

На правах рукописи

ТОЛКАЧЕВ БОРИС ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ИВАБРАДИН КАК СУБСТРАТ-МАРКЁР АКТИВНОСТИ
ИЗОФЕРМЕНТА СУРЗА4**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2013

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор
Петров Владимир Иванович

Научный консультант: доктор медицинских наук
Магницкая Ольга Валерьевна

Официальные оппоненты: **Тюренков Иван Николаевич**
чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, кафедра фармакологии и биофармации ФУВ, заведующий кафедрой

Сычев Дмитрий Алексеевич
доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, кафедра клинической фармакологии и терапии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «**Смоленская государственная медицинская академия**» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится “___” октября 2013 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автореферат разослан “___” сентября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Бугаева Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Одним из наиболее перспективных направлений современной клинической фармакологии является разработка и внедрение научно-обоснованных подходов к индивидуализации лекарственной терапии. Данные методы призваны стать мощными инструментами так называемой персонифицированной медицины, главная задача которой состоит в повышении эффективности и безопасности фармакотерапии с учётом факторов, способных оказывать влияние на меж- и внутрииндивидуальную вариабельность фармакологического ответа. Особое место среди них занимают различия в скорости биотрансформации лекарственных веществ, которая в большинстве случаев определяется активностью ферментов метаболизма (Кукес В.Г., Сычев Д.А., 2008). Изменение последней, в свою очередь, может быть обусловлено такими причинами, как генетический полиморфизм, пол, возраст, лекарственные взаимодействия, сопутствующие заболевания и др. (Copp C.D., 2008).

Установлено, что изофермент CYP3A4 участвует в метаболизме более 50% лекарственных препаратов, многие из которых являются его ингибиторами, либо индукторами (Elens L, van Gelder T. et al., 2013). Межлекарственные взаимодействия на уровне этой системы метаболизма часто становятся причиной изменения плазменных концентраций препаратов. Следствием этого может являться как снижение эффективности фармакотерапии, так и повышение риска нежелательных лекарственных реакций. Это приводит к необходимости коррекции режима дозирования (Temesvari M. et al., 2011).

Существуют два принципиальных подхода к определению активности ферментов метаболизма лекарственных веществ: гено- и фенотипирование. Фенотипирования ферментов метаболизма лекарственных веществ заключается в оценке их активности *in vivo* с использованием различных маркерных субстратов (Tong-Liu Y. et al., 2007).

На сегодняшний день в научно-исследовательской практике используются большое количество маркерных субстратов CYP3A4, среди которых распространение получили мидазолам, эритромицин, а также лидокаин (MEGX-тест). Кроме того, было предложено оценивать активность CYP3A4 путём определения эндогенных соединений – кортизола и холестерина, а также их метаболитов в моче. Однако ни один из перечисленных методов фенотипирования этого изофермента не может считаться универсальным в силу объективных недостатков, таких как низкая специфичность, инвазивность

взятия проб для анализа, высокая вариабельность получаемых результатов. (Fuhr U., Jetter A., Kirchheiner J., 2007). Кроме того, результаты опубликованных к настоящему времени исследования свидетельствуют о том, что для изоформы 3A4 цитохрома P450 нехарактерен клинически значимый генетический полиморфизм, что не позволяет решать задачи индивидуализации терапии метаболизируемыми ею лекарственными препаратами с помощью фармакогенетического тестирования (Mathijssen R.H.J. et al., 2010).

По этой причине, проблема поиска новых маркерных субстратов и стратегий оценки активности CYP3A4 сохраняет свою актуальность.

Все вышесказанное определило цели и задачи данного исследования.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является разработка и внедрение метода фенотипирования CYP3A4 с использованием ивабрадина в качестве маркерного субстрата для оценки активности данного изофермента на фоне приёма индукторов и ингибиторов. Для реализации поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1. Разработать и валидизировать методику количественного определения ивабрадина и его N-деметилированного метаболита в биологических пробах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Оценить возможность использования ивабрадина для изучения активности изофермента CYP3A4 в группе условно здоровых добровольцев исходно и после курсового приёма грейпфрутового сока.

3. Оценить возможность использования ивабрадина для изучения активности CYP3A4 в группе условно здоровых добровольцев исходно и после курсового приёма экстракта зверобоя продырявленного.

4. Оценить возможность изучения активности CYP3A4 с использованием разработанной методики фенотипирования у пациентов на фоне плановой терапии, включающей индукторы/ингибиторы данного изофермента в условиях клинической практики.

Научная новизна

1. Впервые была разработана и внедрена методика количественного ВЭЖХ определения ивабрадина и его N-деметилированного метаболита в плазме крови и моче человека с использованием домперидона в качестве внутреннего стандарта.

2. Впервые была изучена возможность использования ивабрадина в качестве маркерного субстрата для оценки изменения активности CYP3A4 в группе условно здоро-

вых добровольцев на фоне приёма ингибитора и индуктора данного изофермента (грейпфрутового сока и экстракта зверобоя, соответственно).

3. Впервые была изучена возможность применения ивабрадина для фенотипирования активности изофермента CYP3A4 у пациентов, принимающих в составе фармакотерапии ингибиторы и индукторы этой системы метаболизма.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведённое исследование позволило обосновать возможность применения оригинального неинвазивного метода оценки активности CYP3A4, одного из ключевых ферментов метаболизма лекарственных веществ, с использованием ивабрадина в качестве безопасного маркёрного субстрата данного изофермента.

Результаты исследования и перспективы внедрения предложенного метода фенотипирования CYP3A4 включены в материал лекций и практических занятий для студентов, слушателей факультета постдипломного образования и факультета усовершенствования врачей ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России.

Методология исследования

Планирование научной работы основывалось на общих гносеологических принципах, подразумевающих проведение двух ключевых этапов исследования – теоретического и эмпирического. Теоретический этап исследования состоял в поиске и анализе литературных данных, подтверждающих гипотезу относительно возможности использования ивабрадина в качестве маркёрного субстрата CYP3A4. Целью эмпирического этапа исследования было экспериментальное подтверждение вышеобозначенной гипотезы. Планирование и проведение экспериментальной части исследования было основано на принципах биоэтики, GLP и GCP. Выводы сделаны на основании результатов, полученных в ходе наблюдений и экспериментов и статистически обработанных методами непараметрической статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана и валидизирована ВЭЖХ методика количественного определения ивабрадина и N-десметиливабрадина в плазме крови и моче человека с использованием домперидона в качестве «внутреннего стандарта».

