

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Гацанога М.В., Попова Н.М., 2017  
DOI:10.23888/PAVLOVJ20174538-550

ИЗУЧЕНИЕ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ФАБОМОТИЗОЛА  
К СУБСТРАТАМ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р

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

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,  
ул. Высоковольтная, 9, 390026, г. Рязань, Российская Федерация

Гликопротеин-Р (Pgp) – это мембранный эффлюксный белок-транспортер, к субстратам которого относится большое число лекарственных веществ. Ряд препаратов изменяет активность транспортера, что при полипрагмазии может служить причиной межлекарственных взаимодействий. Фабомотизол (афобазол) – это отечественный анксиолитик с нейропротекторной активностью, применяемый по широкому спектру показаний и, исходя из химической структуры, являющийся потенциальным субстратом Pgp. **Цель.** Изучить принадлежность фабомотизола к числу субстратов Pgp. **Материалы и методы.** Работа выполнена на 12 кроликах-самцах породы Шиншилла. Принадлежность фабомотизола к субстратам Pgp оценивали путем сравнения фармакокинетических параметров тестируемого вещества на фоне курсового введения известных индуктора и ингибитора белка-транспортера – рифампицина и верапамила соответственно. Животным однократно внутрижелудочно вводили фабомотизол в дозе 3,8 мг/кг и забирали кровь из ушной вены через 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 и 240 мин с последующим анализом его фармакокинетики методом ВЭЖХ. Параметры фармакокинетики фабомотизола рассчитывали модельно-независимым методом вручную. Затем животные были разделены на 2 группы по 6 кроликов в каждой: 1-я группа получала верапамил в дозе 20 мг/кг 3 раза в день, вторая – рифампицин в дозе 20 мг/кг массы 14-дневным курсом. После введения модуляторов Pgp у животных повторно анализировалась фармакокинетика фабомотизола после его однократного применения. **Результаты.** Было выявлено, что только коэффициент абсорбции фабомотизола на фоне рифампицина достоверно снижался в 1,27 раза по сравнению с параметром интактных животных (90%-й ДИ 0,66-0,94;  $p=0,04322$ ). Однако это изменение не имело клинической значимости, т.к. 90%-й доверительный интервал значительно перекрывал диапазон 0,80-1,25. Остальные фармакокинетические параметры фабомотизола достоверно в обеих сериях не изменялись, таким образом фабомотизол не является субстратом Pgp. Выявленное незначительное участие Pgp в фармакокинетике фабомотизола свидетельствует о том, что препарат можно назначать совместно с лекарственными веществами-модуляторами активности транспортера без корректировки его дозы. **Выводы.** В эксперименте *in vivo* на кроликах породы Шиншилла установлено, что фабомотизол не является субстратом белка-транспортера гликопротеина-Р.

**Ключевые слова:** гликопротеин-Р, фабомотизол, фармакокинетика, рифампицин, верапамил, субстрат.

Гликопротеин-Р (Pgp) – мембранный белок-транспортер, который использует энергию АТФ для эффлюкса из клеток

различных по химической структуре эндо- и ксенобиотиков, среди которых большое число современных лекарственных

средств. Активность транспортера изменяется под действием внешних и внутренних факторов, в том числе на фоне приема некоторых лекарственных веществ. Таким образом, транспортеру отводится значительная роль в развитии межлекарственных взаимодействий [1].

Фабомотизол (афобазол) – это оригинальный отечественный селективный ангиолитик с нейропротекторной активностью, широким спектром показаний к применению и безрецептурным отпуском из аптек [2]. По химической структуре фабомотизол является производным бензи-

мидазола, содержащим в молекуле третичные атомы азота и водородные связи. Комплекс исследований показал, что субстраты Pgp – преимущественно липофильные ароматические соединения с молекулярной массой в диапазоне 300-500 Да, включающие водородные связи в молекуле, аминогруппу или атом азота, протонированный при физиологических значениях pH [3-5]. Подобные свойства характерны для фабомотизола (рис. 1), что позволяет предполагать его принадлежность к числу субстратов данного белка-транспортера.

