

## **In vivo** ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ОТНОШЕНИЯ МАРКЁРОВ CYP2C9 И CYP1A2 ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АФОБАЗОЛА В СРАВНЕНИИ СО СТАНДАРТНЫМИ ИНДУКТОРАМИ И ИНГИБИТОРАМИ ЦИТОХРОМОВ

Я. Г. Новицкая, О. Г. Грибакина, А. А. Литвин, Г. Б. Колыванов, В. П. Жердев, В. В. Смирнов, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

В опытах на крысах изучено влияние афобазола в эффективной дозе (5 мг/кг), индукторов (рифампицина — 13,4 мг/кг, фенитоина — 10,4 мг/кг) и ингибиторов (флуконазола — 35,7 мг/кг, ципрофлоксацина — 44,0 мг/кг) после субхронического введения внутрь на метаболическое отношение (МО) препаратов-маркёров активности CYP2C9 и CYP1A2. Установлено, что афобазол не изменял МО соединений, метаболизируемых изучаемыми изоформами цитохрома P-450. После введения внутрь стандартных индукторов и ингибиторов выявлены статистически значимые разнонаправленные эффекты, демонстрирующие целесообразность применения комплекса отобранных соединений, маркёров и модификаторов активности CYP2C9 и CYP1A2, для сравнительной оценки эффектов новых лекарственных веществ в опытах на крысах. Активность CYP1A2 рекомендовано анализировать по МО одного из двух метаболитов кофеина параксантина или теобромину, а CYP2C9 — по МО метаболита Exp-3174 к лозартану.

**Ключевые слова:** CYP2C9; CYP1A2; биотрансформация; метаболическое отношение; лекарственное взаимодействие

### **ВВЕДЕНИЕ**

Различные химические соединения, в том числе лекарства, могут влиять на ферменты биотрансформации лекарственных средств (ЛС), как повышая (индукция), так и снижая (ингибирование) их активность. Индукция и ингибирование ферментов биотрансформации ЛС имеют безусловное значение для фармакотерапии, составляя основу фармакокинетического взаимодействия. По определению взаимодействие ЛС (межлекарственное взаимодействие) — это количественное или качественное изменение эффектов, вызываемых ЛС при одновременном или последовательном применении двух и более препаратов [3, 18].

Поэтому влияние новых лекарств на изоформы цитохрома P-450 необходимо оценивать уже на доклиническом этапе в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Несмотря на технологические преимущества в проведении *in vitro* исследований, интерпретация полученных параметров остается проблематичной из-за невозможности корректной экстраполяции данных на целый организм [19]. Последнее определяет высокую вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Поэтому предпочтительным представляются опыты *in vivo* с использованием в качестве экспериментальной модели беспородных крыс. 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 [13]. Имеются обоснованные данные о сходстве в субстратной специфичности этих изоформ цитохрома P-450 у человека и крыс [10].

В соответствии с рекомендациями регуляторных органов, действующими в Евросоюзе, России, США и Японии, разработчики ЛС представляют информацию о био-

трансформации новых препаратов и их влиянии на участвующие в метаболизме лекарств изоформы цитохрома P-450. Для использования в качестве позитивного контроля приводятся стандартные индукторы и ингибиторы активности различных изоформ цитохрома P-450, набор которых ежегодно, с накоплением новой информации, обновляется и дополняется [7, 11, 16].

Ранее нами было показано, что афобазол в диапазоне анксиолитических доз не изменял активность изоферментов CYP2C9 и CYP1A2 [1, 4]. В настоящей работе предпринята попытка доказать адекватность и избирательность разработанной методологии на примере определения изменения активности изоформ CYP2C9 и CYP1A2 после введения стандартных ингибиторов и индукторов данных изоферментов в эффективных дозах у крыс.

### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование проводили на 48 белых беспородных крысах-самцах (220 ± 20 г), полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН при 12-часовом световом режиме в индивидуальных клетках. За 12 ч до эксперимента животных лишали корма. Изменение активности CYP2C9 под влиянием афобазола, индуктора или ингибитора проводили на выборке из 24 животных. Крыс разделили на 3 подгруппы по 8 особей в каждой. Такое же количество животных использовали для изучения влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности CYP1A2.

