

ФАРМАКОКИНЕТИКА

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-3-17-21

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АВСВ1-БЕЛКА У ДОБРОВОЛЬЦЕВ С НИЗКОЙ ТРЕВОЖНОСТЬЮ

Е. Н. Якушева, И. В. Черных, А. В. Шулькин,
М. В. Гацанога, А. А. Никифоров¹

Представлены результаты клинического исследования влияния анксиолитика афобазола (фабомотизола) на функциональную активность АВСВ1-белка. Функционирование АВСВ1-белка оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина с использованием оригинальной ВЭЖХ методики. В исследование были включены 15 добровольцев с низкой тревожностью и генотипом СТ по полиморфному маркеру гена MDR1, кодирующего АВСВ1-белок, которых после рандомизации разделили на 2 группы. Первая группа в течение 14 дней получала афобазол по 10 мг 3 раза в день. На 15 день добровольцы принимали 10 мг афобазола и 360 мг фексофенадина. После этого у них забирали кровь для анализа концентрации фексофенадина в плазме крови. После периода “отмывки” (5 дней) выполняли перекрест и в течение последующих 14 дней 3 раза в день добровольцы принимали плацебо с последующим приемом фексофенадина и забором крови для повторения исследования. Вторая группа добровольцев проходила аналогичное тестирование, но начинала его с приема плацебо. Завершили исследование в соответствии с протоколом 12 добровольцев, которые были включены в дальнейший анализ. Выявлено, что афобазол при курсовом введении вызывает достоверное повышение площади под фармакокинетической кривой концентрация — время фексофенадина в 1,33 раза (90 %-й доверительный интервал (ДИ) 1,13 – 1,55, $p = 0,008$), что свидетельствует об увеличении концентрации фексофенадина в крови пациентов, получавших афобазол, по сравнению с пациентами, принимавшими плацебо, и характеризует ингибирующее влияние афобазола на функциональную активность АВСВ1-белка.

Ключевые слова: АВСВ1-белок; афобазол; фексофенадин; фармакокинетика; ингибитор; клиническое исследование.

АВСВ1-белок (гликопротеин-P, MDR1) — АТФ-зависимый белок-транспортер эффлюксного типа, локализующийся в цитоплазматической мембране энтероцитов кишечника, гепатоцитов, эпителия проксимальных почечных канальцев, эндотелиальных клеток гистогематических барьеров, опухолевых клеток. Данный транспортер играет важную роль в процессах всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ, являющихся его субстратами (фексофенадин, дигоксин, дабигатранаэтексилат и др.), транспорте эндогенных веществ (стероидные, тиреоидные гормоны) и резистентности опухолевых клеток к химиотерапии [2, 6, 8, 9].

Функциональная активность АВСВ1-белка может изменяться под влиянием различных факторов и большого числа лекарственных средств. Вещества-индукторы (рифампицин, глюкокортикостероиды, тироксин) повышают активность белка-транспортера, что может

приводить к снижению эффективности субстратов АВСВ1-белка. Вещества-ингибиторы (верапамил, амиодарон, кетоконазол и др.) снижают активность транспортера, что может обусловить формирование признаков передозировки субстратов [2]. Например, концентрация дабигатранаэтексилата в плазме крови повышается примерно в 1,5 раза при его приеме через 1 ч после введения амиодарона и верапамила — классических ингибиторов АВСВ1-белка, что повышает риск развития кровотечений [8].

Афобазол — оригинальный отечественный селективный анксиолитик с нейропротекторной активностью [3]. Безрецептурный отпуск из аптек и широкий спектр показаний к применению повышает вероятность его комбинации с другими лекарственными средствами, а значит, и риск возникновения межлекарственных взаимодействий.

Ранее в экспериментах на кроликах было показано, что афобазол ингибирует функциональную активность и экспрессию в печени АВСВ1-белка [5].

В связи с этим предпринята попытка изучения влияния афобазола на активность АВСВ1-белка у добро-

¹ Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Россия, Рязань, ул. Высоковольная, д. 9.

вольцев с низкой тревожностью с использованием в качестве субстрата белка-транспортера фексофенадин.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В одноцентровое простое слепое плацебоконтролируемое рандомизированное перекрестное двухпериодное сравнительное исследование влияния афобазола на активность ABCB1-белка было включено 15 добровольцев мужского и женского пола, проживающих в Российской Федерации. Количество добровольцев было рассчитано с использованием результатов, полученных ранее [6]. При коэффициенте внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{intra}) AUC_{0-t} фексофенадина — 11 %, а C_{max} — 12,75 % [6] и отношении средних геометрических фармакокинетических параметров AUC_{0-t} и C_{max} в пределах 0,90–1,10 для достижения статистической мощности 80 % с уровнем значимости $\alpha = 5$ % достаточным является включение в исследование 12 добровольцев.