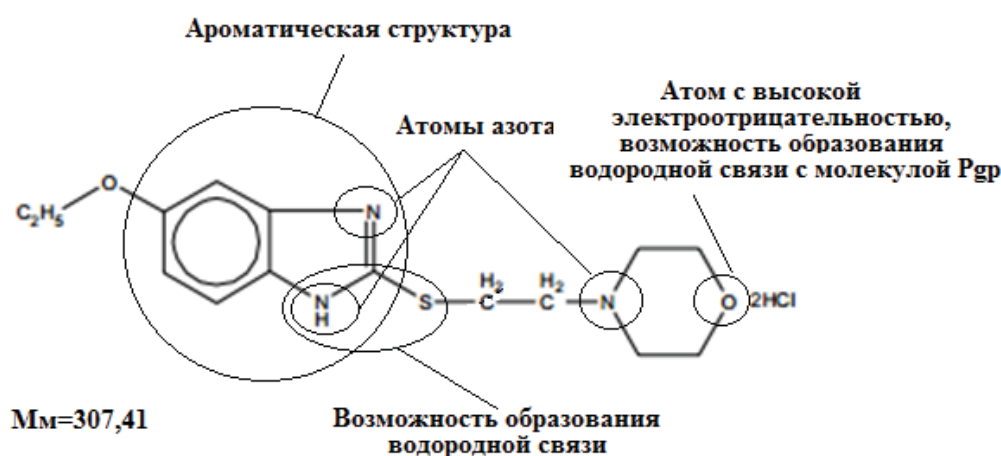


Рис. 1. Химическая структура фабомотизола с указанием характеристических групп

В научной литературе исследований по оценке принадлежности фабомотизола к числу субстратов, индукторов и ингибиторов Pgp не обнаружено.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилась оценка принадлежности фабомотизола к субстратам Pgp для прогнозирования возможных межлекарственных взаимодействий и осуществления эффективной и безопасной фармакотерапии.

#### Материалы и методы

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла средней массой 3500-4300 г в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. №199н. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики») [6].

Анализ принадлежности фабомотизола к субстратам Pgp проводили путем сравнения фармакокинетических параметров тестируемого вещества на фоне курсового введения известных индуктора и ингибитора белка-транспортера – рифампицина и верапамила соответственно. В случае участия Pgp в фармакокинетике тестируемого средства можно ожидать возрастания его концентрации в плазме крови после приема верапамила и обратные изменения после введения рифампицина [7].

Животным однократно внутрижелудочно вводили фабомотизол (таблетки Афобазол, 10 мг, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия) в дозе 3,8 мг/кг [8,9] в форме суспензии на воде очищенной. Далее забирали образцы крови из ушной вены через 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 и 240 мин в объеме 5 мл с последующим анализом его фармакокинетики методом ВЭЖХ.

Определение концентрации тестируемого вещества в плазме крови выполняли методом абсолютной калибровки по площади пиков. Калибровочные растворы готовили добавлением к интактной плазме крови кроликов рассчитанного объема раствора стандарта фабомотизола, предоставленного разработчиками препарата, с концентрацией 10 мкг/мл. Матричный раствор (1 мг/мл) готовили на метаноле и хранили при температуре 4 °С.

Исследование выполнялось в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы применялась смесь ацетонитрилового-метанол-кислота уксусная ледяная-триэтиламин в соотношении 100-240-100-0,3-0,25 с pH 6,10. Время удерживания фабомотизола составило 10,00±0,11 мин. Пределы определения и детектирования – соответственно 3,4 и 7,8 нг/мл.

Калибровочную зависимость площади хроматографического пика от концентрации фабомотизола определяли в диапазоне концентраций 50-1000 нг/мл по 6 точкам, для каждой точки выполняли по 5 измерений. В указанном диапазоне концентраций зависимость «концентрация фабомотизола – площадь пика» носила линейный характер. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,99935. Уравнение регрессии имело вид:  $y = 1,9994 \cdot x + 10,536$ , где за  $x$  – площадь пика,  $y$  – концентрация фабомотизола.

Для экстракции целевого вещества из плазмы крови и приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: ацетонитрил «для ВЭЖХ» (Merck, Германия), метанол «для ВЭЖХ» (Merck, Германия) кислота уксусная ледяная ХЧ (Экос-1, Россия), триэтиламин «для ВЭЖХ» (Lab-Skan, Польша).

