

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

МЕТАБОЛИЗМ НОВОГО АНТИАГРЕГАНТА — ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИНОНА

**В.В.Быков^{1,2}, К.А.Леонов², В.Ю.Серебров¹, Г.А.Чернышева³, В.И.Смолякова³,
М.А.Соловьев^{3,4}, Е.В.Удуд¹, В.П.Фисенко⁵, В.В.Удуд^{3,4}**

¹ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск; ²Инновационные фармакологические разработки, Томск, РФ; ³НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д.Гольдберга Томского НИМЦ РАН, Томск, РФ; ⁴ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, РФ; ⁵ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Проведено исследование процессов цитохром р450-опосредованного метаболизма антиагреганта индолинового ряда GRS и его влияния на активность изоферментов цитохрома р450. Исследование ингибирования 6 изомеров цитохрома р450 проводили в микросомах печени человека с использованием специфических субстратов. GRS не подвержен деградации ферментами системы цитохрома р450 печени человека и не является индуктором и ингибитором представителей семейства цитохрома р450: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2C8 и 3A4. Таким образом, клиническое применение разрабатываемого антиагреганта не будет сопряжено с рисками неконтролируемых колебаний концентрации GRS в организме из-за межлекарственного взаимодействия.

Ключевые слова: GRS; антиагрегант; производное индолинона; метаболизм; цитохром р450

Одним из важнейших этапов разработки лекарственного препарата является исследование его фармакокинетики — кинетики всасывания, распределения, метаболизма и выведения [5]. Эффективность и безопасность лекарственной терапии прямо зависит от процессов метаболизма каждого препарата; одна и та же доза для одного пациента может оказаться неэффективной, тогда как у другого она может вызвать тяжёлые побочные эффекты [3,4]. Чаще всего предсказать индивидуальную реакцию на приём того или иного препарата невозможно, что является серьёзной проблемой терапии. Понимание основных путей метаболизма лекарства позволяет снизить риски при его клиническом применении.

Самой существенной по вкладу в метаболизм ксенобиотиков является система с низкой субстратной специфичностью — цитохром р450 [7, 11]. По результатам анализа 200 самых часто назна-

чаемых лекарственных препаратов в США, метаболизму подвергаются около 73% из них. Около 85% из них метаболизируются изоферментами цитохрома р450. Изоферменты семейства CYP3A метаболизируют 46% лекарственных средств, CYP2C9 — 16%, CYP2C19 и CYP2D6 — 12%, изоферменты семейства CYP1A — 9%, CYP2B6 и CYP2E1 — 2% [12]. Увеличение или снижение активности разных изоферментов р450 может быть следствием фармакогенетических особенностей пациента или же непосредственного взаимодействия с другими веществами, в том числе ксенобиотиками и/или их метаболитами [1]. Любое изменение активности системы цитохрома р450 может быть причиной усиления или ослабления индивидуальной восприимчивости пациента к действию того или иного препарата: от снижения эффективности терапии до появления выраженных побочных эффектов в диапазоне терапевтических доз. Изоферменты р450 проявляют перекрёстную субстратную специфичность. С одной стороны, каждый

Адрес для корреспонденции: preclin5_dep@ipharm.ru. Быков В.В.

отдельный ксенобиотик может быть субстратом нескольких изоформ р450, с другой — разные по своей природе ксенобиотики могут быть субстратами одних и тех же изоформ [2]. На современном фармацевтическом рынке представлено много препаратов-пролекарств, в том числе антиагрегантов (например клопидогрел), активация которых сопряжена с некоторыми ферментативными процессами, в том числе с участием системы цитохрома р450 [10]. Антиагрегантное действие клопидогрела реализуется через образование активного метаболита посредством взаимодействия с CYP2C19 и CYP3A4, поэтому изменение активности системы р450 приводит к тому, что препарат становится менее эффективным у одних пациентов и более токсичным у других [6]. Необходимо отметить, что в результате р450-опосредованных реакций из нетоксичного препарата может образоваться токсичный метаболит [9].

В связи с этим исследование процессов метаболизма и взаимодействия разрабатываемых лекарственных средств с ферментами цитохрома р450 является крайне важной задачей для изучения путей элиминации препарата, разработки схемы дозирования в клинических исследованиях и прогнозирования возможных межлекарственных взаимодействий. Исследуемое в данной работе новое антиагрегантное лекарственное средство GRS представляет собой производное индолинона. Вещества этого класса могут быть индукторами цитозольной (растворимой) гуанилатциклазы [8].