Протокол клинического исследования, информация для пациента и форма информированного согласия были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава РФ. До скрининга всеми участниками исследования подписана форма информированного согласия. Исследование осуществлялось на клинической базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Критериями включения были возраст 18–45 лет, индекс массы тела от $(22,71 \pm 1,79)$ кг/м², генотип СТ по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1, кодирующего ABCB1-белок, способность выполнять требования протокола исследования, низкая тревожность по шкале Спилбергера — Ханина, полиноз в анамнезе.

Критериями невключения являлись гиперчувствительность к афобазолу и фексофенадину, заболевания сердечно-сосудистой, дыхательной, нейроэндокринной, иммунной систем, желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови, острые инфекционные заболевания, прием любых лекарственных препаратов и веществ, влияющих на активность ABCB1-белка, гемодинамику и функцию пищеварительной системы в течение 4 недель до включения в исследование и во время него, наличие на скрининге отклонений от норм показателей инструментальных и лабораторных методов исследования, потеря более 450 мл крови менее чем за 2 мес до начала исследования, чрезмерное употребление алкоголя, генотипы СС и ТТ по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1.

Функциональную активность ABCB1-белка определяли по фармакокинетике его маркерного субстрата — фексофенадина (“Аллегра”, Sanofy, Франция) — антигистаминного препарата III поколения [1, 4, 7]. Его преимуществами являются отсутствие биотрансформации, большая широта терапевтического действия, достаточно высокие концентрации в плазме крови

при пероральном введении в терапевтической дозе, отсутствие кумуляции, безрецептурный отпуск.

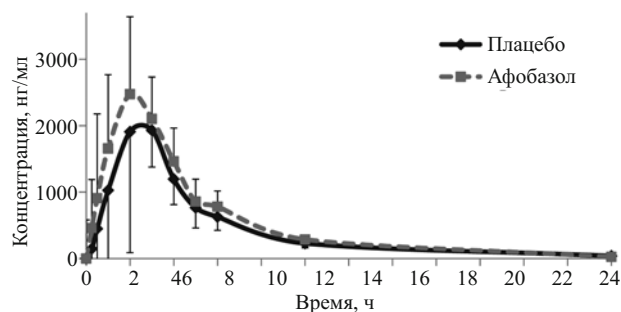
На этапе скрининга у добровольцев выполнялось генотипирование по полиморфному маркеру гена MDR1, кодирующего ABCB1-белок, на базе ЦНИЛаРязГМУ методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим определением результата “SNP-ЭКСПРЕСС” (НПФ “Литех”, Россия) после выделения ДНК из лейкоцитов венозной крови. Учитывая возможное влияние полиморфизма С3435Т гена MDR1 на фармакокинетику фексофенадина и на ответ изучаемого белка-транспортера на воздействие афобазола [9], в исследование включали добровольцев только с генотипом СТ.

Исследование состояло из периода скрининга (до 21 дня) и 2 периодов госпитализации с “отмывочным” периодом не менее 5 дней. Добровольцы были разделены на 2 группы с использованием модуля рандомизации программы Stat Soft Statistica 7.0: первая группа получала афобазол в дозе 10 мг 3 раза в день в течение 14 дней, вторая группа — плацебо по аналогичной схеме. После 14 дней приема афобазола или плацебо добровольцев госпитализировали, в стационаре им назначали фексофенадин внутрь в дозе 360 мг в комбинации с афобазолом/плацебо, препарат запивали 200 мл воды. Во время госпитализации выполняли установку кубитального катетера и забор крови в 10 временных точках.

Затем следовал отмывочный период и выполнялся перекрест: первая группа принимала плацебо, а вторая — афобазол по указанной ранее схеме. После 14 дней приема следовала вторая госпитализация, однократный прием фексофенадина (360 мг) с последующим забором крови и анализом фармакокинетики маркерного субстрата.