Экстракция фабомотизола из плазмы крови осуществлялась эфиром диэтиловым (1,5 мл плазмы и 6 мл экстрагента) путем встряхивания на приборе Shaker при 400 об./мин в течение 10 мин, центрифугирования при 3500 об./мин в течение 10 мин и упаривания супернатанта при 40 °С. Коэффициент экстракции составил 87%.

Для расчета метрологических характеристик и основных валидационных па-

раметров разработанной методики применялись программы «Statistica 7.0» и «Microsoft Excel», а также руководство «Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation» (2013).

Фармакокинетические параметры фабомотизола рассчитывали модельно-независимым методом вручную.

После анализа фармакокинетики фабомотизола в норме животные были разделены на 2 группы по 6 кроликов в каждой: 1-я группа получала ингибитор Pgp – верапамил (таблетки, покрытые оболочкой, 80 мг, Валента Фармацевтика ОАО, Россия) в дозе 20 мг/кг 3 раза в день 14-дневным курсом [10] в форме суспензии на воде очищенной, вторая – индуктор транспортера – рифампицин (капсулы Рифампицин, 150 мг, ОАО «Фармасинтез», Россия) аналогичным курсом в дозе 20 мг/кг массы [11] в форме суспензии на крахмальном клейстере. После применения модуляторов Pgp животным повторно вводили фабомотизол и анализировали его фармакокинетику. Следует отметить, что последнее введение верапамила осуществлялось утром – перед введением фабомотизола, а рифампицина – вечером предыдущего дня.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 7.0». Наличие достоверных различий между значениями  $T_{max}$  фабомотизола оценивали с помощью критерия Вилкоксона, а полученные результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Med, Iq, uq). Статистическую значимость различий между фармакокинетическими параметрами, за исключением  $T_{max}$ , оценивали исходя из представления о лог-нормальном распределении данных. Сравнение изучаемых фармакокинетических параметров проводили с применением дисперсионного анализа повторных измерений (ANOVA) после их логарифмирования. Статистически значимыми принимали различия при значении  $p < 0,05$ . Дополнительно рассчитывали двухсторонний 90%-й доверительный интервал. Согласно рекомендациям U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research значимыми счита-

ются различия между фармакокинетическими параметрами, если двухсторонний 90%-й доверительный интервал их отношения находится вне диапазона 0,8-1,25 (80-125%). Полученные результаты представлены в таблицах в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала.

### Результаты и их обсуждение

14-дневное введение кроликам-самцам ингибитора и индуктора Pgp – верапамила и рифампицина соответственно не приводило к изменениям фармакокинетических параметров фабомотизола, что отражено в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

#### Фармакокинетические параметры фабомотизола до и после курсового введения рифампицина

Исследуемые параметры	Исходные значения, n=6	Рифампицин 14 дней, n=6	p
$C_{max}$ , нг/мл	381,81 (203,00; 718,11)	235,26 (158,13; 350,01)	0,1738
$T_{max}$ , мин	5,0 (5,0; 10,0)	5,0 (5,0; 5,0)	1,0000
$T_{1/2}$ , мин	88,26 (27,49; 283,38)	72,32 (47,35; 110,44)	0,59620
$AUC_{0-t}$ , (нг/мл)×ч	11568,47 (6037,34; 22166,98)	9005,91 (5979,30; 13564,52)	0,3352
$AUC_{0-\infty}$ , (нг/мл)×ч	15768,75 (10440,89; 23815,35)	10625,97 (7556,48; 14942,30)	0,1064
Cl, л/мин	0,24 (0,16; 0,36)	0,36 (0,25; 0,50)	0,1064
$C_{max}/AUC_{0-t}$ , 1/мин	0,033 (0,027; 0,040)	0,026 (0,019; 0,035)*	0,04322
MRT, мин	127,35 (39,66; 408,92)	104,35 (68,33; 159,36)	0,59620
$K_{el}$ , 1/мин	0,008 (0,002; 0,025)	0,010 (0,006; 0,015)	0,59620
Vd, л/мин	30,69 (8,66; 108,72)	37,32 (18,76; 74,21)	0,6671