В качестве индуктора изоформы CYP2C9 использовали рифампицин (Рн). Для изоформы CYP1A2 — фенитоин (Фн). Оба препарата относятся к группе умеренных индукторов. В качестве ингибитора изоформы CYP2C9 использовали флуконазол (Фк). Для изоформы CYP1A2 — ципрофлоксацин (Цф). Фк относится к группе умерен-

<sup>1</sup> ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

ных ингибиторов, Цф — к сильным ингибиторам. Выбранные индукторы и ингибиторы рекомендованы для оценки активности соответствующих изоформ у человека [12].

Эффективные дозы всех 4 лекарственных веществ (ЛВ) рассчитывали, исходя из терапевтических доз для человека по соответствующей формуле [17]. Режим дозирования индукторов и ингибиторов основывали на величинах периодов полувыведения исследуемых ЛВ [2, 14, 15, 19]. Так, Рн и Фн вводили внутрь 3 раза в сутки через каждые 3 ч в течение 4 сут (субхроническое введение) в дозах 13,4 и 10,4 мг/кг, соответственно. Фк вводили внутрь 1 раз в сутки в течение 4 сут в дозе 35,7 мг/кг и Цф вводили 2 раза в сутки в течение 4 сут в дозе 44 мг/кг.

В исследовании использовали эффективную анксиолитическую дозу афобазола — 5 мг/кг (внутри 3 раза в сутки через каждые 3 ч в течение 4 сут).

Для изоформы СYP2C9 был выбран препарат-маркёр 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)], который вводили внутрь, однократно в дозе 30 мг/кг без и на фоне субхронического введения афобазола, Рн и Фл. У лозартана выявлен фармакологически активный метаболит — Ехр-3174 (лозартановая кислота) — (2-бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил)-[1,1'-бифенил]-4-ил]-метилимидазол-5-карбоновая кислота).

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности СYP2C9 крысам каждой подгруппы сначала вводили лозартан без афобазола, индуктора или ингибитора (контроль), затем по истечении трех суток этим же животным вводили афобазол (индуктор или ингибитор) в течение 4 сут (субхроническое введение). После последнего введения афобазола (индуктора или ингибитора) через 0,5 ч вводили лозартан.

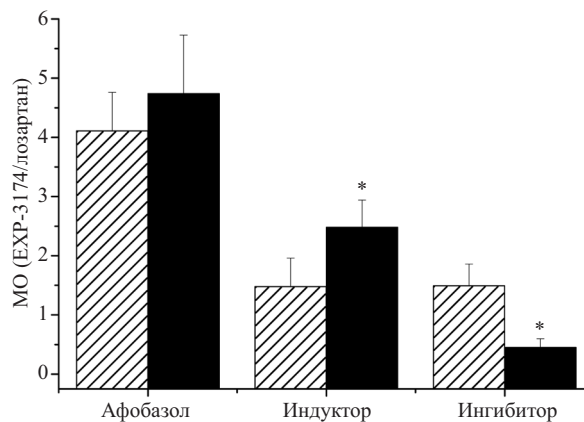
В качестве препарата-маркёра для изоформы СYP1A2 использовали кофеин (1,3,7-триметил-1Н-пурин-2,6(3Н,7Н)-дион), который вводили животным внутрь, однократно в дозе 50 мг/кг без и на фоне субхронического введения афобазола, Фн и Цф. Помимо кофеина измеряли концентрации двух его метаболитов (параксантина — 1,7-диметил-3Н-пурин-2,6-дион и теобромин — 3,7-дигидро-3,7-диметил-1Н-пурин-2,6-дион).

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности СYP1A2 крысам каждой подгруппы сначала вводили кофеин без афобазола, индуктора или ингибитора (контроль), затем по истечении трех суток этим же животным вводили афобазол (индуктор или ингибитор) в течение 4 сут (субхроническое введение). Последнее введение афобазола (индуктора или ингибитора) производили вместе с кофеином.

Анализ биопроб (суточная моча крыс) проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с различными типами детекции [5, 6].

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности изоформы СYP2C9 сбор мочи проводили по следующей схеме:

**Контроль.** После введения лозартана без афобазола (индуктора или ингибитора) крыс помещали в индивиду-



**Рис. 1.** Метаболические отношения Ехр-3174 к лозартану в моче крыс после введения афобазола, индуктора и ингибитора изоформы СYP 2C9.

По оси ординат — метаболическое отношение, по оси абсцисс — индуктор (рифампицин — Рн), ингибитор (флуконазол — Фк). Заштрихованные столбики — введение лозартана без афобазола индуктора или ингибитора, темные — введение лозартана на фоне субхронического введения афобазола, индуктора или ингибитора.

\* — статистически значимые различия при  $p \leq 0,05$  в сравнении с введением лозартана без афобазола.

