica, D.A. Clinical pharmacokinetics of losartan [Text] / D.A. Sica, T.W. Gehr, S. Ghosh // Clin Pharmacokinet. - 2005. – Vol. 44, №8. - P.797-814.

120. Soldner, A. HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT1 antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of human and rats [Text] / A. Soldner, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler // J Pharm Biomed Anal. - 1998. - Vol. 16, № 5. - P.863-873.

121. Stearns, R.A. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members [Text] / R.A. Stearns, P.K. Chakravarty, R. Chen, S.H. Chiu // Drug Metab Dispos. - 1995. - Vol.23, №2. - P.207-215.

122. Stearns, R.A. The metabolism of Dup 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, by rat, monkey and human liver slices [Text] / R.A. Stearns, R.R. Miller, G.A. Doss, P.K. Chakravarty, A. Rosegay, G.J. Gatto, S.H. Chiu // Drug Metab.Dispos. - 1992. - Vol.20, №2. - P.281-287.

123. Stephen, J. Identification of Rat and Human Cytochrome P450 Isoforms and a Rat Serum Esterase That Metabolize the Pyrethroid Insecticides Deltamethrin and Esfenvalerate [Text] / J. Stephen, J. Godin, A. Crow, J. E. Scollon, F. M. Hughes, J. M. DeVito, K. M. Ross // Drug Metabolism and Disposition. - 2007. - Vol. 35, № 9. - P.1664-1671.

124. Tamaki, T. EXP3174: the major active metabolite of losartan [Text] / T. Tamaki, A. Nishiyama, S. Kimura, Y. Aki, M. Yoshizumi, H. Houchi // Cardiovasc Drug. - 1997. - Vol. 15, № 2. - P.122–136.

125. Testa, B. The Biochemistry of drug metabolism: Principles, Redox Reactions, Hydrolyses /B.Testa, S.D. Kramer. - Weinheim: Wiley-VCH, 2008. - Vol.1. - 319 p.

126. Testa, B. The Biochemistry of drug metabolism: Conjugations, Consequences of Metabolism, Influencing Factors/B. Testa, S.D. Kramer. - Weinheim: WILEY-VCH, 2010. - Vol.2. - 588 p.

127. The Merck Manual.2012.
128. Thorir, D. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies [Text] / D. Thorir, T. Callaghan, J. Einolf, V. Fischer // Drug metabolism and disposition. - 2003. - Vol. 31, №7. - P.815–832.
129. Tracy, T.S. Involvement of multiple cytochrome P450 isoforms in naproxen O-demethylation [Text] / T.S. Tracy, C. Marra , S.A. Wrighton , F.J. Gonzalez , K.R. Korzekwa // Eur J Clin Pharmacol. - 1997. - Vol. 52, №4. - P.293-298.
130. Tucker, G.T. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus [Text] / G.T. Tucker, J.B. Houston, S.M. Huang // Clin Pharmacol Ther. - 2001. - Vol. 70. P.103–114.
131. Ushijima, K. Cranberry juice suppressed the diclofenac metabolism by human liver microsomes, but not in healthy human subjects [Text] / K. Ushijima, S. Tsuruoka, H. Tsuda, G. Hasegawa, Y. Obi , T. Kaneda , M. Takahashi , T. Maekawa , T. Sasaki , T.A. Koshimizu , A. Fujimura // J Clin Pharmacol. - 2009. - Vol. 68, №2. - P.194-200.
132. Varshney, E. Genotype-phenotype correlation of cytochrome P450 2C9 polymorphism in Indian National Capital Region [Text] / E. Varshney, N. Saha , M. Tandon , V. Shrivastava , S. Ali // Eur J Drug Metab Pharmacokinet. - 2013. - Vol. 38, № 4. - P. 275-281.
133. Verhoef, T.I. Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon [Text] / T.I. Verhoef, W.K. Redekop, A.K. Daly, van R.M. Schie, de A. Boer , A.H. Zee // Br J Clin Pharmacol. - 2014. - Vol. 77, №4. - P.626-641.
134. Walsky, R. Validated assays for human cytochrome p450 activities [Text] / R. Walsky, R. Scott Obach // Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Drug Metabolism. - 2004. - Vol. 32, № 6. - P. 647–660.
135. Wang, B. Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 2C9 gene and its clinical significance [Text] / B. Wang, J. Wang , S.Q. Huang , H.H. Su , S.F. Zhou // Curr Drug Metab. - 2009.- Vol.10, №7. - P.781-834.

136. Wang, G. Effect of soy extract administration on losartan pharmacokinetics in healthy female volunteers [Text] / G. Wang, C.Q. Xiao, Z. Li, D. Guo, Y. Chen, L. Fan, R.H. Qian, X.J. Peng, D.L. Hu, H.H. Zhou // *Ann Pharmacother.* - 2009. - Vol. 43, №6. - P. 1045-1049.

137. Wang, S.L. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese [Text] / S.L. Wang, J. Huang, M.D. Lai, J.J. Tsai // *Pharmacogenetics.* - 1995. Vol. 5, №1. - P.37-42.