Примечание (таблицы 1 и 2): \* – достоверные отличия от показателей интактных животных. Данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения  $T_{max}$  представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Таблица 2

#### Фармакокинетические параметры фабомотизола до и после курсового введения верапамила

Исследуемые параметры	Исходные значения n=6	Верапамил 14 дней, n=6	p
$C_{max}$ , нг/мл	413,02 (345,39; 493,90)	291,10 (168,23; 503,70)	0,11680
$T_{max}$ , мин	5,0 (5,0; 5,0)	10,0 (5,0; 17,5)	0,4795
$T_{1/2}$ , мин	62,59 (20,53; 190,85)	82,14 (26,53; 254,34)	0,5951
$AUC_{0-t}$ , (нг/мл)×мин	11067,60 (8638,72; 14179,41)	9741,60 (4929,07; 19252,89)	0,5242
$AUC_{0-\infty}$ , (нг/мл)×мин	12539,24 (11246,22; 13980,92)	13313,00 (7139,04; 24826,31)	0,7449
Cl, л/мин	0,30 (0,27; 0,34)	0,29 (0,15; 0,53)	0,7449
$C_{max}/AUC_{0-t}$ , 1/ч	0,037 (0,026; 0,053)	0,030 (0,020; 0,044)	0,2636
MRT, мин	90,32 (29,62; 275,40)	118,52 (38,28; 367,01)	0,5951
$K_{el}$ , 1/мин	0,011 (0,004; 0,034)	0,008 (0,003; 0,026)	0,5951
Vd, л/мин	27,37 (8,31; 90,21)	33,83 (7,80; 146,71)	0,7092

Усредненные фармакокинетические кривые фабомотизола интактных животных и кроликов после курсового введения

ингибитора и индуктора Pgp представлены соответственно на рисунках 2 и 3.

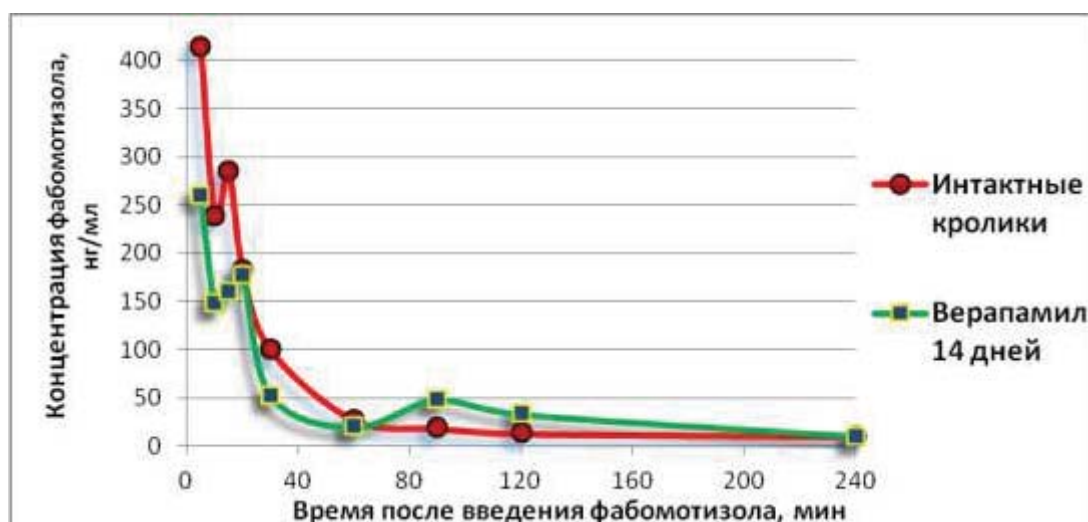


Рис. 2. Усредненные фармакокинетические кривые фабототизола в условиях нормы и на фоне 14-дневного введения верапамила