2. Определение метаболического отношения N-десметиливабрадин/ивабрадин в плазме крови или моче после однократного перорального приёма ивабрадина в дозе 10

мг позволило выявить ингибирование и индукцию СYP3A4 у добровольцев, вызванную грейпфрутовым соком и экстрактом зверобоя продырявленного, соответственно.

3. Определение метаболического отношения N-десметиливабрадин/ивабрадин в моче после однократного перорального приёма ивабрадина в дозе 10 мг позволяет оценить изменение активности СYP3A4 у пациентов, получающих в составе плановой терапии кларитромицин или карбамазепин.

4. Ивабрадин может быть использован как безопасный субстрат-маркёр для оценки активности изофермента СYP3A4 на фоне приёма индукторов и ингибиторов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в данной работе результатов обусловлена однородностью выборки участников исследования, использованием валидизированной методики количественного анализа биологических проб, применением адекватных непараметрических методов медико-биологической статистики, согласованностью с результатами опубликованных ранее исследований, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Основные результаты работы доложены и обсуждены на 70-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», (Волгоград, апрель 2012 г.), IV-ом съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, сентябрь 2012 г.), IV-ом Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», (Волгоград, октябрь 2012 г.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнялось на базе кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии (НУЗ ОКБ на ст. Волгоград 1 ОАО «РЖД») ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России и лаборатории фармакологической кинетики НИИ фармакологии ВолгГМУ в соответствии с перспективным планом научно-исследовательских работ.

Проведение исследования одобрено на заседании Комиссии по экспертизе диссертационных исследований Регионального Независимого Этического Комитета (про-

токол №147-2011 от 09.12.2011г.). Утверждённый протокол исследования не содержал замечаний, изменений и дополнений.

Материалы и методы исследования

Настоящее исследование включало 3 этапа:

- 1 этап (аналитический) – разработка метода количественного определения ивабрадина и его N-деметилированного метаболита в плазме крови и моче человека;
- 2 этап (фармакокинетическое исследование) – мониторинг концентраций ивабрадина и N-десметиливабрадина в плазме крови и моче добровольцев для изучения активности изофермента CYP3A4;
- 3 этап – оценка активности CYP3A4 у пациентов, принимающих индукторы и ингибиторы данной изоформы в составе плановой фармакотерапии.

Основные реактивы и оборудование:

- калибровка метода: стандарт ивабрадина (Servier, Франция); стандарт N-десметиливабрадина (Toronto Research Chemical Inc., Канада); стандарт домперидона (Toronto Research Chemical Inc., Канада); аналитические весы AX120 (Shimadzu, Япония); холостая моча; замороженная плазма доноров (ГУЗ «Волгоградский областной центр крови»);
- подготовка биологических проб к исследованию: натрия цитрат пятиводный $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, «ОСЧ» (Россия); центрифуга 5702 R (Eppendorf, США); автоматические пипетки-дозаторы объёмом 10, 100, 1000 и 5000 мкл (Eppendorf, США); метанол для ВЭЖХ (Fisher Scientific, Великобритания); манифолд для твердофазной экстракции ISOLUTE VacMaster-10 (Biotage, Швеция); концентрирующие патроны для твердофазной экстракции ISOLUTE CN, 100 мг сорбента / 1 мл объем патрона (Biotage, Швеция); натрия гидроксид NaOH, «ОСЧ» (Россия); pH-метр pH213 (Hanna Instruments, Германия);
- приготовление мобильной фазы: ацетонитрил для ВЭЖХ, УФ 210 нм, «ОСЧ» (Россия); дигидрофосфат калия KH_2PO_4 , «ОСЧ» (Россия); магнитная мешалка Yellow Line (ИКА, Германия); ультразвуковая ванна УЗВ-5,7 («ПКФ «Сапфир», Россия);
- хроматографический анализ: хроматографическая система LC-20AD с флуоресцентным детектором RF-10A XL (Shimadzu, Япония); обращенно-фазная хроматографическая колонка Kromasil C18, зернение 5 мкм, размеры 150 мм*4,6 мм (AkzoNobel, Швеция); шприц для ВЭЖХ 710NR, объем 100 мкл (Hamilton, США).

Целью первого этапа работы явилась разработка метода хроматографического количественного определения ивабрадина и его N-деметилованного метаболита в плазме крови и моче человека с использованием домперидона в качестве «внутреннего стандарта».

Расчёт площади хроматографического пика проводился по формуле:

$$S = H \times \frac{t_2 - t_1}{2},$$

где S – площадь пика, H – высота хроматографического пика, t_1 – время начала пика, t_2 – время окончания пика.

Валидация разработанного метода проводилась в соответствии с рекомендациями Европейского Медицинского Агентства (Guideline on bioanalytical method validation, ЕМЕА, 2011).

Второй этап состоял в проведении открытого перекрёстного фармакокинетического исследования, в котором изучалась возможность использования ивабрадина в качестве маркерного субстрата для оценки активности изофермента CYP3A4 у добровольцев.

В исследование были включены 12 добровольцев, соответствующих следующим критериям: мужчины от 18 до 45 лет; верифицированный диагноз «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования; ИМТ в пределах 18,5-25; подписание информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии невключения добровольцев в исследование: отягощенный аллергологический анамнез; лекарственная непереносимость; хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови; хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте (за исключением аппендэктомии); острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до начала исследования; прием лекарственных препаратов, биологически активных добавок и нутриентов, оказывающих влияние на активность CYP3A4 менее, чем за 30 дней до начала исследования; курение более 10 сигарет в день; необходимость приёма домперидона в момент проведения исследования.

После подписания информированного согласия проводилось скрининговое клиническое обследование добровольцев, включающее врачебный осмотр, а также лабора-

торные тесты: клинический анализ крови, клинический анализ мочи, биохимический анализ крови (общий белок, билирубин, креатинин, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, глюкоза, холестерин), ЭКГ, тест на гепатит С, ВИЧ.

Скрининговые лабораторные исследования осуществляли на базе общеклинической и биохимической лабораторий НУЗ «ОКБ на ст. Волгоград-1 ОАО «РЖД». Тестирование добровольцев на гепатит С и ВИЧ проводилось на базе ГУЗ "Волгоградский областной Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями".

Включённые в исследование участники совершили 4 плановых визита (рис. 1). В начале каждого визита добровольцам производилось взятие 5 мл венозной крови из локтевой вены. После этого каждый участник исследования перорально однократно принимал натошак 10 мг ивабрадина (Кораксан[®], Servier, Франция), который запивался 250 мл воды (1, 3 и 4 визиты) или 250 мл грейпфрутового сока (визит 2).