альные 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) через 0,5 ч вводили лозартан, затем крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Отсчет времени начинался после введения препарата-маркера.

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности СYP1A2 сбор мочи крыс проводили по следующей схеме:

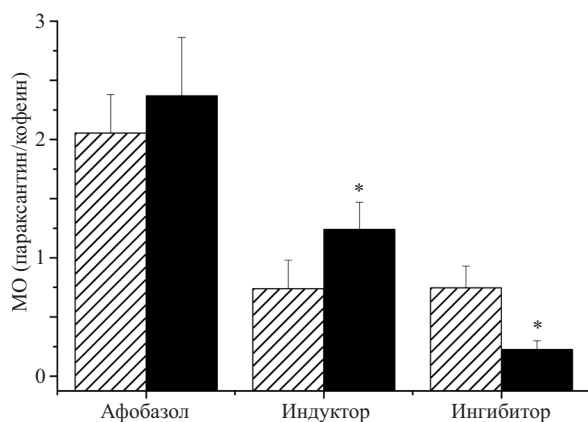
**Контроль.** После введения кофеина без афобазола (индуктора или ингибитора) крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Отсчет времени начинался после введения препарата-маркёра.

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

Индукцирующий или ингибирующий эффекты оценивали по абсолютным величинам метаболических отношений. Метаболическое отношение (МО) — это отношение концентрации метаболита к концентрации неизменного ЛВ в моче.

На рисунках представлены средние арифметические МО и соответствующие им стандартные ошибки средних арифметических ( $\bar{x} \pm \sigma_x$ ).

Достоверность различий между величинами МО препаратов-маркёров после их однократного введения и на фоне субхронического введения афобазола и соответ-



**Рис. 2.** Метаболические отношения параксантина к кофеину в моче крыс после введения афобазола, индуктора и ингибитора изоформы CYP1A2.

По оси ординат — метаболическое отношение, по оси абсцисс — индуктор (фенитоин — Фн), ингибитор (ципрофлоксацин — Цф). Заштрихованные столбики — введение кофеина без афобазола, индуктора или ингибитора, темные — введение кофеина после субхронического введения афобазола, индуктора или ингибитора.

Здесь и на рис. 3: \* — статистически значимые различия при  $p \leq 0,05$  в сравнении с введением кофеина без афобазола.

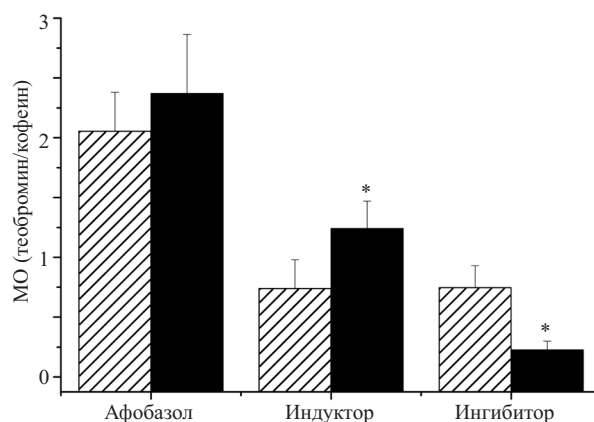
вующих индукторов и ингибиторов оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты исследования влияния афобазола, индуктора — Рф и ингибитора — Фк на изменение активности изоформы CYP2C9, оцениваемое по МО субстратного маркера — лозартана и его метаболита. После субхронического введения внутрь крысам афобазола в дозе 5 мг/кг индуцирующий/ингибирующий эффект на CYP2C9 не был выявлен. Так, после введения лозартана без афобазола МО составило  $4,11 \pm 0,65$ , а после введения лозартана на фоне субхронического введения афобазола —  $4,74 \pm 0,99$ . В то же время, после субхронического введения внутрь индуктора Рф в эффективной дозе выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p \leq 0,05$ ). МО после однократного введения лозартана без Рн составило  $1,48 \pm 0,48$ , а после субхронического введения маркера —  $2,48 \pm 0,66$ . Таким образом, индукция изоформы CYP2C9, вызванная Рф, привела к увеличению МО, что свидетельствует о повышении интенсивности биотрансформации лозартана.

В случае введения крысам ингибитора — Фк наблюдали противоположный эффект. Так, МО после однократного введения лозартана без Фк составило  $1,49 \pm 0,38$ , а после его субхронического введения —  $0,45 \pm 0,15$ . Следовательно, ингибирование изоформы CYP2C9, вызванное Фк, привело к снижению интенсивности биотрансформации маркерного препарата и уменьшению значения МО.