Для оценки фармакокинетики фексофенадина у каждого добровольца забирали кровь в объеме 5 мл в предварительно маркированные пробирки с гепарином. После каждого взятия крови катетер промывали 0,5 мл гепаринизированного физиологического раствора (500 МЕ на 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) во избежание тромбирования. Катетер удаляли через 24 ч после приема фексофенадина. Образцы крови отбирали в следующих точках: 0 (до приема препарата), через 15, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 и 24 ч после приема препарата. После взятия крови пробы центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 3000 оборотов в минуту. Полученную плазму замораживали и хранили при -30 °С до анализа не более 30 дней.

Концентрацию фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографической системы Stayer (Аквилон, Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, петлевым краном-дозатором РЕЕК с петлей ввода на 100 мкл, аналитическим ручным инжектором для ввода пробы модели 7725i (Rheodyne, США) при длине волны 220 нм. Использовали обращенно-фазовую хромато-



Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина у добровольцев, получавших плацебо и афобазол (среднее арифметическое и стандартное отклонение).

графическую колонку PhenomenexSynergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4,6 мм) с зернением 4 мкм и термостатированием при 35 °С [1, 4].

Определение концентрации фексофенадина в плазме крови выполняли методом абсолютной калибровки по площади пиков [1, 4]. Калибровочные растворы готовили добавлением к интактной плазме крови рассчитанного объема раствора стандарта фексофенадина гидрохлорида с концентрацией 10 мкг/мл.

Калибровочную зависимость площади хроматографического пика от концентрации фексофенадина определяли в диапазоне концентраций 100 – 1000 нг/мл по 6 точкам (указанный диапазон концентраций наблюдается при пероральном приеме 360 мг фексофенадина), для каждой точки выполняли по 5 измерений.

В указанном диапазоне концентраций зависимость “концентрация фексофенадина — площадь пика” носила линейный характер. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,9998. Уравнение регрессии имело вид: $y = 3,3737x + 11,724$, где x — площадь хроматографического пика, а y — концентрация фексофенадина.

Для экстракции фексофенадина из плазмы крови и приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: ацетонитрил “для ВЭЖХ” (Merck, Гер-

мания), кислота уксусная ледяная х.ч. (Экос-1, Россия), триэтиламин “для ВЭЖХ” (Lab-Skan, Польша).

Исследование выполняли в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы применяли смесь ацетонитрил (Merck, Германия) — вода — кислота уксусная ледяная (Экос-1, Россия) — триэтиламин (Lab-Skan, Польша) в соотношении 267:128:4,7:7 с рН 6,15 [1, 4]. Время удерживания фексофенадина составило $(14,91 \pm 0,25)$ мин. Предел определения и предел детектирования составили соответственно 69,24 и 31,61 нг/мл.

Экстракцию фексофенадина из плазмы крови осуществляли ацетонитрилом (2 мл плазмы и 4 мл ацетонитрила) встряхиванием на приборе Shaker при 400 об/мин 15 мин, центрифугированием при 3500 об/мин 15 мин и упариванием супернатанта при 50 °С [1, 4]. Коэффициент экстракции составил 84,14 %.

Модельно-независимым методом оценивали следующие фармакокинетические параметры фексофенадина: C_{\max} — максимальная концентрация (нг/мл); T_{\max} — время достижения максимальной концентрации (ч); AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой концентрация — время от нуля до времени последнего забора крови (нг · ч/мл), которую рассчитывали методом трапеций; K_{el} — константу элиминации, которую рассчитывали как тангенс угла наклона линейной части полулогарифмического графика концентрация — время к оси абсцисс; $AUC_{0-\infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой концентрация — время от нуля до бесконечности (нг · ч/мл), которую рассчитывали по формуле: $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/K_{el}$; отношение C_{\max}/AUC_{0-t} — коэффициент абсорбции.

В статистическом анализе суммировали данные фармакокинетики фексофенадина после приема афобазола или плацебо у испытуемых обеих групп и сравнивали их между собой. Полученные результаты обрабатывали с помощью программ StatSoftStatistica 7.0 (США) и MicrosoftExcel. Статистическую значимость различий в показателях T_{\max} оценивали с помощью критерия Вилкоксона. Остальные фармакокинетические параметры анализировали, исходя из представления о лог-нормальном распределении с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Учитывали влияние таких факторов, как последовательность приема афобазола или плацебо, период исследования, различия между испытуемыми и различия между фармакокинетическими параметрами фексофенадина на фоне введения афобазола и плацебо. По результатам дисперсионного анализа рассчитывали 90 %-й доверительный интервал (ДИ) отношения средних геометрических фармакокинетических параметров фексофенадина на фоне введения афобазола к его параметрам после применения плацебо.