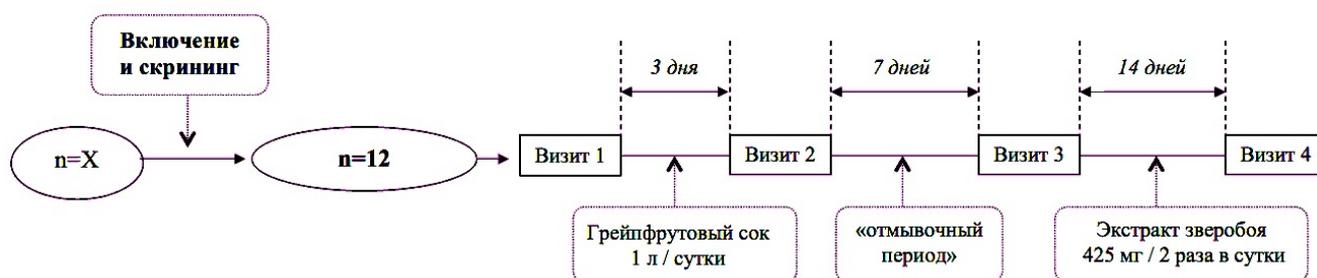


Рис. 1. Дизайн открытого перекрёстного фармакокинетического исследования у добровольцев.

В течение последующих 6-ти часов производилось пятикратное взятие 5 мл венозной крови в следующие временные точки от приёма препарата: 0,5 ч ($\approx 0,5 T_{Cmax}$); 1,2 ч ($\approx T_{Cmax}$); 2,5 ч; 3,75 ч; 5,5 ч ($\approx 0,5 T_{1/2}$).

Образцы крови собирали в пластиковые пробирки, содержащие 0,5 мл 5%-го раствора натрия цитрата в качестве антикоагулянта.

На протяжении 12-ти часов после однократного приёма ивабрадина, что соответствует периоду полувыведения препарата, у добровольцев собиралась моча с целью оценки кумулятивной почечной экскреции ивабрадина и его метаболита. Общий объём собранной мочи измерялся с помощью градуированного мерного цилиндра.

На всех визитах для подтверждения отсутствия риска развития выраженной брадикардии на фоне приёма ивабрадина как диагностического средства у добровольцев измерялась ЧСС после 1-го (до приема препарата) и 3-его (время достижения максимальной концентрации) взятия крови.

В течение 3-х дней до второго визита добровольцы пили 100% восстановленный грейпфрутовый сок (Я[®], ОАО "ЭКЗ "Лебедянский", Россия) в количестве 1 л/сутки.

Временной промежуток между вторым и третьим визитами («отмывочный период») составлял 7 дней, что было необходимо для восстановления активности CYP3A4 после прекращения приёма грейпфрутового сока (Seden K. et al., 2010).

В период между третьим и четвёртым визитами участникам второго этапа исследования в качестве индуктора изофермента CYP3A4 был назначен препарат растительного происхождения, обладающий антидепрессивным и психостимулирующим действием - зверобоя продырявленного травы экстракт сухой (Негрустин[®], 425 мг капсулы, Гексал АГ, Салютас Фарма ГмбХ, Германия) по 1 капсуле 2 раза в сутки на протяжении 14 дней.

Во время 2-го и последующих визитов с помощью опроса участников исследования проводилась оценка комплаентности (фиксация случаев пропуска приёма индуктора/ингибитора), а также мониторинг нежелательных эффектов.

Критерии исключения добровольца из исследования: отказ продолжать участие в исследовании; аллергические реакции и другие побочные эффекты приёма ивабрадина (ЧСС < 55 уд/мин), грейпфрутового сока и/или экстракта зверобоя продырявленного; невозможность соблюдения, либо нарушение запланированной схемы исследования.

По результатам мониторинга концентраций ивабрадина и N-десметиливабрадина в плазме крови строили фармакокинетические кривые зависимости концентраций указанных веществ от времени с использованием двухкамерной модели для однократного перорального приёма препарата (Каркищенко Н.Н., 2001). Для расчёта модельных параметров (k_a , k_e , k_{12} , k_{21} , C_0) методом наименьших квадратов применяли надстройку «поиск решения» с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» ($AUC_{0-12ч}$) рассчитывали методом статистических моментов (методом «наименьших трапеций»).

Метаболическое отношение (MR) в плазме определяли как отношение «площади под фармакокинетической кривой» метаболита ($AUC_{0-12ч\ N-IVB}$) к «площади под фармакокинетической кривой» ивабрадина ($AUC_{0-12ч\ IVB}$):

$$MR_{\text{плазма}} = \frac{AUC_{0-12ч\ N-IVB}}{AUC_{0-12ч\ IVB}}$$

Метаболическое отношение в моче, собранной за 12ч после однократного приёма ивабрадина, рассчитывалось по отношению кумулятивной экскреции (CE) N-десметиливабрадина к ивабрадину, равной произведению концентрации вещества (C) на объём мочи (V):

$$MR_{\text{моча}} = \frac{CE_{0-12ч\ N-IVB}}{CE_{0-12ч\ IVB}} = \frac{C_{N-IVB} \times V_{0-12ч}}{C_{IVB} \times V_{0-12ч}}$$

На третьем этапе исследования для апробирования разработанной методики в условиях реальной клинической практики было сформировано две группы пациентов (рис. 2), находящихся на стационарном лечении в НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Волгоград-1 ОАО «РЖД»:

- 1-ая группа: пациенты терапевтического отделения с показанием к назначению ингибитора изофермента CYP3A4 - кларитромицина в дозе 1000 мг/сутки на срок не менее 7 суток;
- 2-ая группа: пациенты неврологического отделения с показаниями к фармакотерапии индуктором изофермента CYP3A4 - карбамазепином в дозе 400 мг/сутки не менее 14 суток.