Несмотря на то что используемые в настоящем исследовании Рф и Фк относятся к группе, так называемых, умеренных индукторов и ингибиторов, выраженность



**Рис. 3.** Метаболические отношения теобромину к кофеину после введения афобазола, индуктора и ингибитора изоформы CYP1A2.

По оси ординат — метаболическое отношение, по оси абсцисс — индуктор (фенитоин — Фн), ингибитор (ципрофлоксацин — Цф). Заштрихованные столбики — введение кофеина без афобазола, ингибитора и индуктора, темные — введение кофеина на фоне субхронического введения афобазола, ингибитора или индуктора.

Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

ингибирования CYP2C9 у крыс в 2 раза выше степени индукции (3,31 и 1,68, соответственно).

На рис. 2 и 3 представлены результаты исследования влияния афобазола, а так же индуктора — Фн и ингибитора — Цф (в эффективных дозах) на изменение активности изоформы CYP1A2, оцениваемое по МО метаболитов (параксантина и теобромину) субстратного маркера — кофеина к неизменному ЛВ. Из рис. 2 видно, что после субхронического введения крысам внутрь афобазола в дозе 5 мг/кг индуцирующий/ингибирующий эффект на CYP1A2 не выявлен. Так, после введения кофеина без афобазола МО, определяемое по отношению концентраций параксантина к кофеину, равнялось  $1,21 \pm 0,46$ , а после введения кофеина на фоне субхронического введения афобазола внутрь —  $1,30 \pm 0,31$ . В то же время после субхронического введения индуктора Фн в эффективной дозе выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p \leq 0,05$ ). МО после однократного введения кофеина без Фн составило  $1,17 \pm 0,15$ , а после субхронического введения маркера —  $1,87 \pm 0,20$ . Таким образом, индукция изоформы CYP1A2, вызванная Фн, привела к повышению интенсивности биотрансформации препарата-маркера и увеличению МО.

В случае введения животным ингибитора — Цф наблюдали противоположный эффект. Ингибирование изоформы CYP1A2, вызванное Цф, привело к снижению интенсивности биотрансформации маркерного препарата и уменьшению значения МО. Так, МО после однократного введения кофеина без Цф составило  $1,27 \pm 0,17$ , а после его субхронического введения —  $0,62 \pm 0,13$  ( $p \leq 0,05$ ).

Хотя Фн относится к группе умеренных индукторов, а Цф — к сильным ингибиторам выраженность индукции и ингибирования у крыс отличалась на 23 % (1,57 и 2,05, соответственно).

На рис. 3 отражены изучаемые эффекты, зафиксированные для другого метаболита кофеина — теобромина. Для теобромин отмечаются такие же зависимости, как и для параксантина, т.е. введение кофеина без индуктора дало МО равное  $1,13 \pm 0,23$  и после субхронического введения Фн —  $2,18 \pm 0,39$ . Напротив, МО теобромин/кофеин после субхронического введения ингибитора равнялось  $0,53 \pm 0,10$  и после однократного введения препарата-маркёра без Цф составило  $1,33 \pm 0,22$ .

Выраженность индукции и ингибирования, определяемая по МО теобромин/кофеин, так же как для МО параксантин/кофеин отличалась на 23 % (1,93 и 2,51, соответственно). Абсолютные значения МО, полученные для различных метаболитов кофеина, после введения индуктора и ингибитора отличаются друг от друга, но их отношение дает одинаковую величину, следовательно, активность изоформы CYP1A2 у крыс можно оценивать по одному из метаболитов препарата-маркёра.

Таким образом, проведенное исследование с одной стороны, подтвердило отсутствие у афобазола в дозе, соответствующей терапевтической, способности вызывать сдвиги в активности цитохромов, участвующих в метаболизме ряда лекарств, что позволяет исключить зависимое от CYP2C9 и CYP1A2 фармакокинетическое взаимодействие. С другой стороны, полученные результаты демонстрируют адекватность применения *in vivo* методологии для изучения влияния новых фармакологических средств на активность изоформ P-450 с использованием стандартных модификаторов и субстратов-маркёров.

## ВЫВОДЫ

1. Афобазол в дозе, соответствующей терапевтической, не влияет на активность изоформ CYP2C9 и CYP1A2.