Цель данного исследования — изучить процесс цитохром р450-опосредованного метаболизма антиагреганта индолинонового ряда GRS и его влияния на активность изоферментов цитохрома р450.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исследуемого вещества использовали образец фармацевтической субстанции GRS (2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазолидин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1H-индол-3(2H)-он).

В экспериментах по изучению метаболизма использовали коммерческие пулированные микросомы крыс (XenoTechR1000) и человека (H0610). GRS в концентрации 0.5 мкМ инкубировали с микросомальной фракцией печени крыс и человека на шейкере-инкубаторе (ES-20Biosan) при 37°C в присутствии кофактора NADPH. Через 5, 10, 15, 20 и 30 мин отбирали пробы из инкубационной среды и останавливали реакцию 0.5 мл холодного (4°C) ацетонитрила. Количество остаточного GRS в неизменённом виде определяли методом ВЭЖХ/МС на масс-спектрометре QTRAP 5500 (ABSciex) в комплексе с жидкостным хроматографом Infinity 1290

(Agilent Technologies). Для элюирования использовали подвижную фазу, содержащую 0.1% водный раствор муравьиной кислоты (элюент А) и 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент Б). Регистрацию GRS проводили по MRM-переходу m/z 298→183. Каждую пробу готовили в 2-кратном повторе и измеряли по 2 раза. На основании данных концентрации рассчитывали период полураспада ($T_{1/2}$), клиренс *in vitro* (C_{int}) и оставшееся количество вещества (% от начального). В качестве контрольного соединения, подверженного деградации ферментами р450, использовали верапамил.

В экспериментах по изучению ингибирования 6 изомеров цитохрома р450 проводили в микросомах печени человека с использованием специфических субстратов. GRS с концентрацией 10 мкМ инкубировали с микросомами в присутствии NADPH и смеси из 6 субстратов (фенацетин, мидазолам, тобутамид, S-мефенитоин, декстрометорфан, амодиахин) в 96-луночных планшетах с последующим определением метаболитов.

Для расчёта концентрации метаболитов использовали калибровочные кривые по нормированным на внутренний стандарт значениям площадей хроматографических пиков.

На основании полученных данных вычисляли концентрацию полумаксимального ингибирования IC_{50} .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Верапамил после 30-минутной инкубации с NADPH в микросомах печени крыс деградировал до 8% от начальной концентрации, в микросомах печени человека — до 19%. На основании полученных данных были рассчитаны период полураспада и клиренс верапамила, составившие 9.25 мин и 302 мкл/мин/мг белка соответственно в микросомах печени животных и 11.63 мин и 228 мкл/мин/мг белка в микросомах печени человека соответственно.

В результате проведённого исследования установлено, что GRS не подвержен метаболизму в микросомальной фракции печени человека. В течение 30 мин инкубации в микросомах печени человека субстанция GRS оставалась стабильной на 99%. При этом был показан низкоинтенсивный метаболизм GRS в микросомах печени крыс; через 30 мин инкубации количество неизменённого GRS составило 70% от начального.

Кинетика метаболизма GRS и контрольного соединения верапамила в микросомах печени крысы и человека показана на рисунке 1.

В рамках исследования ингибирования основных изоферментов цитохрома р450 в микросомах печени человека, кроме GRS, были использованы

специфические ингибиторы изоформ р450 (α -нафтофлавон, сульфafenазол, флувоксамин, хинидин, кверцетин, кетоконазол). Ни один из исследованных изоферментов цитохрома р450 не ингибиро-

вался фармацевтической субстанцией GRS в концентрации 10 мкМ, поэтому рассчитать константы ингибирования для каждого изофермента не представлялось возможным (рис. 2).