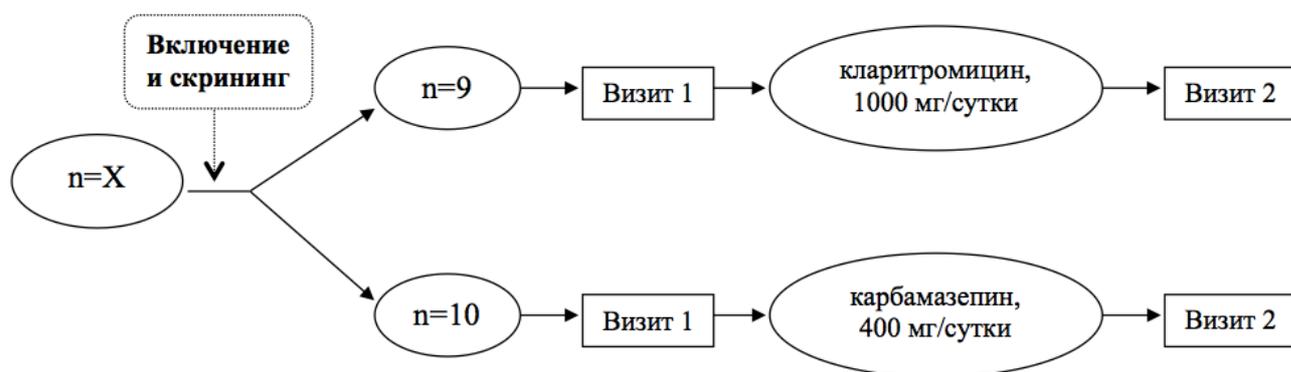


Рис. 2. Оценка активности CYP3A4 у пациентов, принимающих индукторы/ингибиторы этой изоформы в составе плановой фармакотерапии.

Фармакотерапия кларитромицином и карбамазепином назначалась пациентам лечащим врачом в плановом порядке. Для оценки активности изофермента CYP3A4, включённым в исследование пациентам однократно назначался ивабрадин (Кораксан[®], Servier, Франция) в дозе 10 мг в 20:00. После этого в моче, собранной за 12 ч, определяли содержание ивабрадина и его N-деметилованного метаболита. Метаболическое отношение в моче рассчитывали аналогично второму этапу. Пробы мочи анализировали в обеих группах исходно и через 7 суток в группе 1 или 14 суток в группе 2.

Критериями исключения из исследования являлись: плановый приём ивабрадина, приём домперидона за 48 часов до участия в исследовании, выраженная брадикардия (ЧСС < 55 уд/мин), сахарный диабет, ожирение (ИМТ > 30 кг/м²), тяжёлые заболевания печени, декомпенсированная хроническая сердечная недостаточность, терминальная стадия хронической почечной недостаточности, синдром слабости синусового узла, синоатриальная блокада, искусственный водитель ритма сердца, атриовентрикулярная блокада III степени, индивидуальная непереносимость ивабрадина.

Результаты и их обсуждение

Разработка метода количественного анализа ивабрадина и его N-деметилованного метаболита состояла из несколько этапов, первый из которых заключался в подборе условий хроматографирования изучаемых веществ, включающем определение оптимальных параметров мобильной фазы (значение pH, соотношение компонентов мобильной фазы), а также самой хроматографической системы (температура анализа, скорость потока). С этой целью из маточных растворов стандартов ивабрадина и N-десметилвабрадина готовились рабочие водные растворы в диапазоне от 25 до 1000 нг/мл. Количественное определение проводилось на жидкостном хроматографе Shimadzu с флуоресцентным детектором при длине волны экстинкции 283 нм и длине волны эмиссии 328 нм, что соответствовало спектру собственной флуоресценции изучаемых веществ. В качестве мобильной фазы была выбрана смесь ацетонитрила и 0,05М раствора однозамещённой калиевой соли орто-фосфорной кислоты. Экспериментально было установлено, что оптимальным соотношением компонентов мобильной фазы является 0,24/0,76. При этом pH буферного раствора составлял 4,8. Хроматографирование проводили при скорости потока 1 мл/мин. Среднее время удерживания для ивабрадина составило $8,0 \pm 0,21$ мин; для N-десметилвабрадина – $8,9 \pm 0,28$ мин, для домперидона (внутреннего стандарта) –

11,2±0,14 мин. Таким образом, подобранные условия хроматографирования обеспечивали необходимую степень разделение пиков изучаемых при времени удерживания, приемлемом в условиях рутинного анализа (рис. 3).

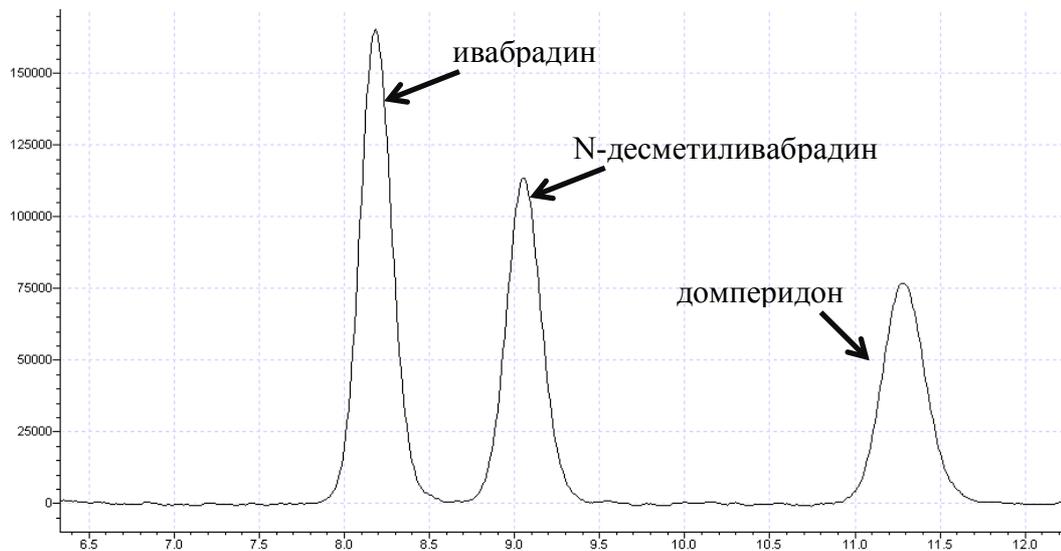
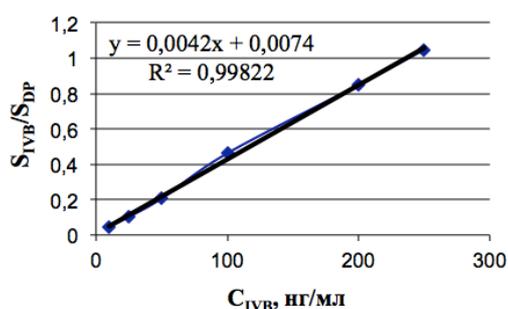


Рис. 3. Пример хроматограммы, полученной при анализе рабочего раствора ивабрадина (250 нг/мл), N-десметиливабрадина (250 нг/мл) и домперидона (1000 нг/мл). По оси абсцисс – минуты, по оси ординат – единицы интенсивности эмиссии.