Согласно общепринятым рекомендациям, межлекарственное взаимодействие является значимым, если 90 %-й ДИ отношения средних геометрических фар-

Фармакокинетические параметры фексофенадина у добровольцев после курсового приема плацебо и афобазола (10 мг 3 раза в день)

Параметр	Плацебо	Афобазол	90 %-й ДИ	<i>p</i>
C_{\max} , нг/мл	2213,24 (69,16)	2676,33 (38,83)	0,99 – 1,47	0,111
AUC_{0-t} , нг · ч/мл	9673,71 (42,74)	12843,05 (33,85)	1,13 – 1,55	0,008
C_{\max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,23 (28,72)	0,21 (27,34)	0,78 – 1,09	0,42
K_{el} , 1/ч	0,223 (46,95)	0,213 (40,41)	0,8 – 1,13	0,65
T_{\max} , ч	2,0 (2,0, 2,75)	2,0 (2,0, 2,75)	–	0,68

Примечание: данные представлены в виде среднего геометрического и коэффициента вариации, T_{\max} — в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

макокинетических параметров тестируемого вещества до и после взаимодействия находится вне диапазона 80 – 125 % (0,8 – 1,25).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе скрининга были обследованы 62 человека (27 мужчин и 35 женщин), из которых были отобраны 15 человек (7 мужчин и 8 женщин), в возрасте от 20 до 29 лет (в среднем $22,13 \pm 2,23$ лет) с индексом массы тела ($24,2 \pm 3,4$) $\text{кг}/\text{м}^2$. В соответствии с протоколом 12 человек завершили исследование и были включены в дальнейший анализ. Выбыли из исследования из-за развития ОРВИ 2 добровольца, 1 доброволец отказался от участия после завершения первого периода исследования. Таким образом, в итоговый анализ вошло 12 человек (по 6 человек в каждой группе, в первой группе, вначале получавшей афобазол, — 2 мужчины и 4 женщины; во второй группе, вначале получавшей плацебо, — по 3 женщины и мужчины). Сформированные группы были сопоставимы по всем изучаемым общеклиническим показателям.

Показанием для применения афобазола в данном исследовании было наличие у тестируемых добровольцев низкой степени тревожности, выявленной с помощью теста Спилбергера — Ханина.

Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина отображены на рисунке. Рассчитанные фармакокинетические параметры представлены в таблице.

Площадь под фармакокинетической кривой AUC_{0-t} превышала 80 % $AUC_{0-\infty}$, поэтому в дальнейшем для анализа использовали значение AUC_{0-t} .

Единственным фактором, который вносил значимый вклад в вариабельность C_{max} , C_{max}/AUC_{0-t} и K_{el} , являлись испытуемые. Вклад остальных факторов (прием афобазола или плацебо, период, последовательность) оказался статистически незначимым ($p > 0,05$). Причем 90 %-й ДИ отношения средних геометрических K_{el} (0,8 – 1,13) находился внутри интервала 0,8 – 1,25.

Установлено, что AUC_{0-t} фексофенадина после приема афобазола увеличивалась по сравнению с показателями у добровольцев при приеме плацебо в 1,33 раза (90 %-й ДИ 1,13 – 1,55, $p = 0,008$). Значение периода и последовательности приема препаратов было статистически незначимым ($p > 0,05$).

T_{max} фексофенадина у добровольцев обеих групп статистически значимо не отличалась ($p = 0,68$).

Данные изменения фармакокинетики фексофенадина свидетельствуют о повышении его содержания в плазме крови у добровольцев, получающих афобазол, по сравнению с испытуемыми, принимавшими плацебо, что свидетельствует об ингибировании функциональной активности ABCB1-белка.

При этом полученные 90 %-е ДИ частично перекрывают рекомендованный FDA интервал 0,8 – 1,25, что связано с высоким значением внутрииндивидуаль-

ного коэффициента вариации (CV_{intra}) — 21,5 % для AUC_{0-t} и 27,1 % для C_{max} , которые превосходят CV_{intra} , использованные для расчета необходимого количества добровольцев в начале работы. Скорее всего эти различия обусловлены включением в исследование не только мужчин, но и женщин (в подобном нашему исследовании К. А. Kim, которое использовалось для расчета выборки, тестировались только мужчины), разными национальностями популяций и различными дозами фексофенадина.

90 %-й ДИ отношения средних геометрических K_{el} (0,8 – 1,13) находился внутри интервала 0,8 – 1,25, что свидетельствует о том, что выведение фексофенадина у испытуемых, принимающих как афобазол, так и плацебо, эквивалентно. Поэтому изменения, полученные в показателях AUC_{0-t} фексофенадина, скорее всего, связаны с разной степенью всасывания маркерного субстрата ABCB1-белка.