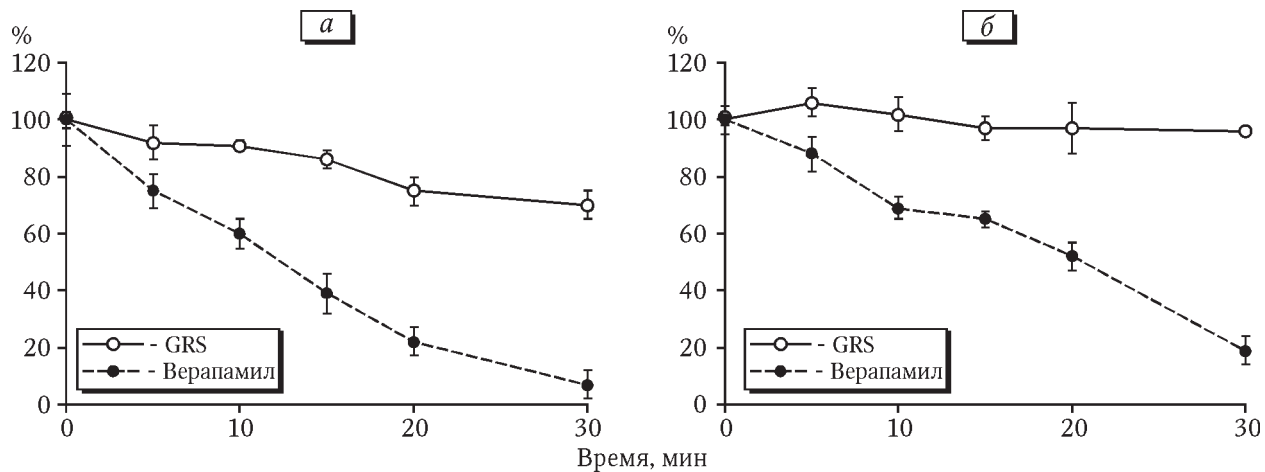


Рис. 1. Зависимость остаточного количества GRS и верапамила от времени в присутствии NADPH в микросомах печени крыс (а) и человека (б).

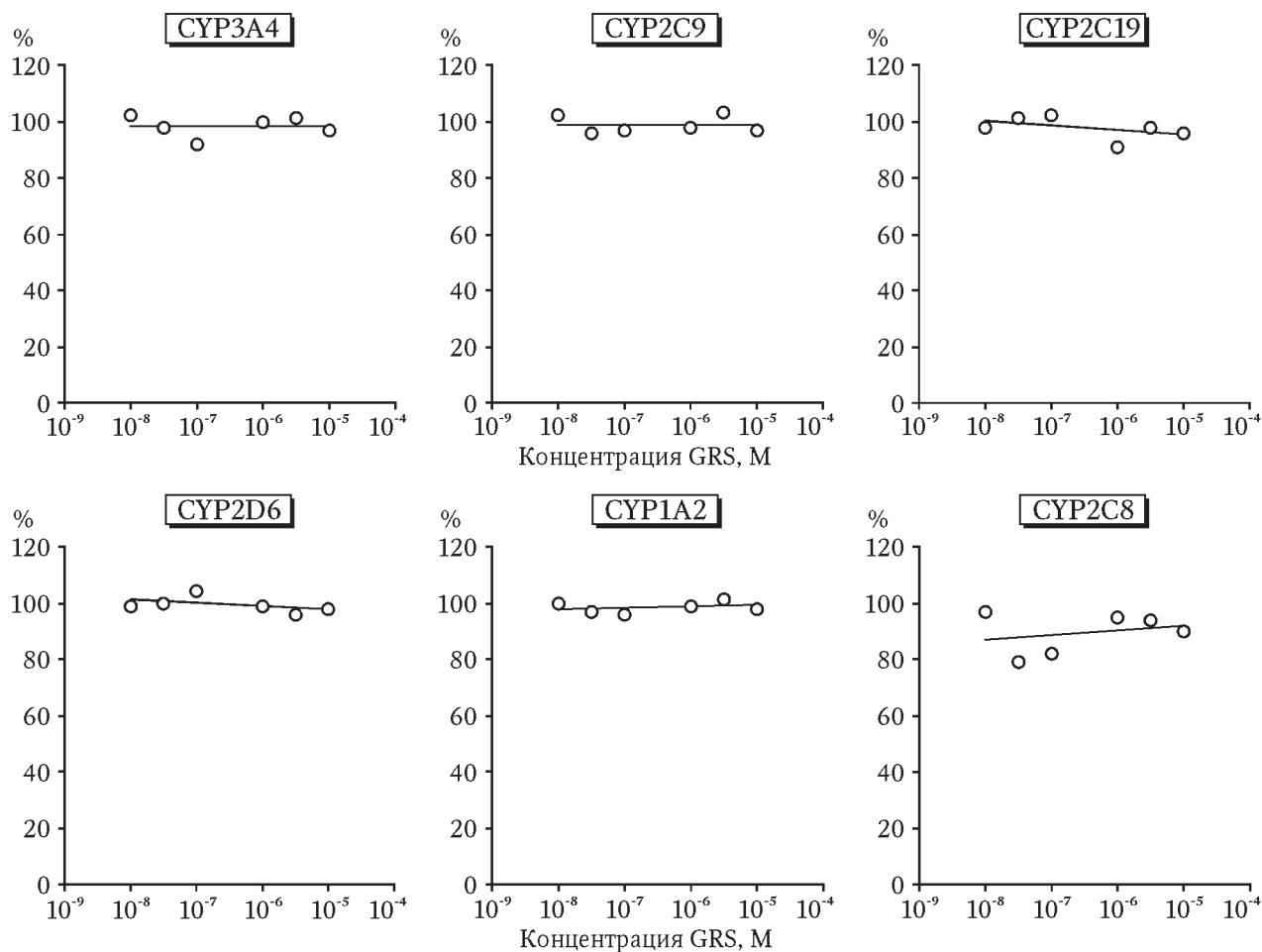


Рис. 2. Ингибирование активности изоформ цитохрома р450 (%) в микросомах печени человека субстанцией GRS.