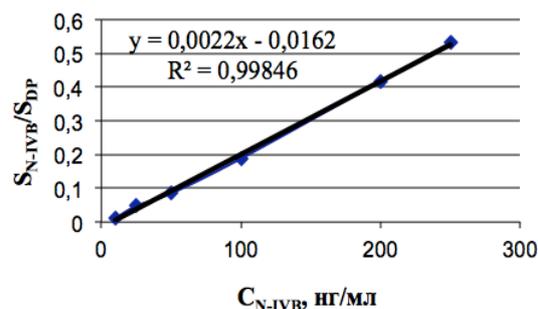
Второй этап разработки метода заключался в подборе условий пробоподготовки, позволяющей проводить концентрирование исходных образцов. Экспериментально было установлено, что оптимальной является следующая схема подготовки к проведению анализа: 1) кондиционирование патрона с привитой CN-фазой с помощью дистиллированной воды 2) нанесение биопробы (плазмы или мочи); 3) промывание патрона дистиллированной водой; 4) элюирование искомым веществ с помощью метанола; 5) упаривание образца до получения сухого остатка; 6) его последующее растворение в 100 мкл метанола перед хроматографированием.

Третий этап разработки метода количественного анализа состоял в калибровке системы по целевым биологическим матрицам (плазме крови и моче) и определении основных валидационных характеристик (табл. 1).

Для построения калибровочных кривых (рис. 4 и 5) готовились разведения изучаемых веществ в концентрациях, соответствующих терапевтическому диапазону ивабрадина и его метаболита в плазме крови и моче.

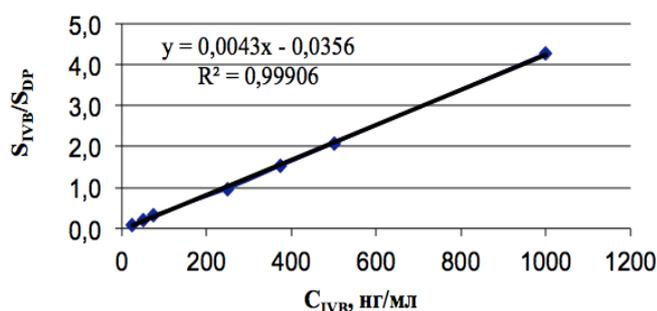


(а)

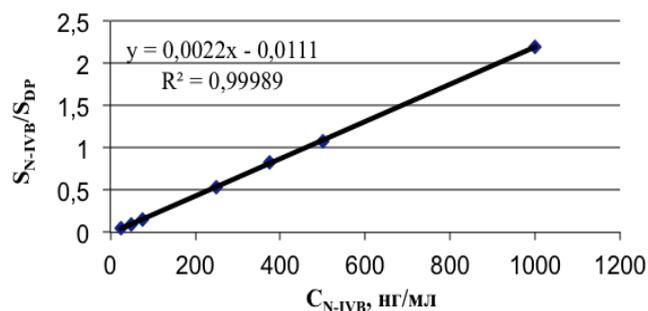


(б)

Рис. 4. Калибровочная зависимость концентрации ивабрадина (а) и N-десметил-ивабрадина (б) в плазме крови.



(а)



(б)

Рис. 5. Калибровочная зависимость концентрации ивабрадина (а) и N-десметил-ивабрадина (б) в моче (S – площадь хроматографического пика; C – концентрация).

Таблица 1. Основные валидационные параметры биоаналитической методики количественного определения ивабрадина и его N-деметилированного метаболита.

Био-проба	C _{НОМ} , нг/мл	Точность, %CV		Правильность, %НОМ		Предел количественного определения, нг/мл	
		Внутри-дневная	Меж-дневная	Внутри-дневная	Меж-дневная	Нижний	Верхний
Ивабрадин							
Плазма	5	41,33	46,66	129,74	54,29	10	250
	10	4,58	19,13	118,61	94,11		
	25	13,02	10,9	113,84	102,44		
	50	14,08	7,18	106,29	97,84		
	100	1,43	10,7	90,73	102,73		
	200	1,42	1,54	98,19	99,49		
	250	6,02	1,27	99,15	99,13		
Моча	25	10,75	11,04	119,74	113,56	25	1000
	50	4,05	7,65	115,49	110,83		
	75	6,28	11,56	112,19	105,9		
	250	3,9	3,29	93,28	92,69		
	375	7,2	4,28	96,62	100,46		
	500	5,27	5,16	98	99,28		
	1000	2,12	3,22	100,38	100,02		

Био-проба	C _{НОМ} , нг/мл	Точность, %CV		Правильность, %NOM		Предел количественного определения, нг/мл	
		Внутри-дневная	Меж-дневная	Внутри-дневная	Меж-дневная	Нижний	Верхний
N-десметиливабрадин							
Плазма	5	67,56	11,46	5,64	-24,01	10	250
	10	10,95	3,86	80,31	82,39		
	25	18,77	7,52	85,5	94,64		
	50	14,61	6,54	108,55	101,78		
	100	5,31	6,59	107,26	108,35		
	200	2,78	1,51	101,52	100,57		
	250	4,47	2,98	100,46	100,71		
Моча	25	13,24	10,88	110,62	108,75	25	1000
	50	12,72	10,69	99,37	96,37		
	75	7,74	8,22	101,08	98,33		
	250	2,48	5,17	98,17	97,31		
	375	7,55	4,92	101,77	101,62		
	500	9,23	6,64	99,55	97		
	1000	5,7	3,64	100,43	98,99		

Примечание: C_{НОМ} – номинальная концентрация; %CV – коэффициент вариации; %NOM – процент от номинальной концентрации, который составляет концентрация, рассчитанная по уравнению регрессии.

Расчёт валидационных параметров показал, что значения точности и правильности не достигают установленных пределов при концентрации искомых веществ в плазме равной 5 нг/мл, что позволяет рассматривать концентрацию 10 нг/мл как нижний предел количественного определения ивабрадина и его метаболита в плазме крови.