Афобазол мог снизить функциональную активность ABCB1-белка за счет непосредственного взаимодействия с молекулой белка-транспортера или за счет влияния на его экспрессию.

Как было показано ранее, афобазол ингибирует функциональную активность ABCB1-белка, преимущественно снижая его экспрессию в печени, то есть действует опосредованно [5].

На основании полученных в данном исследовании результатов, можно рекомендовать с осторожностью назначать афобазол совместно с лекарственными веществами-субстратами ABCB1-белка с малой терапевтической шириной (дигоксин, дабигатранаэтексилат), с учетом их возможных фармакокинетических взаимодействий на уровне данного белка-транспортера. Однако это предположение требует проверки с использованием данных маркерных субстратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что афобазол в дозе 10 мг 3 раза в день в течение 14 дней у добровольцев с низкой тревожностью и генотипом СТ по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1 вызывает ингибирование функциональной активности ABCB1-белка, о чем свидетельствует значимое повышение AUC_{0-t} маркерного субстрата фексофенадина в 1,33 раза (90 %-й ДИ 1,13 – 1,55, $p = 0,008$).

ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Гацанога, И. В. Черных, А. В. Шулькин, Е. Н. Якушева, *Наука молодых — Eruditio Juvenium*, 3, 5 – 10 (2016).
2. В. Г. Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, *Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализационной медицины: руководство для врачей*, ГЭОТАР-МЕДиа, Москва (2008).
3. С. Б. Середенин, М. В. Воронин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, 72(1), 3 – 11 (2009).

4. Е. Н. Якушева, И. В. Черных, А. В. Щулькин, М. В. Гацанова, *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова*, 3, 49 – 53 (2015).
5. Е. Н. Якушева, И. В. Черных, А. В. Щулькин, М. В. Гацанова, *Эксперим. и клин. фармакол.*, 80(9), 69 – 72 (2017).
6. К. А. Kim, J. Y. Park, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 66(7), 721 – 725 (2010).
7. M. Molimard, B. Diquet, M. S. Benedetti, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 18(4), 399 – 411 (2004).
8. D. J. Wessler, L. T. Grip, J. Mendell, R. P. Giugliano, *J. Am. Col. Cardiol.*, 61(25), 2495 – 2502 (2013).
9. Q. Zhou, et al., *Pharmazie*, 68(2), 129 – 134 (2013).

Поступила 10.03.19

INFLUENCE OF AFOBAZOLE ON THE ABCB1 PROTEIN FUNCTIONAL ACTIVITY IN VOLUNTEERS WITH LOW ANXIETY LEVEL

E. N. Yakusheva, I. V. Chernykh, A. V. Shchulkin, M. V. Gatsanoga, and A. A. Nikiforov

Ryazan State Medical University, ul. Vysokovoltnaya 9, Ryazan, 390026 Russia

The article describes one-center, simple blind, placebo-controlled, randomized, cross-over, two-stage study of the afobazole effects on the ABCB1 protein functional activity. The functioning of ABCB1 protein was evaluated by measuring the pharmacokinetics of its marker substrate, fexofenadine, using the original HPLC technique. The study involved 15 volunteers with low anxiety level and CT genotype on the polymorphic marker of the MDR1 gene. After randomization, the volunteers were divided into two groups. The first group received 10 mg afobazole three times a day for 14 days. On the 15th day, the volunteers took 10 mg afobazole and 360 mg fexofenadine. After this, blood samples were taken to analyze the fexofenadine concentration in plasma. After a “washing” period (5 days), a cross was performed and the volunteers took a placebo 3 times a day for the next 14 days, followed by fexofenadine administration and blood sampling to repeat the study. The second group of volunteers underwent similar testing procedure, but started with the course of taking placebo. The protocol was successfully completed by 12 volunteers, which were admitted to the subsequent investigation. It was found that the course of afobazole administration caused a significant (1.33 times) increase in the area under the pharmacokinetic concentration-time curve of fexofenadine (90 %CI, 1.13 – 1.55, $p = 0.008$), indicating an increase in fexofenadine concentration in blood compared to patients taking placebo. This result characterizes the inhibitory effect of afobazole on the ABCB1 protein functional activity.

Keywords: ABCB1 protein; inhibitor; afobazole; fexofenadine; pharmacokinetics; clinical investigation.