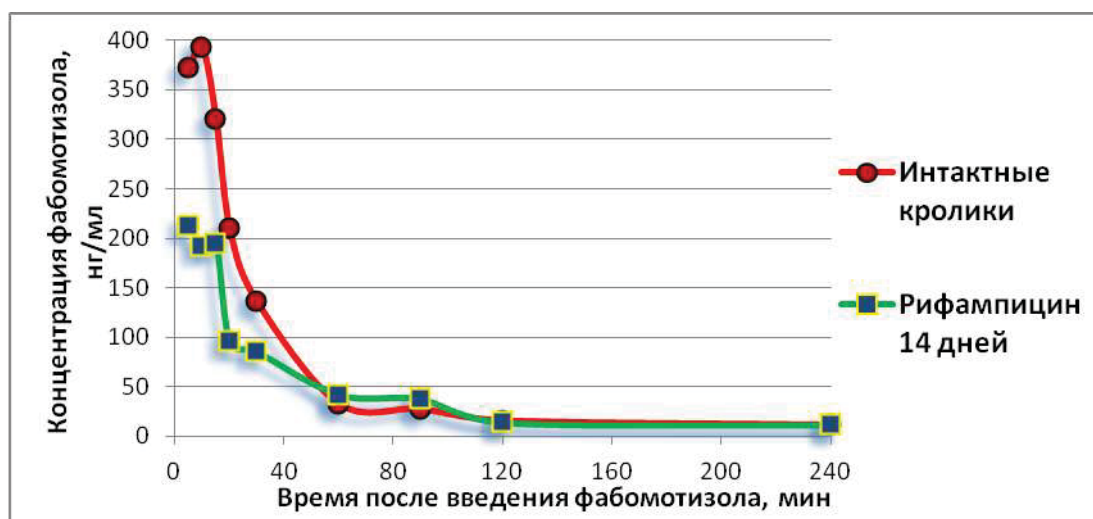


Рис. 3. Усредненные фармакокинетические кривые фабототизола в условиях нормы и на фоне 14-дневного введения рифампицина

Из приведенных данных видно, что лишь коэффициент абсорбции фабототизола ( $C_{max}/AUC_{0-t}$ ) в серии применения рифампицина достоверно снижался в 1,27 раза по сравнению с аналогичным параметром интактных животных (90%-й ДИ 0,66–0,94;  $p=0,04322$ ). Однако это изменение не имело клинической значимости, т.к. 90%-й доверительный интервал значительно перекрывал диапазон 0,80–1,25, отмеченный рекомендациями FDA. Слабовыраженная тенденция к снижению площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-\infty}$ ) и аналогичное возрастание общего клиренса фабототизола в данной серии,

вероятно, связано с индукцией микросомальных ферментов печени под действием рифампицина и интенсификацией метаболизма тестируемого препарата [9].

В нашем исследовании не было обнаружено значимого изменения фармакокинетических параметров фабототизола на фоне введения животным модуляторов активности Pgp. Однако на культурах клеток с множественной лекарственной устойчивостью показано, что ряд производных бензимидазола проникают в них в значительно меньшей степени, чем в нормальные клетки, что свидетельствует об их возможной принадлежности к субстратам



Pgp [12]. Таким образом, фабомотизол не относится к числу субстратов Pgp, или роль транспортера в его всасывании, распределении и экскреции не является ключевой, хотя его химическая структура имеет признаки субстратной специфичности в отношении транспортера.

Выявленное нами незначительное участие Pgp в фармакокинетике фабомотизола свидетельствует о том, что препарат можно назначать совместно с лекарственными веществами-модуляторами активности транспортера без корректировки его дозы. Кроме того, проникновение фабомотизола через гематоэнцефалический барьер,

где активно функционирует данный транспортер, будет достаточным для достижения минимальной терапевтической концентрации в ткани мозга, даже несмотря на его индукцию в условиях дефицита кислорода [6,10]. Это подтверждается результатами многочисленных исследований эффективности фабомотизола в качестве анксиолитика и нейропротектора [13,14].

#### **Вывод**

В эксперименте *in vivo* на кроликах породы Шиншилла установлено, что фабомотизол не является субстратом белка-транспортера гликопротеина-P.

*Конфликт интересов отсутствует.*

*Работа поддержана грантом РФФИ 16-44-620292 р\_а.*

#### **Литература**

1. Montanari F., Ecker G.F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction – Recent advances and future challenges // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015. Vol. 86. P. 17-26.