На основании результатов определения концентраций ивабрадина и N-десметиливабрадина в плазме крови и моче добровольцев исходно и после 3-х дневного приёма ингибитора CYP3A4 (грейпфрутового сока) были рассчитаны «площади под фармакокинетической кривой» ивабрадина и его метаболита (табл. 2), а также кумулятивная экскреция данных веществ (табл. 3).

Таблица 2. «Площадь под фармакокинетической кривой» ивабрадина и его метаболита у добровольцев до и после курсового приёма грейпфрутового сока, (Me (LQ; UQ)).

Показатель	Визит 1 (исходно)	Визит 2 (ингибитор CYP3A4)
AUC _{IVB (0-12ч)} , нг·ч/мл	66,72 (53,31; 101,52)	144,22 (94,88; 188,55)
AUC _{N-IVB (0-12ч)} , нг·ч/мл	98,92 (88,17; 151,24)	105,78 (75,74; 117,42)

На фоне приема сока у добровольцев в плазме крови было выявлено повышение AUC ивабрадина на 53,7% и AUC метаболита на 6,48%, что свидетельствовало об уменьшении конверсии ивабрадина в N-десметиливабрадин, повышении плазменной концентрации неизменённого препарата и, в незначительной степени, его основного метаболита, биотрансформация которого также является CYP3A4-зависимой.

Полученные данные согласуются с результатами исследования влияния грейпфрутового сока на фармакокинетику ивабрадина, проводившимся разработчиком препарата, компанией Servier (Ivabradine: scientific discussion, EMEA, 2005).

Грейпфрутовый сок является прямым ингибитором фермента CYP3A4 за счёт содержащихся в нём активных компонентов - бергамоттина и 6,7-дигидроксибергамоттина, которые относятся к ингибиторам средней силы (Girenavar B. et al., 2007). Так как активные компоненты грейпфрутового сока оказывают влияние преимущественно на фермент CYP3A4 в кишечнике, наблюдаемое повышение плазменной концентрации ивабрадина было обусловлено, в первую очередь, увеличением абсолютной биодоступности препарата вследствие снижения интенсивности его биотрансформации в энтероцитах (Dahan A., Amidon G.L., 2009).

Сходные изменения были зафиксированы при параллельном изучении кумулятивной почечной экскреции (CE) данных веществ, оцениваемой по их абсолютному количеству в моче, собранной за 12 часов после однократного приёма 10 мг ивабрадина (табл. 3).

Таблица 3. Кумулятивная экскреция ивабрадина и N-десметиливабрадина с мочой у добровольцев исходно и на фоне приёма ингибитора CYP3A4 (Me (LQ; UQ)).

Показатель	Визит 1 (исходно)	Визит 2 (ингибитор CYP3A4)
CE _{IVB} , мкг	121,9 (57,2; 360,8)	282,2 (161,9; 471,3)
CE _{N-IVB} , мкг	48,3 (23,9; 86,8)	58,4 (30,5; 73,9)

Экскреция неизменённого препарата с мочой спустя 3 дня приема сока грейпфрута увеличилась на 56,8% по сравнению с исходной, N-десметиливабрадина – на 17,3%.

На основании полученных данных производился расчёт метаболических отношений в плазме крови и моче добровольцев исходно, а также спустя 3 дня употребления сока (табл. 4). В результате было обнаружено достоверное снижение MR на 52,3% в плазме и на 42,1% в моче, что однозначно указывало на ингибирование изофермента CYP3A4.

Таблица 4. Метаболические отношения, рассчитанные по плазме и моче добровольцев исходно и на фоне приёма ингибитора CYP3A4 (Me (LQ; UQ)).

Метаболическое отношение	Визит 1 (исходно)	Визит 2 (ингибитор CYP3A4)	p*
MR _{плазма}	1,49 (1,34; 1,66)	0,71 (0,41; 1)	0,002
MR _{моча}	0,38 (0,35; 0,47)	0,22 (0,15; 0,24)	0,002

Примечание: *p – критерий Вилкоксона

Результаты количественного определения ивабрадина и его метаболита, полученные при анализе плазмы крови и мочи добровольцев исходно, а также на фоне приёма индуктора метаболизма CYP3A4 (экстракта зверобоя продырявленного) представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5. AUC ивабрадина и N-десметиливабрадина в плазме крови добровольцев исходно и на фоне приёма индуктора CYP3A4 (Me (LQ; UQ)).

Показатель	Визит 3 (исходно)	Визит 4 (индуктор CYP3A4)
AUC _{IVB} , нг•ч/мл	93,14 (66,39; 140,65)	79,84 (65,23; 115,68)
AUC _{N-IVB} , нг•ч/мл	92,78 (50,34; 143,10)	117,84 (96,4; 134,32)

Полученные в ходе второго этапа исследования результаты выявили снижение AUC ивабрадина на 14,2% и повышение AUC метаболита на 21,2% на фоне приёма экстракта *Hypericum perforatum*, что согласуется с опубликованными ранее данными о влиянии экстракта зверобоя продырявленного на фармакокинетику ивабрадина (Portolés A. et al., 2006).

Кроме того, было выявлено снижение кумулятивной почечной экскреции неизменённого препарата на 12,3% и повышение выведения с мочой N-деметилированного метаболита в среднем на 33,1% спустя 14 дней приёма добровольцами экстракта *Hypericum perforatum* в дозе 850 мг/сутки.

Таблица 6. Кумулятивная экскреция ивабрадина и N-десметиливабрадина с мочой добровольцев исходно и на фоне приёма индуктора CYP3A4 Me (LQ; UQ)).

Показатель	Визит 3 (исходно)	Визит 4 (индуктор CYP3A4)
CE _{IVB} , мкг	319,2 (209,4; 435,0)	279,8 (213,9; 324,0)
CE _{N-IVB} , мкг	106,9 (63,5; 143,7)	158,4 (102,6; 209,5)

При этом метаболическое отношение, рассчитанное и по плазме, и по моче добровольцев, достоверно увеличилось по сравнению с исходом, что отражает индукцию фермента (табл. 7).

Таблица 7. Метаболическое отношение, рассчитанное по плазме и моче добровольцев исходно и на фоне приёма индуктора CYP3A4 (Me (LQ; UQ)).

Метаболическое отношение	Визит 1	Визит 2 (ингибитор CYP3A4)	p*
MR _{плазма}	1,06 (0,51; 1,45)	1,5 (1; 1,8)	0,004
MR _{моча}	0,32 (0,29; 0,35)	0,54 (0,52; 0,65)	0,002

Примечание: *p – критерий Вилкоксона

Множественные сравнения между результатами, полученными по моче добровольцев (рис. 6), также установили достоверные различия между величинами метаболического отношения на фоне ингибирования и индукции CYP3A4.