В результате проведённых исследований установлено, что метаболизм GRS обладает межвидовой вариабельностью: выявлен медленный метаболизм GRS с участием цитохрома р450 печени крыс и его отсутствие в микросомальной фракции печени человека. Данная вариабельность может обусловить существенные различия зависимостей “концентрация—эффект” и “доза—эффект” у крыс и человека. Полученные данные представляют ценность и могут стать основой обоснования дозы для фазы II клинических исследований.

GRS не ингибирует основные изоферменты цитохрома р450 микросом печени человека (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2C8 и 3A4). Отсутствие участия цитохрома р450 печени в биотрансформации GRS снижает вероятность возникновения проблемы при проведении терапии у пациентов с фармакогенетическими особенностями. Отсутствие и/или незначительный вклад системы цитохрома р450 в метаболизм GRS, а также отсутствие у GRS ингибирующей активности в отношении её основных изоформ может способствовать устранению возможного межлекарственного взаимодействия на уровне ферментов печени, что важно при одновременном приёме нескольких препаратов. В случае проведения комбинированной антиагрегантной терапии препаратами разных фармакологических групп вклад разрабатываемого препарата в риск межлекарственных взаимодействий будет минимальным.

Таким образом, GRS является перспективным соединением для разработки антиагрегантного лекарственного препарата с минимальными рисками изменения активности при терапии пациентов с фармакогенетическими особенностями системы цитохрома р450 и межлекарственного взаимодействия при комбинированной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены “предрасположенности”. Введение в предиктивную медицину. Санкт-Петербург, 2000.
2. Основы токсикологии / под ред. С.А.Куценко. Санкт-Петербург, 2004.
3. Стицын В.А., Макаров С.В., Пай Г.В., Бычковская Л.С. Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков // Вестн. ВОГиС. 2006. Т. 10, № 1. С. 97-105.
4. Сычёв Д.А. Клиническая фармакогенетика // Клиническая фармакокинетика / под ред. В.Г. Кукеса. Москва, 2004. С. 154-167.
5. Brewer L., Williams D. Clinically Relevant Drug-Drug and Drug-Food Interactions: Underlying Mechanisms and Regulatory Requirements for Drug Licensing // Pharm. Med. 2013. Vol. 27, N 1. P. 9-23. doi: 10.1007/s40290-013-0008-4
6. Curial M., Nath E., Lang E. Novel antiplatelet agent use for acute coronary syndrome in the emergency department: a review // Cardiol. Res. Pract. 2013. Vol. 2013. 127270. doi: 10.1155/2013/127270
7. Frye R.F. Probing the world of cytochrome P450 enzymes // Mol. Interv. 2004. Vol. 4, N 3. P. 157-162.
8. Granik V.G., Ryabova S.Yu., Grigoriev N.B. Exogenous nitric oxide donors and inhibitors of its formation (the chemical aspects) // Rus. Chem. Rev. 1997. Vol. 66, N 8. P. 717-731.
9. Guengerich F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity // AAPS J. 2006. Vol. 8, N 1. P. E101-E111.
10. Scott S.A., Sangkuhl K., Stein C.M., Hulot J.S., Mega J.L., Roden D.M., Klein T.E., Sabatine M.S., Johnson J.A., Shuldiner A.R.; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update // Clin. Pharmacol. Ther. 2013. Vol. 94, N 3. P. 317-323.
11. Tomaszewski P., Kubiak-Tomaszewska G., Pachecka J. Cytochrome P450 polymorphism—molecular, metabolic, and pharmacogenetic aspects. II. Participation of CYP isoenzymes in the metabolism of endogenous substances and drugs // Acta Pol. Pharm. 2008. Vol. 65, N 3. P. 307-318.
12. Williams J.A., Hyland R., Jones B.C., Smith D.A., Hurst S., Goosen T.C., Peterkin V., Koup J.R., Ball S.E. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios // Drug Metab. Dispos. 2004. Vol. 32, N 11. P. 1201-1208.

Получено 26.06.19