2. Аведисова А.С. Афобазол – безопасный препарат для лечения тревоги в общей практике // *Русский медицинский журнал*. 2006. Т. 14, №22. С. 1-3.

3. Ecker G., Huber M., Schmid D., et al. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance // *Molecular Pharmacology*. 1999. Vol. 56, №4. P. 791-796.

4. El-Ela A.A., Härtter S., Schmitt U., et al. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds-implications for pharmacokinetics of selected substrates // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004. Vol. 56, №8. P. 967-975.

5. Калетина Н.И. Токсикологическая химия метаболизм и анализ токсикантов. М.: ГЭОТАР-МЕДИА; 2008.

6. Гацанова М.В., Черных И.В., Щулькин А.В., и др. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-P на самках кроликов породы шиншилла // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2016. Т. 4, №3. С. 5-10.

7. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, и ингибиторам или индукторам гликопротеина-P // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015. Т. 78, №5. С. 19-23.

8. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ОАО Издательство «Медицина»; 2005.

9. Грибакина О.Г., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., и др. Фармакокинетическое взаимодействие афобазола с лозартаном – препаратом-субстратом цитохрома CYP2C9 в эксперименте // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2013. Т. 76, №3. С. 35-37.

10. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., и др. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-P // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2015. Т. 23, №3. С. 49-53.

11. Bamberger D.M., Fields M.T., Herndon B.L. Efficacies of various antimicrobial agents in treatment of *Staphylococcus aureus* abscesses and correlation with *in vitro* tests of antimicrobial activity and neutrophil killing // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991. Vol. 35, №11. P. 2335-2339.

12. Nare B., Liu Z., Prichard R.K., et al. Benzimidazoles – potent anti-mitotic drugs: substrates for the P-glycoprotein transporter in multidrug-resistant cells // *Biochemical pharmacology*. 1994. Vol. 48, №12. P. 2215-2222.

13. Середенин С.Б., Воронин М.В. Фармакология нового анксиолитика афоба-

зола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009. Т. 72, №1. С. 3-11.

14. Cuevas J., Behensky A., Deng W., et al. Afobazole Modulates Neuronal Response to Ischemia and Acidosis via Activation of  $\sigma$ -1 Receptors // *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011. Vol. 339, №1. P. 152-160.

---

Черных И.В. – к.б.н., ассистент кафедры общей и фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, Российская Федерация. SPIN 5238-6165, ORCID ID 0000-0002-5618-7607, Researcher ID R-1389-2017.

E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Щулькин А.В. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, Российская Федерация. SPIN 2754-1702, ORCID ID 0000-0003-1688-0017, Researcher ID N-9143-2016.

Якушева Е.Н. – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, Российская Федерация. SPIN 2865-3080, ORCID ID 0000-0001-6887-4888, Researcher ID T-6343-2017.

E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Гацанога М.В. – аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, Российская Федерация. SPIN 9645-5079, ORCID ID 0000-0002-1116-6271, Researcher T-3803-2017.

Попова Н.М. – к.м.н., старший преподаватель кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, Российская Федерация. SPIN 7553-9852, ORCID ID 0000-0002-5166-8372, Researcher ID B-1130-2016.

---

© Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N., Gatsanoga M.V., Popova N.M., 2017

## STUDY OF FABOMOTIZOLE BELONGING TO P-GLYCOPROTEIN SUBSTRATES

*I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva, M.V. Gatsanoga, N.M. Popova*

Ryazan State Medical University,  
Vysokovolt'naya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

**P-glycoprotein (Pgp) is a membrane efflux protein transporter with numerous drug-substrates. In addition, a lot of drugs alter the activity of the transporter. It can lead to drug-drug interactions during polypharmacy. Fabomotizole (afobazol) is a Russian anxiolytic drug with neuroprotective activity, applied over a wide range of indications. The drug belongs to a potential substrate of Pgp according to its chemical structure. Aim.** The aim of the study was to assess belonging of fabomotizole to Pgp substrates. **Materials and Methods.** The work was performed on 12 male Chinchilla rabbits. The belonging of fabomotizole to Pgp substrates