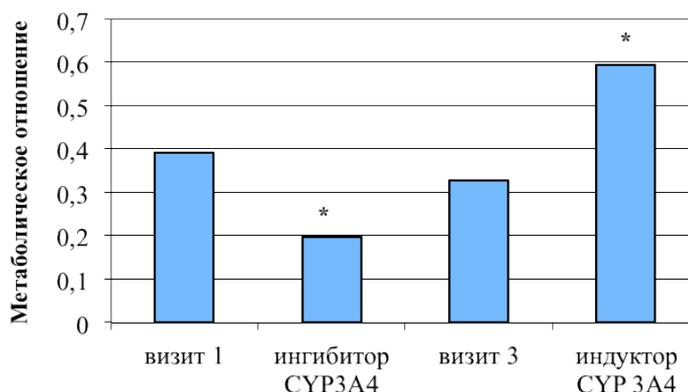


Рис. 6. Метаболические отношения, определённые в моче добровольцев исходно и на фоне приёма ингибитора/индуктора CYP3A4 (*p<0,05; критерии Фридмана и Ньюмена-Кейлса).

С использованием метода Блэнда-Алтмана, было установлено, что различия между результатами определения метаболического коэффициента в плазме и моче добровольцев находятся в пределах $\pm 2SD$ разности определений, что свидетельствует о согласованности обоих изучаемых методов. Таким образом, однонаправленные изменения метаболического отношения N-десметиливабрадин/ивабрадин как в плазме, так и моче добровольцев, наблюдаемые нами на фоне приёма индуктора/ингибитора, позволяют использовать оба варианта биопроб для фенотипирования CYP3A4. Однако, поскольку одним из требований к методам фенотипирования ферментов метаболизма является минимальная инвазивность, наиболее приемлемым является использование для оценки ак-

тивности СYP3A4 метаболического отношения в моче, не требующее взятия проб крови и более простое с организационной точки зрения.

Для подтверждения безопасности использования ивабрадина в настоящем исследовании, в ходе каждого из 4-х визитов у добровольцев контролировалось ЧСС до взятия холостой плазмы крови и спустя 1,5 часа после однократного приёма ивабрадина, что соответствовало $T_{C_{max}}$. В среднем снижение ЧСС составило 5-8 уд/мин. Ни у одного из добровольцев не было зафиксировано брадикардии (ЧСС < 60 уд/мин). Кроме того, на протяжении всего периода исследования не было выявлено статистически значимых различий в уровне ЧСС, как на фоне приема грейпфрутового сока, так и экстракта зверобоя.

В связи с отличиями выборки условно здоровых добровольцев от лиц, имеющих сопутствующие заболевания, и необходимостью изучения риска аналитической интерференции ивабрадина с наиболее часто назначаемыми индукторами и ингибиторами, предложенная методика фенотипирования была апробирована в клинической практике на двух группах пациентов, одна из которых в составе плановой терапии получала кларитромицин, относящийся к ингибиторам СYP3A4, вторая группа – карбамазепин, индуктор систем биотрансформации.

Результаты определения кумулятивной экскреция ивабрадина и его метаболита с мочой, собранной в течение 12-ти часов после однократного приёма 10 мг препарата Кораксан[®], пациентами исходно и спустя 7 дней приёма кларитромицина в дозе 1000 мг/сутки, представлены в табл. 8.

Таблица 8. Кумулятивная экскреция с мочой и метаболическое отношение ивабрадина и N-десметиливабрадина пациентов исходно и на фоне приёма ингибитора СYP3A4 (Me (LQ; UQ)).

Показатель	Визит 1 (исходно)	Визит 2 (ингибитор СYP3A4)
CE _{IVB} , мкг	163,21 (116,53; 211,89)	177,19 (156,88; 222,47)
CE _{N-IVB} , мкг	59,15 (39,66; 70,29)	36,52 (30,84; 53,51)
MR _{моча}	0,35 (0,32; 0,36)	0,25 (0,19; 0,26)

В результате было установлено, что кумулятивная экскреция ивабрадина в группе пациентов, получающих кларитромицин, повысилась на 8,5%, в то время как экскреция N-десметиливабрадина снизилась на 38,2%. Достоверное уменьшение метаболического

отношения в моче на 26,9% подтвердило ожидаемое ингибирование CYP3A4 на фоне приёма кларитромицина.

В группе пациентов, получающих карбамазепин, были зафиксированы обратные изменения изучаемого показателя. 12-ти часовая экскреция с мочой ивабрадина увеличилась на 17%, а метаболита – повысилась на 87,1%, вследствие чего рассчитанное метаболическое отношение выросло на 54,2%, указывая на развитие индукции изофермента CYP3A4 (табл. 9).

Таблица 9. Кумулятивная экскреция с мочой и метаболическое отношение ивабрадина и N-десметиливабрадина у пациентов исходно и на фоне приёма индуктора CYP3A4 (Me (LQ; UQ)).

Показатель	Визит 1 (исходно)	Визит 2 (индуктор CYP3A4)
CE _{IVB} , мкг	198,54 (131,77; 312,45)	232,41 (180,01; 274,15)
CE _{N-IVB} , мкг	65,6 (48,61; 90,34)	122,75 (93,16; 136,83)
MR _{моча}	0,33 (0,29; 0,37)	0,51 (0,45; 0,55)

Таким образом, были подтверждены достоверные различия между величинами метаболического отношения у пациентов на фоне ингибирования и индукции CYP3A4 (рис. 7).