138. Wang, Z. The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity [Text] / Z. Wang, J.C. Gorski, M.A. Hamman, S.M. Huang, L.J. Lesko, S.D. Hall // *Clin Pharmacol Ther.* - 2001. - Vol.70, №4. - P.317-326.

139. Wijnen, P.A. Review article: the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms [Text] / P.A. Wijnen, R.A. Buijsch, M. Drent, P.M. Kuijpers, C. Neef, A. Bast, O. Bekers, G.H. Koek // *Aliment Pharmacol Ther.* - 2007. - Vol. 26, Suppl.2. - P. 211- 219.

140. Williamson, K.M. Effects of erythromycin or rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers [Text] / K.M. Williamson, J.H. Patterson, R.H. McQueen, K.F. Jr Adams, J.A. Pieper // *Clin Pharmacol Ther.* - 1998. - Vol.63, №3. - P.316-23.

141. Yang, S. Effects of ticlopidine on pharmacokinetics of losartan and its main metabolite EXP-3174 in rats [Text] / Y. CHO, J. CHOI // *Acta Pharmacologica Sinica.* - 2011. - Vol. 32, № 7. - P.967–972.

142. Yao, C. Inhibition-based metabolic drug-drug interactions: predictions from in vitro data [Text] / R.H. Levy // *J Pharm Sci.* - 2002. - Vol. 91, № 9. - P. 1923–1935.

143. Yasar, U. Intra-individual variability in urinary losartan oxidation ratio, an in vivo marker of CYP2C9 activity [Text] / U. Yasar, M.L. Dahl, M. Christensen, E. Eliasson // *J Clin Pharmacol.* - 2002. - Vol. 54, №2. - P.183-185.

144. Yoshitani, T. Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats [Text] / T. Yoshitani, H. Yagi, N. Inotsume, M. Yasuhara // *Biol .Pharm.Bull.* - 2002. - Vol. 25, № 8. - P.1077–1083.

145. Yun, C.H. Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist losartan (DuP 753) in human liver microsomes. Role of cytochrome P4503A(4) in formation of the active metabolite EXP3174 [Text] / C.H. Yun, H.S. Lee, H. Lee, J.K. Rho, H.G. Jeong, F.P. Guengerich // *Drug Metab Dispos.* - 1995. - Vol. 23, №2. - P. 285-289.

146. Zanger, U. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation [Text] / U. Zanger, M. Turpeinen, K. Klein, M. Schwab // *Anal Bioanal Chem.* - 2008. - Vol. 392, № 6. - P.1093–1108.

147. Zaphiropoulos, P.G. Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis [Text] / P.G Zaphiropoulos // *Mol Cell Biol.* - 1997.- Vol.17. - P.2985-2993.

148. Zhang, J.G. A multi-endpoint evaluation of cytochrome P450 1A2, 2B6 and 3A4 induction response in human hepatocyte cultures after treatment with  $\beta$ -naphthoflavone, phenobarbital and rifampicin. [Text] / J.G. Zhang, T. Ho, A.L. Callendrello, C.L. Crespi, D.M. Stresser // *Drug Metab Lett.* - 2010. - Vol. 4, № 4. - P.185-194.

149. Zhang, S. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous evaluation of activities of five cytochrome P450s using a five-drug cocktail and application to cytochrome P450 phenotyping studies in rats [Text] / S. Zhang, N. Song, Q. Li, H. Fan, C. Liu // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* - 2008. - Vol. 871, № 1. - P.78-89.

150. Zhang, Z.Y. Warfarin analog inhibition of human CYP2C9-catalyzed S-warfarin 7-hydroxylation [Text] / Z.Y. Zhang, J. Kerr, R.S. Wexler, H.Y. Li, A.J. Robinson, P.P. Harlow, L.S. Kaminsky // *Thromb Res.* - 1997. - Vol. 88. - P.389–398.

151. Zhou, S.F. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development [Text] / S.F. Zhou, Z.W. Zhou, L.P. Yang, J.P. Cai // *Curr Med Chem.* - 2009. - Vol.16, №27.- P.3480-3675.

152. Zhou, S.F. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance [Text] / S.F. Zhou, Z.W. Zhou, M. Huang // Toxicology. - 2010. - Vol. 278, №2. - P.165-88.

### **Нормативные ссылки**

В настоящей диссертационной работе использованы ссылки на следующие стандарты и нормативные документы:

Приказ МЗ РФ №708н от 23.08.2010 г. “Об утверждении правил лабораторной практики”.

Приложение «Правила лабораторной практики» к Приказу Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 N 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики".

ГОСТ 1770-74. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 8.134-98. Государственная система обеспечения единства измерений. Шкала рН водных растворов.

ГОСТ 8.135-2004. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандарт-титры для приготовления буферных растворов - рабочих эталонов рН 2-го и 3-го разрядов. Технические и метрологические характеристики. Методы их определения.

ГОСТ 29224-91. Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения.

ГОСТ 24104-2001. Весы лабораторные.

Национальный стандарт Российской Федерации. Принципы надлежащей лабораторной практики. ГОСТ Р 53434-2009.