2. Апробирована методология изучения *in vivo* влияния лекарственного средства на изоформы цитохрома P-450 с использованием стандартных модификаторов и субстратов-маркёров.

3. Установлено, что активность изоформы CYP1A2 у крыс можно оценивать по одному из метаболитов препарата-маркёра (параксантину или теобромину), а изоформы CYP2C9 – по метаболиту препарата-маркера лозартана (Exp 3174).

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. Г. Грибакина, Г. Б. Колыванов, А. А. Литвин и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **76**(3), 35 – 37 (2013).
2. В. Г. Королева, И. П. Фомина, *Антибиотики*, **21**(8), 722 – 725 (1976).
3. В. Г. Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, *Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2008).
4. Я. Г. Новицкая, А. А. Литвин, А. О. Виглинская, В. П. Жердев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **76**(6), 30 – 33 (2013).
5. Я. Г. Новицкая, А. А. Литвин, В. П. Жердев и др., *Вест. Моск. Ун-та. сер. 2. Химия*, **54**(1), 56 – 60 (2013).
6. О. Г. Пронина, Г. Б. Колыванов, А. О. Виглинская и др., *Вест. Моск. Ун-та. сер. 2. Химия*, **53**(2), 194 – 197 (2012).
7. *Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортёров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкции по применению*, Москва (2009).
8. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. А. Н. Миронов (ред.), ЗАО “Гриф и К”, Тула (2012).
9. G. R. Bailie, C. A. Johnson, N. A. Mason, W. I. St Peter, *Med facts. Pocket guide of drug interactions*, Second Ed. Bone Care International (2004).
10. K. Kobayashi, K. Urashima, N. Shimada, K. Chiba, *Biochem. Pharmacol.*, **63**(11), 889 – 896 (2002).
11. J. Le., *The Merck Manual* (2012).
12. D. Y. Lee, H. S. Shin, S. K. Bae, M. G. Lee, *Biopharm. Drug Dispos.*, **27**(3), 209 – 218 (2006).
13. Y. I. Lolin, N. Ratnaraj, M. Hjelm, P. N. Parsalos, *Epilepsy Res.*, **19**(2), 99 – 110 (1994).
14. A. Louie, Q-F. Liu, G. L. Drusano, et al., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **42**(6), 1512 – 1514 (1998).
15. N. Nagai., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**(1), 3 – 15 (2010).
16. S. Reagan-Show, M. Nihal, N. Ahmed, *The FASEB J.*, **22**(8), 659 – 661 (2007).
17. B. Testa, S. D. Kramer, *The Biochemistry of drug metabolism: Principles, Redox Reactions, Hydrolyses*, WILEY-VCH, Weinheim (2008).
18. G. T. Tucker, J. B. Houston, S.-M. Huang, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **52**(1), 107 – 117 (2001).
19. M. Zhu, P. Y. Wong, R. C. Lee, *J. Antimicrob. Chemother.*, **44**(1), 125 – 128 (1999).

Поступила 17.09.13

## IN VIVO EVALUATION OF THE METABOLIC RATIO OF CYP2C9 AND CYP1A2 DRUG MARKERS AFTER ADMINISTRATION OF AFOBAZOLE IN COMPARISON TO STANDARD INDUCERS AND INHIBITORS OF CYTOCHROMES

Ya. G. Novitskaya, O. G. Gribakina, A. A. Litvin, G. B. Kolyvanov, V. P. Zherdev, V. V. Smirnov, and S. B. Seredenin

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

The effect of subchronic peroral administration in effective doses of afobazole (5 mg/kg), and cytochrome P450 inducers (rifampicin, 13.4 mg/kg; phenytoin, 10.4 mg/kg) and inhibitors (fluconazole, 35.7 mg/kg; ciprofloxacin, 44.0 mg/kg) on the metabolic ratio (MR) of drugs-markers of CYP2C9 and CYP1A2 activity was studied in rats. Afobazole did not change the MR of compounds metabolized by the P450 isoforms studied. After peroral administration of standard P450 inducers and inhibitors, statistically significant bidirectional effects were identified, which demonstrated the expedience of administering a complex of selected compounds, markers, and CYP2C9 and CYP1A2 activity modifiers for comparative evaluation of the effects of new drugs in rats. It is recommended to evaluate the activity of CYP1A2 by determining the MR for one of two caffeine metabolites, paraxanthine or theobromine, and the activity of CYP2C9 by determining the MR of metabolite Exp-3174 to losartan.

**Keywords:** CYP2C9; CYP1A2; biotransformation; metabolic ratio; drug interactions