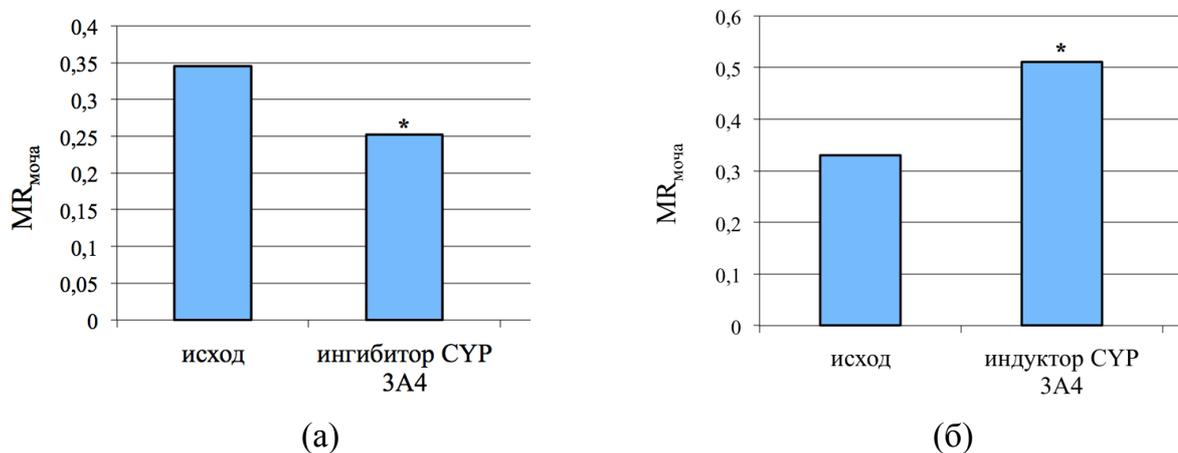


Рис. 7. Метаболические отношения, определённые в моче пациентов исходно и после курсового приёма ингибитора (а) и индуктора (б) CYP3A4 (* $p < 0,05$; критерий Вилкоксона).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. Разработанная методика количественного определения ивабрадина и его N-деметилированного метаболита обладает аналитическими характеристиками, приемлемыми для проведения анализа их концентраций в плазме крови и моче у человека.

2. На фоне курсового приёма (3 дня) грейпфрутового сока (1л/сут) было выявлено достоверное уменьшение метаболического отношения N-десметиливабрадин/ивабрадин в плазме крови (52,3%) и моче (42,1%) условно здоровых добровольцев.

3. На фоне курсового приёма (14 дней) сухого экстракта *Hypericum perforatum* (850 мг/сут) отмечается статистически значимое увеличение метаболического отношения N-десметиливабрадин/ивабрадин в плазме крови (41,5%) и моче (68,8%) условно здоровых добровольцев.

4. Метаболическое отношение в плазме крови или моче является объективным показателем, позволяющим оценивать изменения активности CYP3A4 на фоне приёма индукторов, либо ингибиторов данной изоформы. Результаты оценки активности CYP3A4, получаемые на основании анализа этих типов биопроб, согласуются между собой.

5. Фенотипирование CYP3A4 с использованием «ивабрадинового теста» позволяет проводить мониторинг изменения активности данного изофермента у пациентов, получающих его индуктор, либо ингибитор (карбамазепин и кларитромицин, соответственно) в составе плановой фармакотерапии.

6. Однократный приём 10 мг ивабрадина не приводил к развитию брадикардии (ЧСС < 60 уд/мин) в группах условно здоровых добровольцев и пациентов, как исходно, так и в случае ингибирования/индукции CYP3A4, что подтверждает безопасность предлагаемого метода фенотипирования.

Практические рекомендации

1. Рекомендовать применение ивабрадина в качестве маркёрного субстрата для проведения фенотипирования CYP3A4 в исследованиях по изучению межлекарственных взаимодействий.

2. Рекомендовать использование разработанного нами хроматографического метода для количественного определения ивабрадина и его N-деметилированного ивабра-

дина в плазме крови или моче.

3. Рекомендовать рассматривать метаболическое отношение N-десметиливабрадин/ивабрадин в моче как адекватный показатель для оценки активности CYP3A4.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Предложенный метод фенотипирования изофермента CYP3A4 может в дальнейшем использоваться для изучения изменения активности данной системы метаболизма у пациентов с заболеваниями печени, анализа взаимосвязи активности фермента с фармакокинетикой его субстратов, прогнозирования нежелательных межлекарственных взаимодействий у пациентов в условиях полипрагмазии, а также при разработке алгоритмов коррекции режимов дозирования препаратов, в метаболизме которых принимает участие CYP3A4.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Толкачев Б.Е. If-каналы: подлинные «водители» сердечного ритма // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2008. – №1 (25). – С. 14-20.
2. Кузнецов К.А., Рябуха А.Ф., Магницкая О.В., Смирнова Л.А., Сучков Е.А., Ефимова А.А., Толкачев Б.Е.. Количественное определение ивабрадина у больных ишемической болезнью сердца // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – №2 (38). – С. 48-50.
3. Петров В.И., Магницкая О.В., Толкачев Б.Е., Смирнова Л.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А., Сучков Е.А.. Сравнительная оценка методов определения метаболического коэффициента N-десметиливабрадин/ивабрадин в плазме и моче. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – №3 (47). – С. 45-47.
4. Петров В.И., Магницкая О.В., Толкачев Б.Е., Смирнова Л.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А., Сучков Е.А.. Определение метаболического отношения N-десметиливабрадин/ивабрадин для оценки активности CYP3A4 // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – №3 (47). – С. 51-54.

Другие публикации по теме диссертации

5. Толкачев Б.Е. Оптимизация количественного определения ивабрадина в плазме крови // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы юбилейной 70-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2012. – С. 375.
6. Толкачев Б.Е., Смирнова Л.А., Магницкая О.В., Сучков Е.А. Методологические основы терапевтического лекарственного мониторинга ивабрадина. // Инновации в современной фармакологии: Материалы IV-го съезда фармакологов России. – Москва: Изд-во Фолиум, 2012. – С. 179.
7. Толкачев Б.Е., Сучков Е.А. Определение ивабрадина и его N-деметилированного метаболита для оценки активности изофермента CYP3A4. // Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2012. – С. 212.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- AUC** - area under curve, площадь под фармакокинетической кривой
- CE** - cumulative excretion, кумулятивная экскреция
- DP** - domperidone, домперидон
- IVB** - ivabradine, ивабрадин
- MR** - metabolic ratio, метаболическое отношение
- N-IVB** - N-desmethyivabradine, N-десметиливабрадин
- ВИЧ** - вирус иммунодефицита человека
- ВЭЖХ** - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ИМТ** - индекс массы тела
- ЧСС** - частота сердечных сокращений
- ЭКГ** - электрокардиограмма

ТОЛКАЧЕВ БОРИС ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ИВАБРАДИН КАК СУБСТРАТ-МАРКЁР АКТИВНОСТИ
ИЗОФЕРМЕНТА СУРЗА4**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать 09.09.2013 г. Формат 60 x 84/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Times. Усл. печ. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ 300/1.

Отпечано с готового оригинал-макета заказчика
в типографии издательства «Перемена»
400066, г. Волгоград, пр. им. В. И. Ленина, 27